

Entwicklung und Optimierung
eines Analysesystems zur
online-Überwachung
des Wachstums
in geschüttelten Kulturen

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. Jörg Schmidt-Hager
geboren am 23. Juli 1981 in Hannover

2013

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Detlef Bahnemann
Tag der Promotion: 17. Juli 2013

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen verfasst habe. Ferner versichere ich, dass die Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder andere Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Hannover, im April 2013

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich sehr für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Weiterhin möchte ich mich für das große Vertrauen bedanken, das er mir entgegengebracht hat.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich sehr Herrn Prof. Dr. Detlef Bahnemann.

Herrn Dr. Sascha Beutel danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für sein Interesse an meiner Arbeit und die sinnvollen Anstöße zu ihrer Verbesserung.

Herrn Dr. Gernot T. John danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Kooperationsprojekts, Herrn Michael Findeis für die finale Konstruktion des Sensorprototyps und allen Mitarbeitern der Firma PreSens GmbH, die im Rahmen des OGM-Projekts ebenfalls beteiligt waren.

Dem gesamten AK Scheper möchte ich für das herzliche Arbeitsklima, die netten Pokerabende nach Feierabend und die ständige Hilfsbereitschaft in allen Dingen danken. Natürlich bedanke ich mich beim Technikumsteam für die Aufnahme in den Adlerhorst. Ihr habt meine Zeit am Institut wirklich geprägt. Besonders möchte ich mich bei Bürokollegen und hier vor allem bei Mehmet Ünal und Christoph Wolff bedanken, mit denen ich die verrücktesten Ideen spinnen konnte.

Ich danke den Guten Geistern des Instituts Frau Cornelia Alic, Frau Angelika Behnsen, Herrn Martin Pähler sowie Frau Martina Weiß, ohne die der reibungslose Ablauf im Institutsalltag gar nicht möglich wäre.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der institutsinternen Werkstätte. Mit ihrer schnellen Hilfe konnte noch jedes Problem schnell gelöst werden.

Ein spezieller Dank geht an Christian Ude für seine fleißige Mitarbeit in den letzten Zügen meiner Arbeit, an Matthias Rheinheimer, für die Unterstützung bei den Kultivierungen von Myzelpilzen, Robert Ulmann und besonders Julia Löffler sowie meiner Mutter für das fleißige Korrekturlesen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und meiner Familie, die ich besonders in den letzten Wochen doch sehr strapaziert habe. Ihr musstet alle meine Gefühlsschwankungen während des Schreibens dieser Arbeit ertragen. Wenn ich mal frustriert war, habt ihr mich aufgebaut. Wenn ich Hilfe brauchte, wart ihr da. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Kurzzusammenfassung

Entwicklung und Optimierung eines Analysesystems zur online-Überwachung des Wachstums in geschüttelten Kulturen

Auch heutzutage noch gilt der Schüttelkolben in der industriellen Forschung und Entwicklung biotechnologischer Produkte als wichtiger Reaktortyp. Für die Überwachung dieses Arbeitsvolumens sind optische Sensoren besonders geeignet.

Diese Arbeit beschreibt die Adaptation eines optischen Biomassesensors in ein Multisensorsystem für den Schüttelkolbenmaßstab. Auf Grundlage der 180°-Streulichttechnologie wird ein automatisiertes Messverfahren der Biomassekonzentration entwickelt, die in Kombination mit optischen Sensoren für pO₂ und pH eine ganzheitliche, nicht-invasive Überwachung aller relevanten Messgrößen eines Bioprozesses bereitstellt. Für die Überwachung geschüttelter Kulturen wird auf Basis eines bestehenden Systems ein spezieller Dreisensorprototyp entwickelt, der durch Synchronisation der Messauslösung des neu integrierten Sensors die Flüssigkeitsbewegung im geschüttelten System kompensiert. Der Multisensor kann auf einem handelsüblichen Tischschüttler befestigt werden.

Nach Konstruktion des Prototyps wird das Streulichtverhalten zunächst mit dem Kalibrationsstandard Formazin im kontinuierlichen Betrieb untersucht. Dazu werden Parameter wie Schüttelfrequenz, Kolbengröße, Kolbenart und Füllvolumen variiert, um deren Einfluss auf den Messwert näher zu bestimmen. Zusätzlich werden Parameter charakterisiert, die das optische Verhalten einer trüben Lösung verändern. Nach einem Vergleich zwischen Formazin und Zellsuspensionen wird das Messsystem auf den Bioprozess adaptiert. Es werden unterschiedliche Strategien zur Kalibrationsbildung vorgestellt, die eine direkte Umrechnung des Sensorsignals in eine Kultivierungsbasisgröße (Optische Dichte, Biotrockenmasse, Zellzahl) ermöglichen. Des Weiteren werden Kalibrationen typischer Vertreter prokaryotischer, eukaryotischer sowie mycelbildender Kulturen entwickelt und validiert. Bei Verwendung der Kalibrationsmodelle steht eine automatisierte Multisensorplattform zur Verfügung, die eine offline-Probennahme in einem Bioprozess ersetzen kann.

Schlagwörter: online-Prozessüberwachung, Streulicht, Optische Dichte, Biomassesensor, Multisensor, Schüttelkolben

Abstract

Development and optimization of an analytical system for online-monitoring of growth in shaken cultures

Even nowadays shaken flasks are considered an important reactor type in industrial research and development. Optical sensors are particularly suitable for monitoring this operating volume.

This work describes the adaptation of an optical biomass sensor into a multisensor system for shaken cultures. On the basis of 180° scattered light technology an automated measuring process for biomass concentration is developed, which in combination with optical sensors for pO₂ and pH provides a holistic, non-invasive monitoring of all the relevant measuring values in a bioprocess. For monitoring shaken cultures, a special three-sensor prototype is developed based on an existing system. This prototype compensates the movement of fluid by synchronizing the triggering of the newly integrated sensor in a shaken system. The multisensor can be fixed onto a commercially available shaker.

Subsequent to the construction of the prototype the light scattering behavior is examined in continuous operation by first using calibration standard formazine. During this process, parameters like shaking frequency, flask size, flask type and filling volume are varied in order to determine the influence of the measured value in more detail. Additionally parameters that alter the optical behavior of a turbid solution are characterized. After a comparison between formazine and cell suspensions, the measuring system is adapted to the bioprocess. Different strategies of calibration procedures, which allow a direct conversion of the sensor signal into a cultivation basic value (optical density, cell dry weight, cell count), are presented. Furthermore, calibrations of typical representatives of prokaryotic and eukaryotic cultures as well as mycel-forming fungi are developed and validated. When using the calibration models, an automated multisensor system, which can replace offline sampling in a bioprocess, is available.

Keywords: online process monitoring, light scattering, optical density, biomass sensor, multisensor system, shake flask

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung.....	2
3	Theoretischer Teil.....	3
	3.1 Konventionelle Methoden zur Biomassebestimmung.....	3
	3.1.1 Bestimmung der Biotrockenmasse.....	4
	3.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	5
	3.1.3 Bestimmung der optischen Dichte	6
	3.2 Optische Sensoren für die Biomassebestimmung.....	6
	3.2.1 Biomassebestimmung mittels Eigenfluoreszenz.....	7
	3.2.2 Biomassebestimmung mittels Infrarot-Spektroskopie	8
	3.2.3 In-situ Mikroskopie.....	9
	3.2.4 Photometrische Sensoren.....	10
	3.3 Kommerziell erhältliche optische Sensoren.....	12
	3.4 Überwachung der Biomasse im Schüttelkolbenmaßstab	14
	3.4.1 Wechselwirkung von Licht und Materie.....	15
	3.4.2 Entwicklung eines automatisierten Streulichtensors für Schüttelkolbenkulturen.....	18
4	Experimenteller Teil.....	21
	4.1 Die Entwicklung des Messgeräts.....	21
	4.1.1 Funktionsweise des Sensors.....	23
	4.1.2 Die Flüssigkeitsbewegung im Kolben	25
	4.1.3 Einflussfaktoren auf den Messwert.....	28
	4.1.4 Verbesserungsbedarf im Streulichtsensor	32
	4.1.5 Einfluss des Abstands innerhalb der Optoelektronik	33
	4.1.6 Einfluss des Abstands zwischen Sensor und Schüttelkolben	35
	4.1.7 Schlussfolgerung und Vorstellung des Multisensorprototyps.....	38
	4.2 Charakterisierung des optimierten Messzyklus.....	40
	4.2.1 Automatische Anpassung des Messzyklus	41
	4.2.2 Einfluss der Viskosität auf die Streulichtmessung.....	48
	4.2.3 Streuverhalten geringer optischer Dichten.....	51
	4.2.4 Eindringtiefe des Lichts	57
	4.2.5 Einfluss unterschiedlicher Medien auf das Signalverhalten	61
	4.2.6 Schlussfolgerung zum optimalen Messzyklus des Streulichtensors	64

4.3	Prozessüberwachung mittels Streulicht	65
4.3.1	Übertragung der Technik auf den Bioprozess	65
4.3.2	Strategie bei der Kalibrationsbildung	68
4.3.3	Schäumende Kulturen	71
4.3.4	Schaumabhängige Kalibrationen	75
4.3.5	Schaumonabhängige Kalibrationen	78
4.3.6	Schlussfolgerung zum Einsatz des Streulichtensors im Bioprozess	85
4.4	Potential der neuen Sensortechnologie.....	85
4.4.1	Überwachung von Wachstumskurven mit zwei Kohlenstoffquellen	86
4.4.2	Kultivierungen im fed-batch-Betrieb	89
4.4.3	Detektion agglomerierter Zellen in Lösung	92
4.4.4	Schlussfolgerung zum Applikationsspektrum des Sensors	98
4.5	Alternative Methode zur schnellen Kalibrationserstellung	98
4.5.1	Kalibration durch sequenzielle Verdünnung.....	99
4.5.2	<u>Exkurs</u> : Einfluss von Kultivierungsmedien bei der Erstellung von Kalibrationen ...	103
4.5.3	Vergleich zwischen den Kalibrationsmethoden.....	103
4.5.4	Schlussfolgerung zu alternativen Kalibrationsmethoden	105
5	Zusammenfassung	106
6	Ausblick	109
7	Literatur	110
A	Theoretischer Teil.....	115
A1.1	Informationen zu optoelektronischen und optischen Komponenten im Streulichtsensor	115
B	Experimenteller Teil.....	119
B1.1	Rauschverhalten extremer Messbedingungen: Spezialfall.....	119
B1.2	Unterschiedliche Schüttelgeschwindigkeiten bei Abstandsvariation zwischen LED und Photodiode	124
B1.3	Einfluss von Sensorpatches auf die Messwertbildung	125
B1.4	Reproduzierbarkeit der Winkelabhängigkeit zum Streulichtwert	126
B1.5	Optimierte Einstellung des Beschleunigungssensors definierter Messparameter	127
B1.6	Einfluss von Glycerinkonzentration auf das Streulichtsignal	128
B1.7	Veränderung des Signalverhaltens bei Erhöhung des Volumens im Kolben	128
B1.8	Veränderung des Signalverhaltens durch Erhöhung der Gelöststoffkonzentration ..	129
B1.9	Einsatz des Beschleunigungssensors im mikrobiologischen Bereich	129
B1.10	Vergleich unterschiedlicher digitaler Filtermethoden.....	130
B1.11	Sägezahnbildung in verschiedenen Mikroorganismen.....	131
B1.12	Verhaltensähnlichkeiten in Kalibrationen mit Basisgröße OD ₆₀₀	133
B1.13	Verhaltensähnlichkeiten in Kalibrationen mit Basisgröße BTM	133
B1.14	Referenzkultivierung von <i>E. coli</i> K12 mit einer Kohlenstoffquelle	134

B1.15	Prozessüberwachung von <i>F. velutipes</i> mit eintretendem Zerfall der Mycelkugeln und Lysis.....	135
B1.16	Abhängigkeit des Sensorsignals von der Glucosekonzentration.....	135
B1.17	Verhalten unterschiedlicher Verdünnungsreihen bei sequenzieller Verdünnung	136
C	Methoden.....	137
C1	Messungen konstanter Suspensionen	137
C1.1	Messungen mit Kalibrationsstandard Formazin.....	137
C1.2	Messungen konstanter Zellsuspensionen	137
C2	Ausgewählte Mikroorganismen	138
C3	Mikrobiologische Methoden.....	138
C3.1	Vorkulturen von Bakterien	138
C3.2	Vorkulturen von Hefen	138
C3.3	Vorkulturen mycelbildender Kulturen	139
C3.4	Schüttelkolbenkultivierungen zur online-Überwachung.....	139
C4	Analytische Methoden	139
C4.1	Bestimmung der Zelldichte durch Trübungsmessung.....	139
C4.2	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	140
C4.3	Biomassegewinnung	140
C4.4	Bestimmung der Zellzahl.....	141
C4.5	Bestimmung der Glucosekonzentration	141
C5	Kalibrationsmethoden	141
C5.1	Konventionelle Kalibrationsmethode	141
C5.2	Kalibrationserstellung über sequenzielle Verdünnung	142
C6	Statistische Analysen.....	143
C6.1	Statistische Grundlagen	143
C6.2	Regressionsanalyse	144
C6.3	Validierung von Kalibrationen	144
C6.4	Verwendete Funktionen zur Kalibrationserstellung.....	145
D	Material	147
D1	Lösungen und Kulturmedien	147
D1.1	Herstellung einer Formazin-Standardlösung (ISO 7027).....	148
D2	Chemikalienliste	149
D3	Geräteliste	150
E	Kooperierende Arbeiten	152
F	Anhang: Lebenslauf	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Orientierungsmöglichkeiten des Detektors in Abhängigkeit zum eingestrahlten Licht durch die LED.	10
Abbildung 3.2: Signalverhalten unterschiedlicher Trübungssensoren in Abhängigkeit zur Zellkonzentration.	12
Abbildung 3.3: Auswahl unterschiedlicher optischer Sensoren für den biotechnologischen Bereich.	13
Abbildung 3.4: Verhalten von Licht bei Kontakt mit Streuzentren.....	15
Abbildung 3.5: Vergleich der Energien im Absorptions-/Emissionsprozess bei Kontakt zwischen elektromagnetischer Welle und einem Streuzentrum.....	16
Abbildung 3.6: Ablenkung elektromagnetischer Wellen durch den Streuvorgang.	16
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Streuverhaltens von Zellen.	18
Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau der Streulichtsensorik.....	19
Abbildung 4.1: Ausgangsmodell des Multisensorsystems.	22
Abbildung 4.2: Foto des provisorischen Prototyps zur Streulichtsensorik.....	23
Abbildung 4.3: Oszilloskopmessung bei der Entstehung eines Messwertes am Beispiel einer Formazinlösung.....	24
Abbildung 4.4: Darstellung nicht reproduzierbarer Verhalten bei der Messwertbildung hoher Schüttelfrequenzen.....	25
Abbildung 4.5: Messaufbau zur Beobachtung der Flüssigkeitsbewegung im Kolben durch Highspeed-Videoaufnahmen unterschiedlicher Formazinlösungen.	26
Abbildung 4.6: Aufsicht eines Schüttelkolbens. Blickwinkel der installierten Kamera zur Erfassung der Flüssigkeitsverteilung.	26
Abbildung 4.7: Bildauswertung des Highspeed-Videos von Formazin mit konstanten Messparametern.	27
Abbildung 4.8: Verlauf des Streulichtsignals mit Kalibrationsstandard Formazin unter definierten Messbedingungen.	28

Abbildung 4.9: Darstellung der Ausbildung der Flüssigkeitssichel in Abhängigkeit zur RPM.	29
Abbildung 4.10: Streulichtverhalten von Formazin bei Veränderung der Messparameter Füllvolumen (in %) und Schüttelfrequenz (in rpm).....	30
Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Vergrößerung der Beleuchtungsfläche mit fortschreitender Entfernung von der Lichtquelle.....	31
Abbildung 4.12: Darstellung des modifizierten Optikblocks zur Abstandsvariation zwischen den optoelektronischen Komponenten.....	34
Abbildung 4.13: Veränderung der Streulichtintensität bei Vergrößerung des Abstandes zwischen den optoelektronischen Komponenten.....	34
Abbildung 4.14: Skizze zur Neupositionierung der Streulichtsensorik relativ zum Schüttelkolben und den optoelektronischen Komponenten für pO ₂ und pH.....	36
Abbildung 4.15: Integration der neuen Sensorik in den Dreisensor-Prototyp.....	37
Abbildung 4.16: Beispielhafter Vergleich zwischen alter und neuer Position der Streulichtsensorik anhand von Formazin unter definierten Messparametern.....	38
Abbildung 4.17: Technische Zeichnung des Dreisensor-Prototyps zur quasi-simultanen Messung der optischen Messgrößen pO ₂ , pH und Streulicht.....	39
Abbildung 4.18: Lage der neu integrierten Messoptik relativ zu M3-Bohrlöchern für unterschiedliche Kolbenklammern im entwickelten Dreisensor-Prototyp.....	40
Abbildung 4.19: Oberfläche der Software zur Einstellung des integrierten G-Sensors.....	41
Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der Funktionsweise des variablen Messzyklus durch offset-Funktion der Messauslösung.....	42
Abbildung 4.21: Darstellung des Kolbenscreenings zur optimalen Einstellung des Triggerwinkels abhängig von unterschiedlichen Messparametern.....	43
Abbildung 4.22: Verhalten der Flüssigkeitsbewegung konstanter Schüttelfrequenz und variierender Kolbengröße/-art.....	44
Abbildung 4.23: Einfluss der Schüttelfrequenz und des Füllvolumens auf die Ausbildung der Sichelform und das maximale Amplitudensignal.....	45
Abbildung 4.24: Abhängigkeit des Signalverhaltens von der Kolbenart.....	46

Abbildung 4.25: Abhängigkeit der Anpassungsfunktionen vom Füllvolumen.	47
Abbildung 4.26: Amplitudenabhängigkeit vom Füllvolumen.	48
Abbildung 4.27: Einfluss der Viskosität auf die Anpassung der Messzeitregulierung ($OD_{600} = 2,0$)	50
Abbildung 4.28: Einfluss der Viskosität auf die Anpassung der Messzeitregulierung ($OD_{600} = 0$)	50
Abbildung 4.29: Abhängigkeit des Streulichtsignals vom Füllvolumen unterschiedlicher optischer Dichte am Beispiel von Formazin.	52
Abbildung 4.30: Theoretisches Verhalten von Streulichtmessung bei unterschiedlichen Trübungswerten.	53
Abbildung 4.31: Signalverhalten unterschiedlicher optischer Dichten bezogen auf den Triggerwinkel bei definierten Messbedingungen	54
Abbildung 4.32: Abhängigkeit des Triggerwinkels vom Suspensionsgrad der Lösung..	55
Abbildung 4.33: Verifizierung des Grenzflächeneinflusses auf das Messsignal.	56
Abbildung 4.34: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der Eindringtiefe in unterschiedlichen Suspensionslösungen.	57
Abbildung 4.35: Transmission in Abhängigkeit von der Distanz zwischen LED und PD bei Formazin.	58
Abbildung 4.36: Bestimmung der minimalen Flüssigkeitshöhe über dem Sensor in Abhängigkeit zur OD_{600}	60
Abbildung 4.37: Streulichtverhalten unterschiedlicher Kultivierungsmedien ohne Einfluss der Grenzfläche	62
Abbildung 4.38: Abhängigkeit der Grenzflächenreflexion von der Gelöststoffkonzentration unterschiedlicher Medien.	63
Abbildung 4.39: Exemplarische Darstellung der Prozessüberwachung von <i>E. coli</i> K12 in TB-Medium.	66
Abbildung 4.40: Digitale Datenfilterung der Streulichtwerte anhand einer Kultivierung von <i>E. coli</i> K12 in TB-Medium.	67

Abbildung 4.41: Einfluss der Probennahme auf einen kontinuierlichen Rückwärtsmedian.....	69
Abbildung 4.42: Grenzflächenreflexion in Abhängigkeit zum Zellwachstum.....	70
Abbildung 4.43: Prozessüberwachung von <i>E. coli</i> K12 in TB-Medium.....	71
Abbildung 4.44: Veränderung des Amplitudensignals nach offline-Probennahme bei <i>E. coli</i> K12.	72
Abbildung 4.45: Sägezahnverhalten bei unterschiedlichen Schüttelfrequenzen.	73
Abbildung 4.46: Sägezahnverhalten bei geringer Schüttelfrequenz.....	73
Abbildung 4.47: Signalveränderung durch Zugabe von Antischaummittel.	74
Abbildung 4.48: Kalibration des Sensorsignals verschiedener MO gegenüber der Basisgröße OD ₆₀₀	76
Abbildung 4.49: Kultivierung von <i>E. coli</i> K12 in TB-Medium unter Zugabe eines Antischaummittels.	79
Abbildung 4.50: Kalibrationen des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße OD ₆₀₀	80
Abbildung 4.51: Kalibrationen des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße BTM.	81
Abbildung 4.52: Kalibrationen des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße ZZ.	82
Abbildung 4.53: Einfluss der Substratlimitierung auf die Zellgröße am Beispiel von <i>P. pastoris</i>	83
Abbildung 4.54: Prozessüberwachung einer Kultivierung mit zwei Kohlenstoffquellen am Beispiel von <i>E. coli</i> K12.	87
Abbildung 4.55: Prozessüberwachung einer Kultivierung mit zwei Kohlenstoffquellen am Beispiel von <i>E. coli</i> K12 ohne Probennahmen.....	88
Abbildung 4.56: Schematischer Aufbau eines fed-batch-Betriebs für Schüttelkolben.	89
Abbildung 4.57: Prozessüberwachung einer fed-batch-Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab am Beispiel von <i>P. pastoris</i>	90

Abbildung 4.58: Validierung der vorhandenen Kalibration von <i>P. pastoris</i> mit Referenzwerten aus der fed-batch-Kultivierung.....	91
Abbildung 4.59: Darstellung von <i>F. velutipes</i> im Schüttelkolbenmaßstab.....	93
Abbildung 4.60: Prozessüberwachung von <i>A. niger</i> in FM-Medium.....	94
Abbildung 4.61: Kalibration zur Bestimmung der BTM von <i>A. niger</i> in FM-Medium (links).	94
Abbildung 4.62: Kalibration zwischen Glucosekonzentration und BTM für <i>F. velutipes</i> . Als Datengrundlage dienen zwei Parallelkultivierungen mit je 20 Schüttelkolben.....	96
Abbildung 4.63: Prozessüberwachung von <i>F. velutipes</i> in SNL-Medium unter Verwendung eines Ultra-Turrax [®] zur Homogenisierung und Einsatz hoher Initialkonzentration an Glucose.	97
Abbildung 4.64: Schematische Darstellung der Kalibration mittels sequenzieller Verdünnung.....	100
Abbildung 4.65: Kalibration des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße OD ₆₀₀	100
Abbildung 4.66: Kalibration des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße BTM.	102
Abbildung 4.67: Vergleich des Sensorsignals mit OD ₆₀₀ (links) und BTM (rechts) von <i>E. coli</i> K12 aus unterschiedlichen Kultivierungsmedien.....	103
Abbildung 4.68: Gegenüberstellung und Vergleich unterschiedlicher Kalibrationsmethoden am Beispiel von <i>P. pastoris</i>	105
Abbildung A.1: Beispielhaftes Emissionsspektrum einer LED mit $\lambda = 630$ nm.....	116
Abbildung A.2: Vergleich der Strahlungsleistung unterschiedlicher LED für den Betrieb in einem nephelometrischen Sensor.....	117
Abbildung A.3: Photosensitivität des integrierten Detektors.	118
Abbildung A.4: Darstellung des Transmissionsspektrums der in den SFR integrierten Filterkombination.....	118
Abbildung B.1: Darstellung der prozentualen Abweichung in Intensitätsmessungen von Formazin mit unterschiedlichen Messbedingungen.....	119

Abbildung B.2: Schematische Darstellung der Ausschöpfung des maximal möglichen Potentials an Streulicht bezogen auf extreme Messbedingungen.	120
Abbildung B.3: Einfluss von im Schüttelkolben integrierten Sensorpatches und Schikanen auf Intensitätsmessungen nach Neupositionierung	125
Abbildung B.4: Reproduzierbarkeit der experimentellen Reihe zur Findung des optimalen Triggerwinkels.	126
Abbildung B.5: Amplitudenverhalten bei zunehmender Glycerinkonzentration.....	128
Abbildung B.6: Intensitätsmessung der Streulichtmessungen von Wasser.	128
Abbildung B.7: Abhängigkeit zwischen Gelöststoffkonzentration und Amplitudensignal des Sensors.	129
Abbildung B.8: Verbesserung des Amplitudensignals durch Verwendung des optimalen Triggerwinkels.	129
Abbildung B.9: Vergleich unterschiedlicher digitaler Filtermethoden am Beispiel einer Prozessüberwachung von <i>E. coli</i> K12.....	130
Abbildung B.10: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von <i>L. zeae</i>).	131
Abbildung B.11: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von <i>S. cerevisiae</i>).	131
Abbildung B.12: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von <i>K. marxianus</i>).	132
Abbildung B.13: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von <i>P. pastoris</i>).	132
Abbildung B.14: Prozessüberwachung bei <i>E. coli</i> K12 in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle.	134
Abbildung B.15: Gesamtüberblick über Prozessüberwachung mycelbildender Kulturen am Beispiel von <i>F. velutipes</i>	135
Abbildung B.16: Kalibration zwischen dem Streulichtsignal und der Glucosekonzentration am Beispiel von <i>F. velutipes</i> in SNL-Medium.	135
Abbildung B.17: Verhalten unterschiedlicher Verdünnungsmedien bei der Kalibrationserstellung mittels sequenzieller Verdünnungen.	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Eigenschaften optischer Sensoren für den Einsatz im Bioprozess.....	7
Tabelle 3.2:	Überblick möglicher Einflussfaktoren einer 180°-Streulichtmessung im Bioprozess.....	20
Tabelle 4.1:	Streuverhalten einer Suspension in Abhängigkeit von Füllvolumen und Schüttelfrequenz am Beispiel einer unverdünnten Formazinlösung.....	31
Tabelle 4.2:	Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit auf die Kreisbewegung der Flüssigkeit während einer Messung.....	33
Tabelle 4.3:	Anpassungsfunktionen optimaler Triggerwinkel (verallgemeinert auf Füllvolumen).....	47
Tabelle 4.4:	Einfluss der Viskosität auf das max. Amplitudensignal bei OD ₆₀₀ 2,0.....	49
Tabelle 4.5:	Einfluss der Viskosität auf das max. Amplitudensignal bei OD ₆₀₀ 0.....	51
Tabelle 4.6:	Eindringtiefen und Mindestflüssigkeitshöhe von Formazin und Zellsuspensionen bei unterschiedlichen optischen Dichten.....	60
Tabelle 4.7:	Einfluss der Wachstumsphase bei Vergleich der Amplitudensignale in Abhängigkeit unterschiedlicher Medianwerte.....	69
Tabelle 4.8:	Versuchsreihe zum Nachweis des Einflusses von Schaum auf die optischen Signale des Streulichtensors.....	75
Tabelle 4.9:	Kultivierungsbedingungen der untersuchten Mikroorganismen (Schäumende Kulturen).....	76
Tabelle 4.10:	Minimal- und Nachweisgrenzen von Basisgröße OD ₆₀₀ bei schaumabhängigen Kalibrationen.....	77
Tabelle 4.11:	Ergebnisse schaumabhängiger Kalibrationsmodelle.....	78
Tabelle 4.12:	Kultivierungsbedingungen der untersuchten Mikroorganismen (schaunabhängig).....	80
Tabelle 4.13:	Nachweisgrenzen der Basisgrößen OD ₆₀₀ , BTM und ZZ schaumunabhängiger Kalibrationen.....	84

Tabelle 4.14:	Ergebnisse schaumunabhängiger Kalibrationsmodelle für Basisgröße OD ₆₀₀ , BTM und ZZ.	84
Tabelle 4.15:	Messbedingungen von Kulturen mycelbildender MO.	93
Tabelle 4.16:	Validierungsergebnisse der der Pilzkulturen <i>F. velutipes</i> und <i>A. niger</i> .97	
Tabelle 4.17:	Übertragbarkeit der Kalibrationen innerhalb einer Gruppe.....	101
Tabelle A.1:	Kenngößen ausgewählter LED.	117
Tabelle B.1:	Einfluss des Streulichts von konstanten Messparametern (500 mL Kolbengröße).	121
Tabelle B.2:	Einfluss des Streulichts von konstanten Messparametern (250 mL Kolbengröße).	122
Tabelle B.3:	Einfluss des Streulichts von konstanten Messparametern (125 mL Kolbengröße).	123
Tabelle B.4:	Veränderung der Streulichtintensität bei Vergrößerung des Abstands zwischen den optoelektronischen Komponenten.....	124
Tabelle B.5:	Anpassungsfunktionen der Triggerwinkel definierter Messparameter.127	
Tabelle B.6:	Vergleich schaumunabhängiger Kalibrationen für Basisgröße OD ₆₀₀ .133	
Tabelle B.7:	Vergleich schaumunabhängiger Kalibrationen für Basisgröße BTM. 133	
Tabelle C.1:	Variierende Messparameter bei Messungen konstanter Trübungen. Alle Messungen wurden auf demselben Kreisschüttler durchgeführt.	137
Tabelle C.2:	Zusammenfassung verwendeter Mikroorganismen.....	138
Tabelle C.3:	Anpassungsfunktionen für schaumabhängige Kultivierungen mit Parametern.	145
Tabelle C.4:	Anpassungsfunktionen für schaumunabhängige Kultivierungen mit Parametern (OD ₆₀₀).	146
Tabelle C.5:	Anpassungsfunktionen für schaumunabhängige Kultivierungen mit Parametern (BTM).	146
Tabelle C.6:	Anpassungsfunktionen für schaumunabhängige Kultivierungen mit Parametern (ZZ).	146

Tabelle C.7:	Anpassungsfunktionen für mycelbildende Kulturen mit Parametern (BTM).	146
Tabelle D.1:	Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien.	147
Tabelle D.2:	Zusammensetzung der Vitamin-Stammlösung für MRS-Medium.....	148
Tabelle D.3:	Zusammensetzung der Spurenelement-Lösung für SNL-Medium.....	148
Tabelle D.4:	Liste aller in der vorgestellten Arbeit verwendeten Chemikalien.	149
Tabelle D.5:	Liste aller in der vorgestellten Arbeit verwendeten Geräte und Materialien.	150
Tabelle E.1:	Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt.	152

Symbolverzeichnis

a.u. / AU	<i>engl.</i> amplitude unit [mV]
c	Konzentration [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]
d	Durchmesser [mm]
δ	Triggerwinkel [$^{\circ}$]
η	dynamische Viskosität [$\text{mPa} \cdot \text{s}$]
ε_{λ}	Extinktionskoeffizient, bei $\lambda = x \text{ nm}$ [$\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$]
E_{A}	Aktivierungsenergie [J]
f bzw. ν	Frequenz [s^{-1}]
h	Plancksches Wirkungsquantum [$\text{J} \cdot \text{s}$]
I	Lichtstärke [cd]
λ	Wellenlänge [nm]
μ	Wachstumsrate [h^{-1}]
n	Brechungsindex [/] oder Anzahl der Messwerte [/]
Ω	Abstrahlwinkel [sr]
Φ	Lichtstrom [lm]
r	Radius [mm]
R^2	Lineares Bestimmtheitsmaß [/]
R_{s}	Substrataufnahmerate [h^{-1}]
σ	Standardabweichung [variabel]
τ	Transmissionsgrad [/]
T	Temperatur [$^{\circ} \text{C}$]
t_{D}	Verdopplungszeit [min]
t_{x}	Messdauer [ms]
Θ	Streuwinkel [$^{\circ}$] oder Strahlungsleistung [W]
V	Varianz [/]
\bar{x}	Mittelwert [variabel]
χ^2	Chi-Quadrat-Fehler [/]

Abkürzungsverzeichnis

2D/3D	Zwei-/Dreidimensional
ATR	<i>engl.</i> attenuated total reflection
BTM	Biotrockenmasse
ca.	<i>lat.</i> circa
CCD	<i>engl.</i> charge coupled device
CIP	<i>engl.</i> clean in place
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	<i>lat.</i> et alii
FDA	US Food & Drug Administration
FIA	<i>engl.</i> flow injection analysis
FM	<i>engl.</i> fungal mycelium
FQS	Fehlerquadratsumme
gem.	gemäß
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
G-Sensor	Gravitationsensor
i.d.R.	in der Regel
IR	Infrarot
ISM	In-situ Mikroskop
LB	<i>engl.</i> lysogeny broth
LED	<i>engl.</i> light-emitting diode
LOD	<i>engl.</i> limit of detection
M	Messwert
M3-Bohrlöcher	metrisches ISO-Gewinde (ISO 1502/EN 20273) nach DIN 13-1
max.	maximal
min.	minimal
mind.	mindestens
MM	Minimalmedium
MIR	<i>engl.</i> mid infrared (1.100 – 2.500 nm)
MO	Mikroorganismus
MRS	deMan, Rogosa, Sharpe (Erfinder dieses Nährmediums)
NAD(P)H	Coenzym II
NB	<i>engl.</i> no baffled
NIR	<i>engl.</i> near infrared (780 – 1.100 nm)

OD_x	Optische Dichte, bei $\lambda = x$ nm
o.g.	oben genannt
opt.	optisch
PAT	<i>engl.</i> process analytical technology
PC	Polycarbonat
PCA	<i>engl.</i> principal component analysis
PD	Photodiode
pH	<i>lat.</i> Potentia Hydrogenii
PLS	<i>engl.</i> partial least square
PN	Probennahme
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
rel.	<i>engl.</i> relative
RMSEP	<i>engl.</i> root mean square error of prediction
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	<i>engl.</i> rounds per minute
RT	Raumtemperatur (~25 °C)
SFR	<i>engl.</i> Shake Flask Reader
SIP	<i>engl.</i> sterilization in place
SP	Sensorpatch
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
sog.	so genannt
TB	<i>engl.</i> terrific broth
U	Umdrehung (Kreisbewegung)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WB	<i>engl.</i> with baffled
x-Schicht	Begriff elektrischer Bauelemente x = p (positiv), n (negativ), i (intrinsisch)
YM	<i>engl.</i> yeast mold
z.B.	zum Beispiel
ZIM	Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand
ZZ	Zellzahl (auch: Zellzahlkonzentration)

1 Einleitung

In unserer hochentwickelten und technologisierten Welt wird die Menschheit mit immer neuen Krankheitsbildern unterschiedlicher Herkunft konfrontiert. Für die Pharmaindustrie ist es daher besonders wichtig, stets neue Wirkstoffe zu entwickeln. Leider benötigt die Erforschung neuer Erreger und deren Bekämpfung in der Regel immer noch zu viel Zeit und Personal. Die Erwartungshaltung der Gesellschaft im 21. Jahrhundert ist, dass hierfür immer schnellere und bessere Lösungen zur Vermeidung und Heilung von Krankheiten entwickelt und gefunden werden. Aufgrund der steigenden Nachfrage an fortlaufend neuen Arzneimitteln werden seit vielen Jahren systematisch Mittel und Wege gesucht, den Entwicklungs- und Herstellungsprozess von medizinisch-pharmazeutischen Produkten zu verkürzen und eine gleichbleibende Produktqualität sicherzustellen.

Hierbei spielt die Bioprozessanalytik eine wichtige Rolle. Sie dient der Generierung von Informationen über den Zustand biologischer Zellkulturen. Oft werden nur geringe Mengen eines Wirkstoffs durch Zellen produziert, wie z.B. bei der Herstellung von Antikörpern. Die Steuerung wichtiger Prozessgrößen, wie Sauerstoffkonzentration und pH-Wert, kann zu einer Verbesserung der Kulturbedingungen führen und somit das Wachstum der Zellen erhöhen. Um Informationen über die tatsächliche Auswirkung einer Prozessoptimierung zu bekommen, ist die Biomassekonzentration von besonderer Bedeutung. Sie gibt Auskunft über die Menge an Zellen, die für die Produktion wichtiger Wirkstoffe zur Verfügung steht. Zur Prozess- und Medienoptimierung werden Bioprosesse vor der Überführung in große Reaktoren in kleinen Maßstäben durchgeführt. Kultivierungen in Schüttelkolben bieten hier ein großes Potential, da in Screenings schnell neue Prozessführungen entwickelt und evaluiert werden können. In Schüttelkolben besteht jedoch ein Platzproblem für eine kontinuierliche Prozessüberwachung. Zusätzlich ist zur Analyse der Biomassekonzentration stets die Entnahme eines Probenvolumens mit manueller Bestimmung notwendig.

Um biologische Prozesse im Schüttelkolben dennoch zu verfolgen, muss ein Konzept für ein Messgerät entwickelt werden, in dem alle Messfühler möglichst kompakt untergebracht sind. Besonders geeignet ist der Einsatz optischer Sensoren, da sie kontaktfrei arbeiten und kein direkter Eingriff ins Biosystem notwendig ist. Der Grundansatz dieser Arbeit ist deshalb, aufbauend auf einem bereits vorhandenen Messsystem für die optische Messung von Sauerstoffkonzentration und pH-Wert, einen optischen Sensor zu etablieren, der in Schüttelkolbenkulturen über die Messung von Lichtstreuung in Zellsuspensionen reproduzierbar die Biomasse messen kann. Dadurch werden zu jedem Zeitpunkt Informationen zur Wachstumsphase von Zellen zugänglich.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll der Prototyp für ein nicht-invasives, optisches Analysesystem für Schüttelkolben entwickelt werden, das über die Detektion von Streulicht die Biomassekonzentration kontinuierlich während einer Kultivierung überwachen kann.

Der Sensor besitzt einen Streuwinkel von 180° , so dass für den Schüttelbetrieb eine Anpassung des Messzyklus an die Fluidbewegung im Kolben erfolgen muss. Im Speziellen werden hierzu die Messwertbildung und mögliche Einflussfaktoren näher untersucht, die bei einem konstanten Messintervall zu einer schwankenden Messzonenhöhe führen können. Über die genaue Kenntnis der Abhängigkeit der Fluidbewegung von konstanten Messparametern, wie z.B. Schüttelfrequenz, Kolbengröße, -art und Füllvolumen, soll die Verteilung der Flüssigkeit im Kolben charakterisiert werden. Ziel ist es, durch Einflussnahme auf die Messauslösung des Sensors im kontinuierlichen Betrieb eine konstante Flüssigkeitshöhe über der Sensoreinheit zum Zeitpunkt der Messung zu erhalten.

Nach Integration des Sensormoduls in eine Multisensorplattform soll die Evaluierung des Streulichtensors für konstante Trübungslösungen im Schüttelbetrieb erfolgen. Hierbei werden weitere Faktoren untersucht, die das optische Streulichtverhalten trotz konstanter Messzone verändern können (Viskosität, Überlagerung des Streulichts durch Reflexionen, Eindringtiefe des Lichts in unterschiedliche Suspensionen). Anschließend wird das Applikationsspektrum auf Kultivierungen ausgewählter Mikroorganismen erweitert. Es sollen Kalibrationsmodelle erstellt werden, durch die das Sensorsignal in bekannte Kultivierungsbasisgrößen (OD_{600} , BTM, Zellzahl) umgewandelt werden kann. Um den Vorgang dieser Kalibrationsbildung zu verkürzen, wird eine Alternative zur konventionellen Kalibrationsmethode entwickelt und beide Methoden miteinander verglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll das große Potential der Streulichtsensorik für eine kontinuierliche, automatisierte Prozessüberwachung von Mikroorganismen in Schüttelkolben vorgestellt werden. Die hohe Sensitivität und die große Anwendbarkeit dieses optischen Sensors für den biotechnologischen Bereich soll an ausgewählten Beispieltkultivierungen verdeutlicht werden.

3 Theoretischer Teil

Seit einigen Jahren ist in der biotechnologischen Forschung und Industrie ein stetig wachsendes Interesse an Überwachungen von Bioprocessen zu beobachten. Aufgrund der steigenden Nachfrage wichtiger Arzneimittel wird gezielt nach Lösungen gesucht, die Expression rekombinanter Proteine, z.B. die Produktion von Insulin, zu steigern. Eine verbesserte Prozessführung durch Optimierung relevanter Prozessparameter führt zu einer größeren Ausbeute, zu einer höheren Produktivität und kann den Zeitraum zwischen Prozessentwicklung und -einführung stark verkürzen [1]. 2004 veröffentlichte die US Food & Drug Administration (FDA) mit der Process Analytical Technology (PAT) eine Richtlinie, um zukünftige Entwicklungen und Produktionen biopharmazeutischer Produkte in gleichbleibend hoher Qualität sicherzustellen [2]. Der Grundgedanke hierbei ist, durch eine real-time Überwachung der Prozesse die ablaufenden Vorgänge besser zu verstehen und hierdurch einen kontrollierten Eingriff in den Bioprozess zu ermöglichen [3, 4]. In den letzten Jahren konnten zahlreiche moderne Messtechniken entwickelt werden, die zu einer kontinuierlichen Überwachung von relevanten Prozessparametern führte [5]. Dieser Informationsgewinn kann gemäß PAT genutzt werden, um durch eine direkte Prozesskontrolle eine weitere Optimierung zu erreichen. Die Biomasse beschreibt hierfür eine der wichtigsten biologischen Größen, da sie direkt mit der Produktivität verbunden ist und zur Bewertung des Zellzustands verwendet werden kann [6, 7].

In den folgenden Abschnitten wird die theoretische Basis zur Biomassemessung für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente geschaffen. Nach einem allgemeinen Überblick über die herkömmliche Bestimmung der Biomassekonzentration, werden konventionelle Methoden neuen Techniken gegenübergestellt, um den Vorteil optischer Sensoren für automatisierte Prozessleitsysteme für dieses Einsatzgebiet zu verdeutlichen. Anschließend wird der Fokus auf photometrische Sensoren gesetzt. Darauf folgen die physikalische Beschreibung des Streulichtvorgangs und die Vorstellung des in dieser Arbeit vorgestellten Messprinzips für den Schüttelkolbenmaßstab.

3.1 Konventionelle Methoden zur Biomassebestimmung

Der Begriff Biomasse beschreibt die Masse bzw. Menge an Mikroorganismen (MO) in einem definierten Volumen. Aus ihr ergeben sich zwei präzisere Bezeichnungen (Zelldichte und Zellkonzentration), die gleichbedeutend sind [6]. Nachstehend werden

die klassischen analytischen Methoden zur Bestimmung der Biomasse vorgestellt. Es handelt sich um offline-Analytiken, die einen Eingriff ins System erforderlich machen. Hierdurch besteht immer ein Kontaminationsrisiko des Nährmediums. Außerdem sind Analysen meist mit einem hohen Personal- und Zeitaufwand verbunden [8, 9]. Für eine PAT gemäß FDA [2] sind derartige Methoden nicht geeignet, da die Informationen für eine Prozesskontrolle zu spät erhalten werden.

3.1.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Der klassische Weg, um Informationen über die Biomasse zu erhalten, erfolgt über die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) eines definierten Kulturvolumens mit Hilfe von Separations-, Wasch- und Trocknungsvorgängen. Sie ist eine bewährte Methode, um gesichert Auskunft über gebildete Zellmasse in einem Bioprozess zu erhalten. Ist die Trockenmasse des untersuchten Volumens bekannt, kann über simple Kalkulation die produzierte Biomasse des absoluten Kulturvolumens berechnet werden [10]. Voraussetzung ist hierfür lediglich, dass die entnommene offline-Probe einer statistischen Verteilung der Zellen in Lösung folgt.

Das Abtrennen der Zellmasse vom Medium kann über Filtration oder Zentrifugation erreicht werden. Die erste Methode ist hierbei kostenintensiver, da die verwendeten Filter meist nicht wiederverwendet werden können. Der Trennungsvorgang kann jedoch schneller durchgeführt werden und es ist für eine reproduzierbare Bestimmung weniger Probenvolumen notwendig [11]. Die günstigere Variante benötigt mehr Volumen, um signifikante Messwerte zu erhalten. Da sich die Biotrockenmasse aus der Differenz des Reaktionsbehälters mit und ohne Zellen ergibt, kann das große Leergewicht bei kleinen Volumina zu höheren relativen Fehlern führen (z.B. durch Gerätefehler der Waage). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Wasser an der Oberfläche des Behälters adsorbiert und sich somit ein messbar erhöhtes Leergewicht ergibt [10]. Um diesem vorzubeugen, müssen tarierte Reaktionsgefäße vor Verwendung vorgetrocknet werden. Durch wiederholtes Waschen der separierten Zellen mit Kochsalzlösung lassen sich schwerlösliche Substanzen herauslösen. Durch den anschließenden Trocknungsvorgang bei 105 °C werden leicht flüchtige Substanzen entfernt und die Zellmasse dehydratisiert. In Ausnahmefällen kann durch das Ausheizen der Reaktionsgefäße ein Gewichtsverlust entstehen, da der Zerfall biologischer Substanzen gefördert wird [12]. Die direkte Umwandlung in eine online-Methode ist nicht möglich [1]. Weiterhin führen geringe Volumina zu hohen Messfehlern [5]. Wurden während der Fermentation unlösliche, nicht flüchtige Substanzen im Medium verwendet, ist die Bestimmung der Biomasse über das Trockengewicht nicht sinnvoll.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Eine weitere Standardmethode zur Bestimmung der Biomasse besteht in der Erfassung der Zellzahl (ZZ) pro Volumen durch lichtmikroskopische Analyse. Hierzu wird der Kultur ein geringes Volumen durch Probennahme entnommen und auf eine Zählkammer (z.B. nach Neubauer) aufgetragen. Die Zählkammer besteht im Gegensatz zu Objektträgern aus zwei Ebenen, die mit einem Deckgläschen ein definiertes Volumen einfassen. In Abhängigkeit zur Kammerhöhe entstehen somit unterschiedlich berechenbare Volumina.

Doppelzellen und Zellcluster erhöhen die Schwierigkeit einer exakten Detektion, so dass vor dem Zählvorgang eine Entmischung, z.B. durch Ultraschallbehandlung [13] oder Verwendung eines Vortexers, erfolgen muss [6, 14]. Des Weiteren führen hohe Zellzahlkonzentrationen zu notwendigen Verdünnungsschritten, die eine mögliche Fehlerquelle darstellen. Steht durch eine ausreichende Verdünnung ein auszählbares Volumen zur Verfügung, ist das manuelle Auszählen am Mikroskop die einfachste Methode der Erfassung der Zellzahl. Geschultes Personal ermöglicht aus der Zellzahlbestimmung eine sehr präzise Bestimmung der Biomasse, da die Anzahl der Zellen in direktem Zusammenhang zur Biomassekonzentration steht [6]. Erhöhte Zellmigration kann durch das Auszählen von Einzelbildern kompensiert werden. Es existieren seit vielen Jahren unterschiedliche Auswertehilfen. Eine einfache Methode besteht in der Verwendung des Coulter-Counters. Es handelt sich um ein elektronisches Zählgerät, das die Widerstandsänderung einer Elektrolytlösung durch Anwesenheit von Zellen detektiert. Die Widerstandsänderung ist hierbei proportional zum Partikelvolumen [15, 16]. Weiterhin existieren unterschiedliche Auswertelgorithmen, die Mikroskopaufnahmen analysieren können. Spezielle Algorithmen sind ebenfalls in der Lage Doppelzellen und Zellcluster zu unterscheiden [17 - 21].

Der größte Vorteil der Zellzahlbestimmung besteht in der Möglichkeit unter Verwendung von Metylenblau oder Trypanblau einen Unterschied zwischen lebendigen und toten Zellen machen zu können [10, 11]. Beide Farbstoffe werden von intakten Zellen nicht aufgenommen, so dass sie ungefärbt im Medium verbleiben. Abgestorbene Zellen, die eine perforierte Membran besitzen, werden durch die Zugabe dieses Farbstoffs eingefärbt, so dass neben der Gesamtzellzahl auch die Zellviabilität bestimmt werden kann. Ähnlich wie bei der Bestimmung der BTM handelt es sich um eine sehr zeitaufwändige Methode, die für eine hohe Messgenauigkeit geschultes Personal erfordert.

3.1.3 Bestimmung der optischen Dichte

Um schnell und möglichst einfach Auskunft über die Biomassekonzentration zu erhalten, kann die Messung der optischen Dichte (OD) einer offline-Probe erfolgen[22]. Eine Trübung ist definiert als Verringerung der Transparenz einer Flüssigkeit durch ungelöste Substanzen in einem Medium [21]. Die Abschwächung des eingestrahnten Lichts wird als Extinktion bezeichnet, womit der negative dekadische Logarithmus des Transmissionsgrades τ beschrieben wird. Im Allgemeinen bezeichnet die Extinktion E_λ die Summe der physikalischen Vorgänge Absorption, Streuung, Beugung und Reflexion. Sie folgen in ihrer Gesamtheit dem LAMBERT-BEERSCHEN Gesetz:

$$E_\lambda = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad \text{mit} \quad \tau_\lambda = \frac{I_1}{I_0} \quad (3.1)$$

aus

$$I_1 = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot d} \quad (3.2)$$

Hierbei beschreibt Gleichung 3.2 die Intensitätsabnahme des emittierten Lichts beim Durchdringen einer definierten Strecke d einer Suspension der Konzentration c und einem wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten ε_λ . Das Gesetz gilt streng genommen nur für monochromatisches Licht. Offline-Messungen der optischen Dichte sind somit immer auf eine definierte Wellenlänge beschränkt. Bei der Wahl der Wellenlänge muss darauf geachtet werden, dass innerhalb der Zellsuspensionen keine Beeinflussung durch Medienbestandteile (Anregung der Fluoreszenzeigenschaft) oder durch Lichtabsorption gebildeter Produkte (z.B. Chlorophyll bei Mikroalgen) besteht. Da bei hoher Partikelkonzentration eine gegenseitige Abschirmung der Zellen eintritt und sich hierdurch das Verhältnis zwischen den physikalischen Vorgängen Transmission (abnehmend) und Lichtstreuung (zunehmend) verändert, ist kein lineares Verhalten zur Biomassekonzentration mehr zu beobachten [23, 24]. Um den linearen Zusammenhang zu bewahren, werden offline-Proben in der Laborpraxis ab einer $OD_{600} > 0,5$ verdünnt [10, 23]. Trotz der kurzen Analysezeit dieser photometrischen Methode besteht durch die offline-Probennahme immer ein Kontaminationsrisiko für den Kultivierungsprozess. Optische Sensoren bieten jedoch eine Reihe von Vorteilen, die in automatisierten Messungen großes Potential bieten [25, 26].

3.2 Optische Sensoren für die Biomassebestimmung

Es existieren viele unterschiedliche Sensoren zur Bestimmung der Biomasse. Sie lassen sich in Kategorien unterteilen (akustisch, elektrisch, optisch). Allen ist gemein, dass es

sich um Methoden handelt, die nach einer Kalibration mit einem entsprechenden Referenzwert Informationen zur Biomassekonzentration geben. Hierfür wird meist die Biotrockenmasse (BTM) verwendet. Es sind jedoch auch Kalibrationen mit der Zellzahl (ZZ) sowie der optischen Dichte (OD) möglich [1, 27].

Um die Zielsetzung zu verfolgen, wird der Fokus nachstehend auf optische Sensoren gelegt. Optische Sensoren sind prädestiniert für den Einsatz in der Bioprozessüberwachung, da Messungen sehr sensitiv und schnell durchführbar sind. Eine kontinuierliche Messung und somit eine real-time Überwachung des betrachteten Prozesses ist möglich. Die wichtigsten Eigenschaften optischer Sensoren sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Eigenschaften optischer Sensoren für den Einsatz im Bioprozess.

Eigenschaft		Auswirkung
Hohe Präzision, Messempfindlichkeit	⇒	Qualitative und quantitative Messung Unterscheidung ähnlicher Analyten
Schnelligkeit der Messung	⇒	Kurze Ansprechzeit des Sensors Keine Beeinflussung der Sensoren untereinander Simultane Messung mehrerer Prozessparameter
Kontaktfreie Messung (nichtinvasiv, zerstörungsfrei)	⇒	Keine Probennahme notwendig (reduziertes Kontaminationsrisiko) Kein Verbrauch des Analyten Online-fähig (in situ-Einsatz möglich)
Einfaches Messprinzip	⇒	Direkte Messung der Prozessparameter Keine zeitaufwändige Probenvorbereitung Für Messung i.d.R. keine Additive notwendig
Robustheit des Sensors	⇒	Praktisch wartungsfreier Einsatz (kein Verschleiß) Kontinuierlichen Betrieb möglich
Vielseitigkeit des Sensors	⇒	Intra- und extrazelluläre Messung möglich (keine Beeinflussung der Zellaktivität) Chemische und physikalische Parameter messbar
Mögliche Auslagerung der Elektronik	⇒	Ermöglicht Miniaturisierung des Sensors Keine Sterilisation notwendig

3.2.1 Biomassebestimmung mittels Eigenfluoreszenz

Durch die Bestimmung der Eigenfluoreszenz können Zellkomponenten verschiedener Mikroorganismen spektroskopisch analysiert werden. Der wohl bekannteste Sensor dieser Art misst die Fluoreszenzaktivität von NAD(P)H intrazellulär bei einer Exzitation von 366 nm und einer Emission von 450 - 460 nm [8, 25]. Bereits 1978 entdeckten Zabriskie et al. [28], dass zwischen der Fluoreszenzaktivität bestimmter Zellkomponenten und der Biomassekonzentration ein linearer Zusammenhang besteht, der eine Quantifizierung der Biomasse zulässt [1, 29]. Die Grundlage dieser Annahme ist, dass sich die Konzentration des Coenzym NAD(P)H während einer Kultivierung nicht verändert und dass die Anregung der untersuchten Zellkomponenten proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist [30]. Der große Vorteil gegenüber anderen optischen

Sensoren ist, dass zusätzlich die Möglichkeit zur Quantifizierung der Zellviabilität entsteht [20]. Mit Hilfe eines 2D-Fluoreszenzspektrometers (z.B. Bioview) können neben biomasserelevanter Messung weitere Informationen, z.B. zu intra- und extrazellulären Proteinen, simultan erhalten werden [29]. Dafür ist ein kontinuierliches Screening über mehrere Wellenlängen notwendig (Exzitation: 280 – 290 nm, Emission: 270 – 550 nm), das zu Überlappungen mehrerer Spektren führen kann, die eine multivariate Datenauswertung notwendig macht [26]. Der größte Nachteil dieser online-Methode ist, dass sie durch abiotische Faktoren stark beeinflusst wird [20]. Außerdem können andere fluoreszenzaktive Substanzen im Medium die Signalintensität beeinträchtigen [11].

3.2.2 Biomassebestimmung mittels Infrarot-Spektroskopie

Das Infrarot-Verfahren (IR-Verfahren) ist eine klassische Methode, über chemische Zusammenhänge einen Prozess zu analysieren. Mit Hilfe chemometrischer Auswertemethoden ist eine Bestimmung der Biomassekonzentration des Analyten möglich. Der Vorteil der IR-Spektroskopie gegenüber anderen optischen Methoden ist, dass durch das Analyseverfahren simultane Zusatzinformationen zu weiteren organischen Substanzen wie z.B. Glucose, Lactat oder Glutamat bereitgestellt werden [25, 26].

IR-Verfahren werden abhängig zum untersuchenden Wellenlängenbereich eingeteilt. Es wird zwischen NIR (near infrared) und MIR (mid infrared) unterschieden. NIR-Messverfahren arbeiten zwischen 780 – 1.100 nm [7]. In diesem Messbereich dominieren Obertonschwingungen der Kombinationen von CH-, NH- und OH-Gruppen. Über diesem Messbereich (1.100 nm – ca. 25 µm) wird von MIR-Spektroskopie gesprochen.

Beide Messverfahren beruhen auf dem Absorptionsverhalten eingestrahlt Lichts in ein Medium (mit Laser oder LED). Hierbei ist die Verwendung von Lichtwellenleitern üblich. Die Detektion erfolgt beim NIR-Verfahren durch Messung des transmittierenden Lichts bzw. des diffus gestreuten Lichts, wobei mit Streulichtmessungen ein größerer linearer Bereich untersucht werden kann [31]. MIR-Verfahren nutzen die ATR-Technologie (attenuated total reflection), da in diesem Bereich Wasser stark absorbiert [32].

Im Allgemeinen ist die spektroskopische Untersuchung eines Analyten sehr sensitiv und abhängig von den Kultivierungsbedingungen. Die Messung wird zusätzlich von Zellmorphologie und Zelltypen beeinflusst [31]. Für jede chemische Struktur existieren definierte Absorptionsverhalten, so dass mit vorab durchgeführten Filterprozessen (z.B. Basislinienkorrektur) Informationen über alle organischen Substanzen erhalten werden [25, 26]. Die Bestimmung der Biomassekonzentration ergibt sich aus der Auswertung

der Spektren des NIR-Bereichs mit Hilfe multivariater Datenanalyse (PCA, principal component analysis; PLS, partial least squares) [25]. Hierzu müssen Kalibrationsmodelle mit konventionellen offline-Referenzgrößen erstellt werden, die auf die jeweiligen Kultivierungsbedingungen abgestimmt sind. Die Bestimmung der Biomasse über MIR kann nur indirekt über den Nährstoffverbrauch von Substraten oder anderen Metaboliten erfolgen [32]. Beide Varianten stehen als online-, atline- und offline-Verfahren zur Verfügung.

3.2.3 In-situ Mikroskopie

Eine der derzeit effektivsten online-Methoden zur Bestimmung der Zellkonzentration bietet die in-situ Mikroskopie (ISM). Über einen standardisierten Ingold[®]-Port wird ein Mikroskop in den Bioreaktor integriert. Die Sterilisation des ISM erfolgt hierbei entweder über SIP (sterilization in place) oder durch Autoklavieren [33].

Das Messprinzip beruht auf der Analyse kontinuierlich erstellter Mikroskopbilder in einer Messzone mit Hilfe einer CCD-Kamera (charge couple device) [24]. Die Messzone wird durch zwei Saphirglasscheiben begrenzt und ist in Abhängigkeit zur Zellkonzentration im Reaktor variabel einstellbar [21]. Durch die kontinuierliche Bewegung des rotierenden Rührwerks entwickelt sich aus der Messzone eine Art Durchflusszelle innerhalb des Reaktors. Ein Problem stellt das potentielle Bewachsen der Saphirglasscheiben im Kultivierungsbetrieb dar. Um dem entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit, über eine nanokristalline TiO₂-Beschichtung und UV-Bestrahlung eine Desorption zu erreichen [24]. Das ISM muss die Möglichkeit bereitstellen, die Messzone zu reinigen.

Die CCD-Kamera besitzt eine maximale Bildaufnahmezeit von 300 Bilder/min [34]. Über entwickelte Bildauswerteargorithmen ist die automatisierte Bestimmung der Zellkonzentration möglich [18, 19, 21]. Im Laufe der letzten Jahre wurden immer schnellere und genauere Bildauswertemethoden geschaffen, die eine Unterscheidung von Einzel-, Doppelzellen und Zellclustern in Echtzeit durchführen können (u.a. über Sobel-Operator, Binarisierung, Segmentierung, Watershed-Algorithmus) [6, 21, 35]. Die kontinuierlich erhaltenen Daten bieten viele nützliche Informationen bezüglich Zellgröße, Zellaufbau, weiterer morphologischer Besonderheiten, Zellviabilität sowie möglicher Kontamination [34]. Die Biomassekonzentration kann über die automatisierte Zellzahlbestimmung erfolgen. Die Kalibration mit offline-Referenzmethoden zeigt hierbei eine lineare Abhängigkeit [6].

Das ISM wurde hauptsächlich für die online-Überwachung von eukaryotischen Zellsuspensionen in Bioreaktoren entwickelt. Die Übertragung des Messprinzips auf den Kleinkulturmaßstab (Schüttelkolben, Mikrotiterplatte) kann über den atline-Betrieb mit Hilfe einer FIA (flow injection analysis) in Verbindung mit Durchflusszellen

realisiert werden. Hierdurch wird auch der zusätzliche Einsatz von Färbemethoden zur Bestimmung der Viabilität ermöglicht. Der industrielle Einsatz dieser Variante ist aufgrund des apparativen Aufbaus jedoch nicht sinnvoll [36].

3.2.4 Photometrische Sensoren

Photometrische Sensoren messen die Veränderungen der Intensität des eingestrahlt Lichts in ein Medium durch Interaktion mit Partikeln innerhalb der Flüssigkeit. Dringt Licht in eine trübe Lösung, wird die Lichtintensität durch verschiedene Vorgänge abgeschwächt. Der Grad der Abschwächung ergibt sich aus der Summe der physikalischen Prozesse für Absorption, Brechung, Reflexion und Streuung. Trübungsmessungen sind in Transmissions- und Streulichtmessungen zu unterscheiden. Die Art der Messmethode ist hierbei abhängig von der Orientierung der optoelektronischen Komponenten zueinander. Ausgehend vom eingestrahlt Licht sind in Abbildung 3.1 alle Möglichkeiten dargestellt.

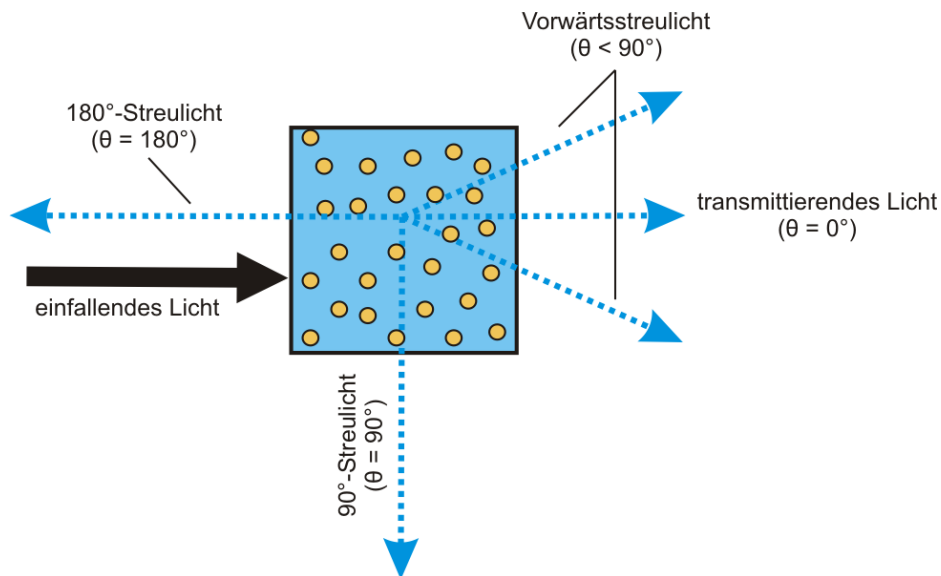


Abbildung 3.1: Orientierungsmöglichkeiten des Detektors in Abhängigkeit zum eingestrahlt Licht durch die LED, nach [37].

Transmissionsmessungen basieren auf der Messung der Abschwächung der Intensität des eingestrahlt Lichts. Die Detektion erfolgt nach Durchqueren der trüben Lösung und wird nach dem LAMBERT-BEERSCHEN Gesetz (Gleichung 3.1, S. 6) ermittelt. Zur Bestimmung der optischen Dichte wird häufig eine Wellenlänge ab $\lambda = 600 \text{ nm}$ verwendet, da Medienabsorptionen in diesem Bereich besonders gering sind [37]. Es besteht eine Abhängigkeit zu Weglänge, Konzentration und dem wellenlängenspezifischen Extinktionskoeffizienten (vgl. Abschnitt 3.1.3 (S. 6f.)). Messungen der Transmission unterliegen der Einschränkung, dass nur bis zu einer

bestimmten optischen Dichte ein lineares Verhalten ausgeprägt ist. Bei hohen Konzentrationen ist der Zusammenhang zwischen OD und Lichtintensität aufgrund gegenseitiger Beeinflussung der Partikel nicht mehr linear [38]. Transmissionsmessungen können offline mit einem Laborphotometer durchgeführt werden. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Photometer diverser namhafter Hersteller (u.a. Kontron Instruments, Merck, Perkin Elmer, Varian, Thermo Spectronic). Hierbei wird zudem zwischen Einstrahl- und Zweistrahlphotometern unterschieden.

Die Umsetzung der Transmissionsmessung in eine online-Methode scheitert an der unflexiblen Positionierung der Messkomponenten sowie am gering verfügbaren Messbereich. Es existieren zwar interessante Lösungen, um Kultivierungen im linearen Messbereich zu halten, z.B. die Umsetzung einer variablen Schichtdicke [39] oder eine automatisierte Probenverdünnung [40]. Diese Ansätze lassen sich jedoch aufgrund der komplizierten Umsetzung nicht auf einen industriellen Maßstab übertragen.

Für eine nephelometrische Messung besitzt der Detektor keine geradlinige Orientierung zur Lichtquelle. Abbildung 3.1 (oben) verdeutlicht die unterschiedlichen Möglichkeiten einer Streulichtmessung. Bei Kontakt eines Photons mit suspendierten Teilchen im Medium wird das Streulicht in alle Richtungen abgelenkt. Es wird grob in Vorwärts- und Rückwärtsstreulicht unterschieden. Zur besseren Definition wird der Grad der Ablenkung durch den Streuwinkel θ bestimmt. Ist $\theta \geq 90^\circ$ handelt es sich beim Streuprozess um eine Rückwärtsstreuung. Bei $\theta < 90^\circ$ wird von Vorwärtsstreulicht gesprochen. Dieser Fall wird hauptsächlich zur Partikelgrößenbestimmung in Suspensionen in der Durchflusszytometrie eingesetzt. Die Lichtquelle muss hierbei ein Laser sein. Anwendung findet diese Art der Streulichtsensorik in der klinischen Diagnostik und ist für die Bestimmung der Biomasse weniger von Bedeutung.

Bei einer nephelometrischen Messung wird i.d.R. zwischen 90° - und 180° -Streulicht unterschieden. Messungen mit einem Streuwinkel von 90° zeigen im Bereich geringer OD eine höhere Sensitivität [23]. Im Bereich hochdichter Suspensionen ist ihre Funktionsfähigkeit jedoch eingeschränkt. Abbildung 3.2 (unten) zeigt das Signalverhalten aller Orientierungen in Abhängigkeit zur Zellkonzentration.

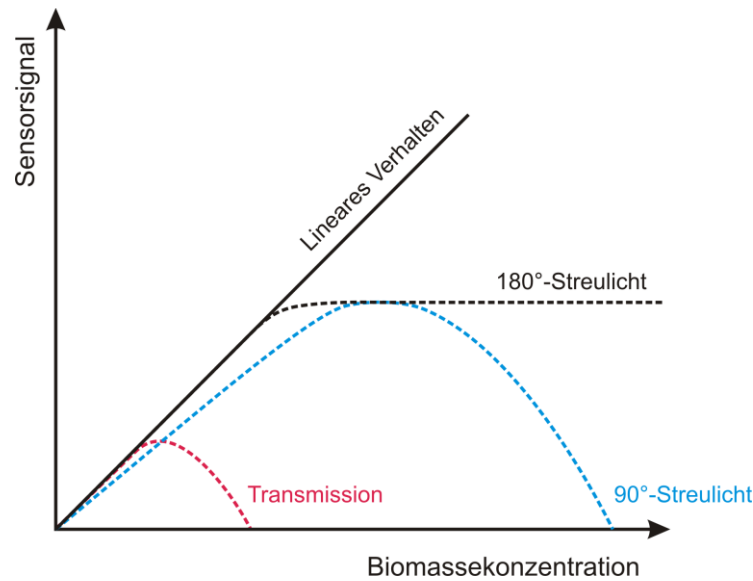


Abbildung 3.2: Signalverhalten unterschiedlicher Trübungssensoren in Abhängigkeit zur Zellkonzentration, nach [37].

90°-Streulicht besitzt über einen größeren Messbereich hinaus ein lineares Verhalten. Überwiegt jedoch die gegenseitige Abschirmung der Zellen, ist mit weiterer Zunahme der Biomassekonzentration eine Abnahme der detektierten Lichtintensität zu beobachten. Im Gegensatz hierzu strebt das Sensorsignal bei 180°-Orientierung mit zunehmender Biomassekonzentration einem Grenzwert entgegen. Die Erklärung hierfür ist die Reduzierung der Eindringtiefe des Lichts mit zunehmender Zellkonzentration.

Neben dem vergrößerten Messbereich besitzen Nephelometer mit 180°-Orientierung den großen Vorteil, dass die optoelektronischen Komponenten sehr nah aneinander positioniert werden können. In Kombination mit der Auslagerung der Elektronik wird hierdurch die Übertragung in eine online-Methode deutlich vereinfacht. Als Reaktorvariante existieren beide Orientierungsmöglichkeiten als Einstabsonde (Abschnitt 3.3, unten). Für den Schüttelkolbenmaßstab bietet Firma Buglab [41] Systeme mit 180°-Streulicht an, die aufgrund ihrer Bauweise jedoch keine Automatisierung zulassen.

3.3 Kommerziell erhältliche optische Sensoren

Kommerziell erhältliche optische Sensoren werden für den biotechnologischen Bereich hauptsächlich für die Reaktorapplikation angeboten. Es handelt sich hierbei meist um Messsonden, die nach dem Einstabsprinzip konstruiert sind. Die Länge der Sonde kann individuell ausgewählt werden und ist auf das Einsatzgebiet abzustimmen. Trübungssonden werden u.a. durch die Hersteller Optek (Essen, Deutschland), Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland), Endress+Hauser (Schweiz), Aquasant

(Schweiz), Monitek (USA), Finesse (USA) und Cerex (USA) angeboten. Eine Auswahl unterschiedlicher Messsonden ist in Abbildung 3.3 vorgestellt.

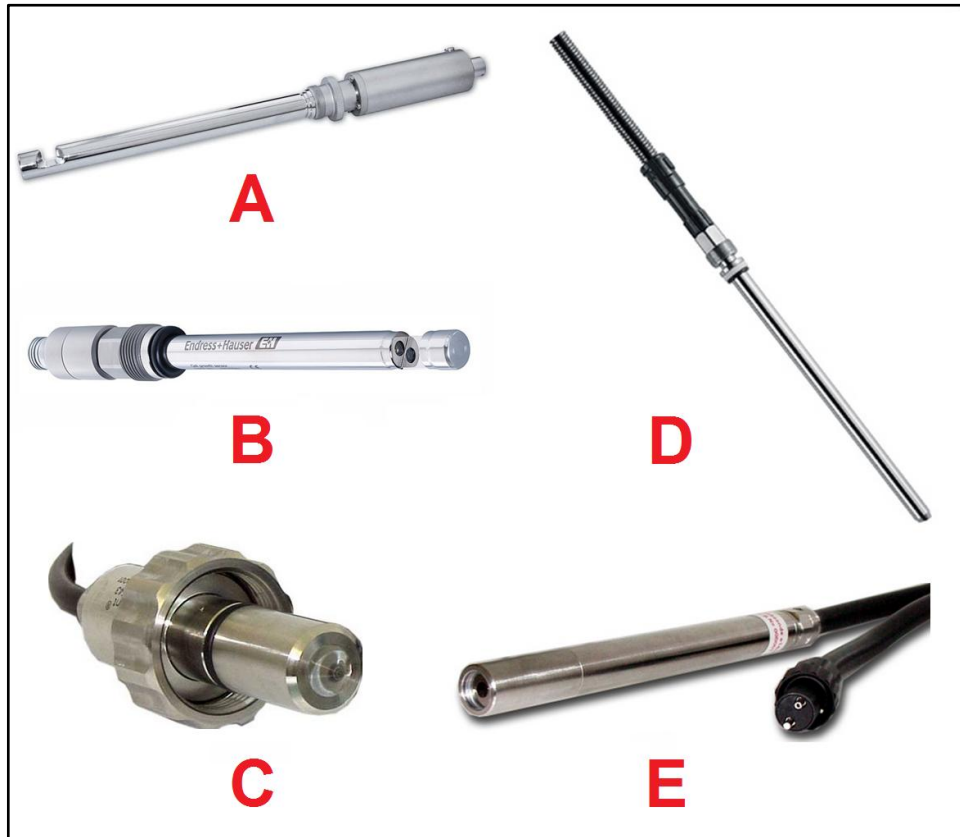


Abbildung 3.3: Auswahl unterschiedlicher optischer Sensoren für den biotechnologischen Bereich. A: ASD19-N (Optek) [42], B: OUSBT66 (Endress+Hauser) [43], C: AF 44 S/R (Aquasant) [44], D: InPro 8100 (Mettler-Toledo) [45], E: AF 44 MS/R (Aquasant) [44].

Die Messung erfolgt entweder als Transmissionsmessung, bei der die Lichtabsorption über eine konstante Weglänge gemessen wird (A - B), oder als nephelometrische Messung (90°- oder 180°-Streulicht; C - E). Transmissionssonden sind mit unterschiedlichen optischen Weglängen (1 - 40 mm) verfügbar, die je nach prognostizierter Trübung zu verwenden sind. Längere optische Weglängen werden hierbei hauptsächlich bei Tierzellkultivierungen verwendet. Für dichtere Suspensionen (Bakterien-, Hefekulturen) erfolgt der Einsatz kürzerer optischer Weglängen [42].

Mettler-Toledo bietet im Bereich der Streulichtsonden zwei Systeme an, die in Abhängigkeit zur untersuchten Suspension Anwendung finden. Für geringe bis mittlere Trübungen werden Vorwärts- und 90°-Streulichttechnologie bevorzugt. Die Rückwärtsstreulichttechnologie wird für hochdichte Suspensionen genutzt. Im ersten Fall sind in der Einstabsonde Lichtausgang und -eingang im 90°-Winkel angeordnet. Es werden zwei unterschiedliche Lichtwellenleiter zur Übertragung an die Elektronik verwendet. Rückwärtsstreulicht benötigt für Emission und Detektion hingegen nur einen Lichtwellenleiter [45]. Es existieren diverse weitere Bauweisen, z.B. die

Lichtemission von zwei LED mit Bündelung des rückgestreuten Lichts durch eine Linse [44], das Messprinzip ist jedoch identisch. Die Emission des Lichts erfolgt durch LED oder Laser mit einer Wellenlänge im nahen Infrarot (840 - 910 nm), da Medien in diesem Bereich kaum Absorption zeigen [31].

Allen optischen Sensoren für die Reaktortechnologie ist gemein, dass sie durch Material und Verarbeitung FDA-konform sind und durch CIP (cleaning in place) und SIP (sterilization in place) für biotechnologische Anwendung präpariert werden können. Neue Trübungssonden werden mit Kalibriertabellen und Softwarepaketen geliefert, die eine Umrechnung der Messdaten in konventionelle Referenzwerte ermöglichen. Für exakte Vorhersagen müssen die Kalibrationen jedoch individuell auf die vorherrschenden Kultivierungsbedingungen angepasst werden.

3.4 Überwachung der Biomasse im Schüttelkolbenmaßstab

Als Schüttelkolbenmaßstab werden Arbeitsvolumina bezeichnet, die in kommerziell erhältlichen Schüttelkolben mit einem Volumen von 50 mL – 2.000 mL nutzbar sind. Für die biotechnologische Forschung und Industrie sind Kultivierungen im Schüttelkolbenauch heute noch wegen des einfachen Betriebs, der bequemen Handhabung und der geringen Kosten weit verbreitet [46, 47]. Zudem können viele Experimente simultan und ohne größere Vorbereitungen durchgeführt werden. Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab werden im Allgemeinen aufgrund dieser Vorteile für die Prozess- und Medienoptimierung und in Screening-Routinen für biotechnologische Produkte eingesetzt [48 - 50].

Die Umsetzung einer automatisierten online-Überwachung der Biomassekonzentration im Schüttelkolbenmaßstab ist durch bestimmte Rahmenbedingungen eingeschränkt. Das geringe Arbeitsvolumen macht invasive Methoden nicht sinnvoll. Wie bereits bei den kommerziell erhältlichen Produkten in Abschnitt 3.3 (oben) zu sehen war, ist das Potential optischer Sensoren auch hier sehr groß. Optische Sensoren bieten die Möglichkeit, ohne Eingriff ins System durch die transparenten Wände der Reaktionsgefäße zu messen. Um ein derartiges Produkt jedoch konkurrenzfähig zu halten, muss das Sensorsystem eine hohe Reproduzierbarkeit besitzen und über einen großen Messbereich ein lineares Verhalten zwischen Messwert und Biomassekonzentration bereitstellen.

Diese Voraussetzungen werden durch die 180°-Streulichtmessung erfüllt. Mit der Orientierung der optoelektronischen Komponenten zueinander (Abbildung 3.1, S. 10) kann im Gegensatz zu anderen optischen Messprinzipien eine entsprechend kompakte Bauweise der Messeinheit realisiert werden. Diese Sensorik existiert für den Schüttelkolbenmaßstab nur als universelle, nicht invasive offline-Methode mit Hilfe des

Handscanners von Buglab [41]. Ein kompaktes Sensorsystem, das eine kontinuierliche, automatisierte online-Messung der Biomassekonzentration im geschüttelten System bereitstellt, ist bisher nicht kommerziell erhältlich und Teil der Zielsetzung dieser Arbeit.

3.4.1 Wechselwirkung von Licht und Materie

Für ein besseres Verständnis der Streulichtmessung ist es von Vorteil, die physikalischen Vorgänge bei der Interaktion zwischen Licht als elektromagnetische Welle und einem Objekt als Streuzentrum genauer zu untersuchen. Trifft Licht auf suspendierte Teilchen innerhalb einer Flüssigkeit, kann beim Kontakt der elektromagnetischen Welle mit dem Streuzentrum zwischen zwei physikalischen Vorgängen unterschieden werden.

Das Licht kann durch das Objekt absorbiert werden, wobei dieses in einen energetisch höheren Zustand übergeht. Die Anregungsenergie wird daraufhin direkt durch Stöße mit anderen Teilchen als thermische Energie an die Umgebung abgegeben.

Der zweite Vorgang beschreibt den Streuprozess, der für den hier vorgestellten Sensor von entscheidender Bedeutung ist. Dabei wird die emittierte elektromagnetische Welle durch die Wechselwirkung mit dem Streuzentrum von seiner ursprünglichen Ausbreitungsrichtung abgelenkt. Auf molekularer Ebene handelt es sich bei diesem Vorgang um eine Kombination aus Absorptions- und Emissionsprozessen. Es erfolgt zunächst eine Anregung der Elektronen der Atomhüllen, bei der zeitweise ein Dipol induziert wird. Sobald die angeregten Elektronen auf ein niedrigeres Energieniveau fallen, wird ein Photon emittiert, das sich gleichmäßig in alle Raumrichtungen ausbreitet (Abbildung 3.4).

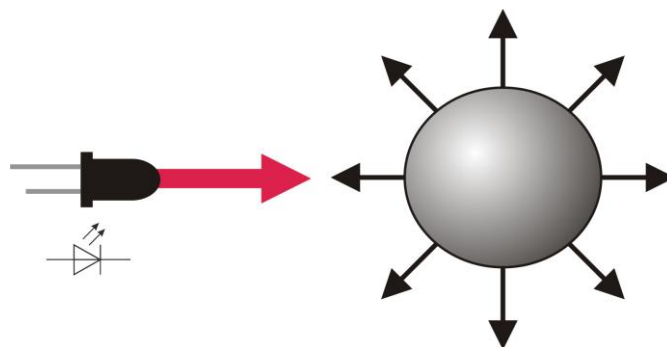


Abbildung 3.4: Verhalten von Licht bei Kontakt mit Streuzentren. Das Streulicht verteilt sich gleichmäßig in alle Richtungen.

Es handelt sich bei diesem Vorgang hauptsächlich um einen elastischen Stoß (Rayleigh-, Mie-Streuung; s.u.), der nach dem Energieerhaltungssatz ohne Verlust von kinetischer Energie stattfindet. Dies bedeutet, dass sich die Frequenz der

elektromagnetischen Welle nicht verändert. Ein sehr geringer Anteil (Wahrscheinlichkeit: $10^{-3} - 10^{-4}$) des eingestrahnten Lichts kann jedoch auch zu einer bleibenden Energieübertragung zwischen Photon und Objekt führen. Bei der Lichtstreuung entstehen zu einem gewissen Anteil somit auch inelastische Stöße. Durch die Energieaufnahme ändert sich die Rotations- und Schwingungsenergie des Objekts. Dieser Vorgang wird als Stokes- bzw. Anti-Stokes-Streuung bezeichnet. Die möglichen Streuverhalten bei Kontakt zwischen einem Photon und einem Streuzentrum sind in Abbildung 3.5 vorgestellt.

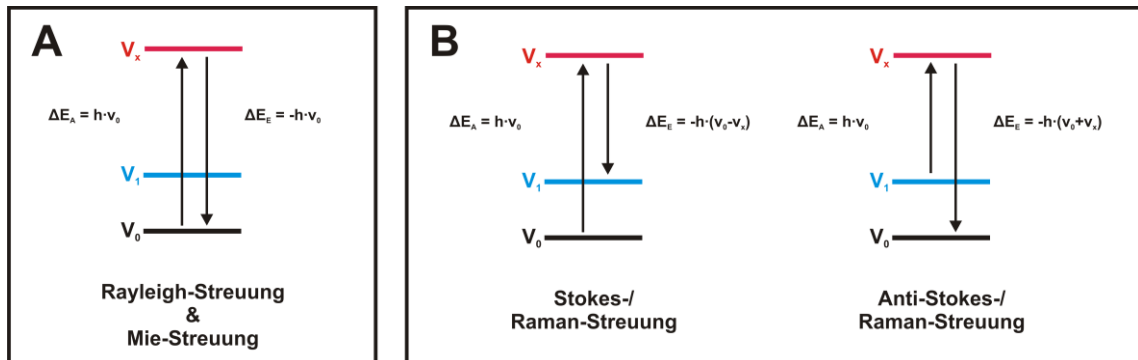


Abbildung 3.5: Vergleich der Energien im Absorptions-/Emissionsprozess bei Kontakt zwischen elektromagnetischer Welle und einem Streuzentrum. **A:** Elastische Lichtstreuung. Energie bleibt bei der Reemission erhalten. **B:** Inelastische Lichtstreuung. Energie des Photons verändert sich durch den Streulichtprozess.

Die Ablenkung der Ausbreitungsrichtung ist abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts I_0 und der Größe des Teilchens. Die detektierbare Lichtintensität wird durch die Größen für Streuwinkel θ , Wellenlänge λ , Objektdurchmesser d und Brechungsindex n beeinflusst. Für die theoretische Betrachtung wird von einer idealen sphärischen Kugelform ausgegangen (Abbildung 3.6).

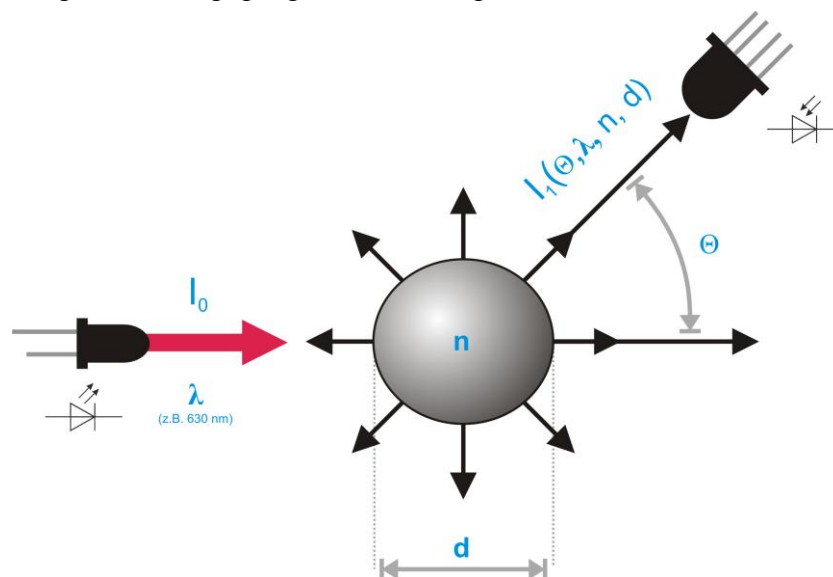


Abbildung 3.6: Ablenkung elektromagnetischer Wellen durch den Streuvorgang.

Um ein exaktes Messergebnis in konstanten Trübungen zu erhalten, ist es notwendig, dass diese beeinflussenden Faktoren über den gesamten Messverlauf bekannt sind. Durch die Verwendung einer LED einer bestimmten Wellenlänge (z.B. $\lambda = 630 \text{ nm}$) in Kombination mit optischen Filtern wird der Einfluss auf die Detektion des Streulichts durch unterschiedliche Wellenlängen minimiert. Der Streuwinkel θ wird durch die feste Orientierung der optoelektronischen Komponenten zueinander festgelegt. Die Lichtintensität wird damit von vorstehenden Einwirkungen unabhängig, so dass der theoretische Streulichtwert, abgesehen von der Anzahl der Objekte während der Messung, nur noch vom Brechungsindex und der Größe beeinflusst wird.

Elastische Stöße zwischen Lichtstrahlen und Objekten lassen sich in zwei Fälle unterscheiden (siehe auch Abbildung 3.5, S. 16). Besteht das Streuzentrum aus einatomigen oder im Verhältnis zur emittierten Wellenlänge sehr kleinen Objekten wird von Rayleigh-Streuung gesprochen [51]. Die Streutheorie nach Rayleigh folgt der Annahme, dass innerhalb der Lösung eine statistische Verteilung der Streuzentren existiert und eine gegenseitige Einflussnahme nicht stattfindet. Die Streuwahrscheinlichkeit eines Photons ist stark abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts ($I = \lambda^{-4}$).

Die klassische Methode zur Beschreibung des Streulichts von Molekülen und größeren Objekten wird gemäß der Mie-Theorie beschrieben. Sie ist eine exakte Lösung der Maxwell-Gleichung [52]. Es handelt sich auch hierbei vorwiegend um elastische Stöße ohne Verlust an kinetischer Energie. Im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung werden alle Wellenlängen gleichmäßig gestreut.

Bei der Übertragung der Streutheorie auf den biotechnologischen Bereich muss die Mie-Theorie durch das Modell der coated-sphere (umhüllter Bereich) [53, 54] erweitert werden, da eine Zelle als inhomogenes Objekt betrachtet wird. Das Modell beinhaltet die unterschiedlichen Brechungsindices von Zellmembran und -innerem. Bei einem Streuwinkel von $\theta > 40^\circ$ entsteht nahezu 55% der Lichtstreuung einer Zelle aus intrazellularen Strukturen [55]. Der Aufbau einer Zelle ist sehr komplex. Die Zellmembran umhüllt viele unterschiedliche Organellen (z.B. Nukleus, Mitochondrien, Peroxisomen), die innerhalb des Zytoplasmas freibeweglich sind [56]. Zudem befinden sich weitere Proteine, Lipide, Polysaccharide, DNA, RNA sowie kleine organische und anorganische Moleküle im Zytoplasma. Jeder dieser Körper muss als potentielles Streuzentrum angesehen werden, wobei individuelle Brechungsindices und Objektgrößen vorhanden sind. Das Ausmaß der Veränderung des Streuverhaltens durch die unterschiedlichen Objekte ist abhängig vom Streuwinkel θ [57]. Im Fall der 180° -Streulichtsensorik wird der Hauptteil durch das Streulicht der Hülle des Objekts (Zellmembran) bestimmt [58]. Erfolgt die Streulichtmessung bei $\theta = 50 - 130^\circ$, besteht eine große Abhängigkeit zu internen Objekten und ihren speziellen Brechungsindices und Größen [57]. In Abbildung 3.7 (unten) ist die mikrokosmische Betrachtung des Streuverhaltens dargestellt.

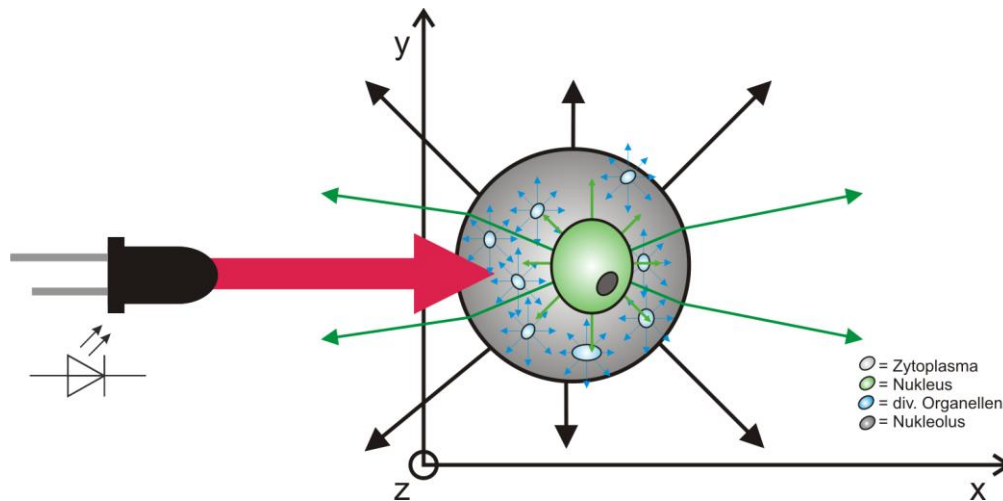


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Streuverhaltens von Zellen. Trifft eine elektromagnetische Welle auf den inhomogenen Zellkörper, wird ein Teil durch die Zellmembran gestreut. Ein zweiter Streuvorgang erfolgt jedoch im Zellinneren, nach [58].

Die Inhomogenität der Lichtstreuung innerhalb dieses Mikrokosmos ist durch die nephelometrische Messung nicht zu beobachten. Aufgrund der sich ständig verändernden Intensitäten unzähliger kleiner Streuzentren einer gleich verteilten Zellsuspension ergibt sich eine statistische Streulichtintensität innerhalb der Messzone des Sensors. Der in dieser Arbeit vorgestellte Sensor misst somit eine makroskopisch konstante Lichtstreuung.

3.4.2 Entwicklung eines automatisierten Streulichtensors für Schüttelkolbenkulturen

Das Messprinzip des vorgestellten Sensors aus [38] bildet die Grundlage für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente. Es basiert auf der nephelometrischen Messung mit $\theta = 180^\circ$. Aus den Vorarbeiten ist bekannt, dass aufgrund des Abstrahlwinkels der LED von $\Omega = 20^\circ$ [59] und der Nähe der optoelektronischen Komponenten zueinander eine räumliche Trennung zwischen Lichtquelle und Detektor bestehen muss. Die Verwendung einer Kombination aus optischen Filtern (CalflexTM C [60], Schott OG590 [61]) ermöglicht die Detektion des rückgestreuten Lichts eines sehr geringen Wellenlängenbereichs. Nähere Informationen zu den ausgewählten optoelektronischen Komponenten sind dem Anhang zu entnehmen (Abschnitt A1.1, S. 115f.). Die Messung erfolgt durch Lichtemission der verwendeten LED bei einer Dominanzwellenlänge von $\lambda = 630 \text{ nm}$ (Abbildung 3.8, unten).

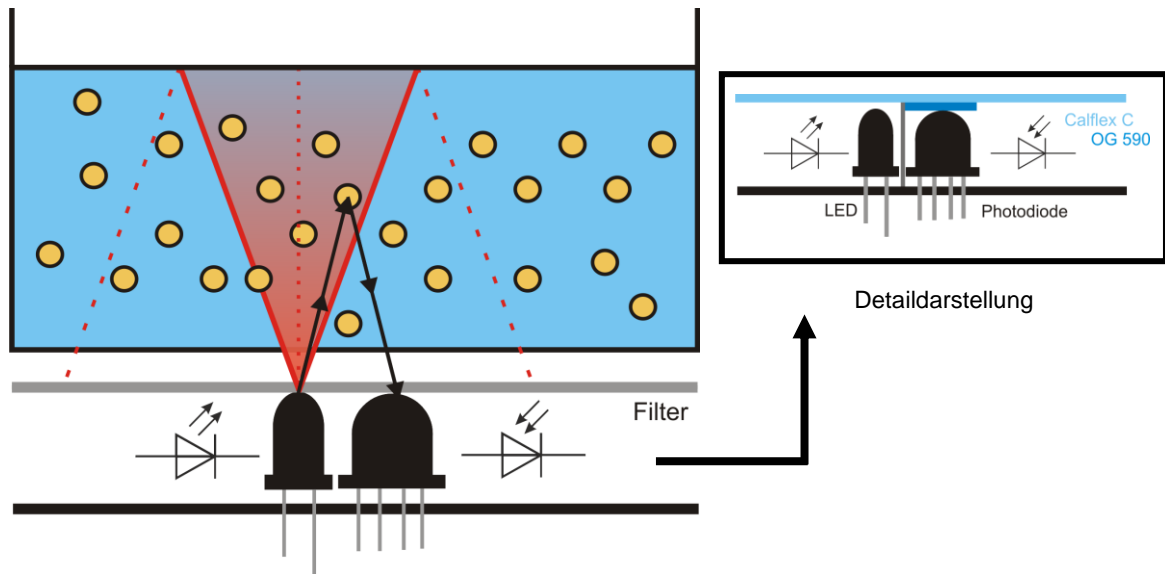


Abbildung 3.8: Schematischer Aufbau der Streulichtsensorik. Der Mittelwert der Partikelstreuung mit dem Winkel zum Detektor innerhalb eines Messvorgangs ergibt den Messwert.

Das emittierte Licht transmittiert durch den CalflexTM C-Filter und trifft auf Partikel innerhalb der Flüssigkeit. Es folgt die Lichtstreuung an Partikeln. Besitzt das gestreute Licht nach diesem Vorgang den korrekten Rückstreuwinkel (in Richtung Detektor), transmittiert es durch die Kombination aus zwei optischen Filtern und wird durch die Photodiode in ein elektrisches Signal umgewandelt. Es ist zu beobachten, dass wegen der Lichtausbreitung innerhalb der Suspension eine vollständige Umwandlung des eingestrahlt Lichts nicht möglich ist. Nur ein Teil des eingestrahlt Lichts besitzt nach dem Streuprozess den korrekten Streuwinkel und wird bei der Ermittlung des Messwerts berücksichtigt (Abbildung 3.8, rechte Seite der Querschnittsfläche). Unter der Annahme, dass das eingestrahlt Licht ausschließlich für den physikalischen Vorgang der Lichtstreuung genutzt wird oder die anderen physikalischen Vorgänge invariant sind, ist ein konstanter Messwert erreichbar.

Messungen im Rahmen der Machbarkeitsstudie aus [38] zeigten jedoch, dass bei Rotationsbetrieb ein großes Messrauschen trotz gleichbleibender Trübung entsteht. Die Ursache liegt in der Fluidbewegung und der daraus resultierenden Flüssigkeitssichel im Schüttelkolben. Die Messzone verändert sich aufgrund von Schüttelgeschwindigkeit, -radius, Kolbengeometrie und Füllvolumen. Dies führt im Extremfall dazu, dass in der Kolbenmitte der Boden nicht mehr von Flüssigkeit bedeckt ist. Zusätzlich entstehen durch Schikanen kleine Verwirbelungen während des Betriebs, so dass Reflexionen an eingetragenen Luftbläschen die Streulichtmessung beeinträchtigen.

Für die Übertragung der Streulichtsensorik auf den kontinuierlichen Schüttelbetrieb ist es somit entscheidend, die Position der Sensorik zu optimieren, um ein möglichst hohes und konstantes Signal zu erhalten. Dies ist vor allem bei geringen Trübungswerten

notwendig, da die 180°-Orientierung hier eine geringere Sensitivität zeigt [23]. Zudem ist die Synchronisation mit der Fluidverteilung im Schüttelbetriebszustreben.

Der Einsatz des Messprinzips im geschüttelten System führt im Allgemeinen zu einer Vielzahl unterschiedlicher Einflussfaktoren, die das Streulichtsignal beeinträchtigen und die Konstruktion eines marktfähigen Produkts erschweren. In Tabelle 3.2 wird ein Überblick über mögliche Beeinflussungen einer Streulichtmessung gegeben. Es wird zwischen Einflussfaktoren unterschieden, die das Sensorsignal reduzieren oder das Messrauschen erhöhen.

Tabelle 3.2: Überblick möglicher Einflussfaktoren einer 180°-Streulichtmessung im Bioprozess.

Quelle	Intensität	Messrauschen
Intensitätseinfluss durch Materialeigenschaften		
– Optoelektronische Komponente LED (mittlere Lichtstärke I_0 , Abstrahlwinkel Ω , Wellenlänge λ)	●	○
– Optoelektronische Komponenten PD (Photodiode) (Messempfindlichkeit)	○/●	○
– Optische Filter (Filterwirkung zu schwach)	●	○
– Kolbenmaterial (Transmission, Lichtbrechung)	○/●	○
Intensitätseinfluss durch Umgebungsfaktoren		
– Temperaturgradient bei LED	○/●	○
– Umgebungslicht gleicher Wellenlänge	○/●	○
Variable Messzonenhöhe im Schüttelbetrieb (Messzeit: 80 ms)		
– Durch Schüttelfrequenz, -radius, Kolbengröße, -art	●●	●●
– Durch Füllvolumen	●●	○/●
Überlagerung durch Reflexionen		
– Grenzflächenreflexion „flüssig-gasförmig“	●●	●●
– Eingetragene Luftblasen	●	○
– Grenzflächenschaum	●	○
– Submerser Schaum	●	●
Veränderung der Lichtbrechung		
– Erhöhung des Brechungsindex der Flüssigkeit	●	○
Biologische Systemänderung		
– Inhomogenität durch Zellagglomerate, ungelöste Substanzen	●	●
– Kontamination durch fremde Mikroorganismen	●	○/●
Digitale Datenfilterung		
– Vergrößerung der Fensterbreite (Filterwirkung)	○	●●

Legende: ●●starker Einfluss, ● Einfluss, ○/● sehr geringer Einfluss, ○ kein Einfluss.

Trotz der Schwierigkeit der Konstruktion eines kommerziell erhältlichen Sensorsystems, dass die online-Bestimmung der Biomassezunahme im geschüttelten System zulässt, steht der Nutzen eines derartigen Systems außer Frage. Aufgrund dessen werden im Rahmen dieser Arbeit die o.g. Einflussfaktoren genau charakterisiert und die optimierte Konstruktion eines solchen online-Messsystems im experimentellen Teil vorgestellt (Abschnitt 4, S. 21ff.).

4 Experimenteller Teil

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der praktischen Arbeiten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, vorgestellt. Der experimentelle Teil ist in fünf Unterkapitel gegliedert. Im ersten Abschnitt wird die Integration des nephelometrischen Sensors in ein Multisensorsystem vorgestellt. Vor der Konstruktion des Dreisensor-Prototyps ist die genaue Kenntnis der Funktionsweise des Sensors wichtig. Durch strukturierte Messreihen wird das konstante Messintervall des Sensors als größter Einflussfaktor auf die Signalhöhe und das Messrauschen identifiziert. Im konstruierten Prototyp wird hierzu eine geeignete Lösung zur Reduzierung dieses Einflusses vorgestellt. Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Charakterisierung eines Lösungsansatzes mit Hilfe dynamischer Messzeitregulierung. Hierzu werden Einflussfaktoren unterschiedlicher Messparameter auf die Flüssigkeitsbewegung im Schüttelkolben näher untersucht. Weiterhin wird hierbei das Verhalten unterschiedlich opaker Flüssigkeiten charakterisiert. Die Anwendung des Multisensorsystems im biotechnologischen Bereich wird im dritten Abschnitt vorgestellt. Durch logische Verknüpfung des Sensorsignals mit den relevanten Kultivierungsbasisgrößen optische Dichte (OD_{600}), Biotrockenmasse (BTM) und Zellzahl (ZZ) können Kalibrationen für verschiedene Mikroorganismen (MO) aufgestellt werden. Im Zuge dessen erfolgt der Vergleich zwischen schäumenden und schaumfreien Kulturen. Um das große Potential dieser neuen Sensortechnologie zu verdeutlichen, werden im vierten Abschnitt beispielhaft die Vorteile des Multisensorsystems gegenüber konventionellen offline-Methoden präsentiert, die vor allem aus der hohen Informationsdichte (schnelle Messung, kurzes Messintervall) entstehen. Hierbei wird der Fokus auf die Sensitivität des Messprinzips gelegt. Im fünften und letzten Abschnitt wird durch eine alternative Methode ein Ansatz für eine schnellere Kalibrationserstellung mit relevanten Kultivierungsbasisgrößen geschaffen.

4.1 Die Entwicklung des Messgeräts

Automatisierte Messmethoden sind im biotechnologischen Bereich ein gutes Mittel, um schnell Informationen über relevante Prozessgrößen, u.a. die Biomassekonzentration, zu erhalten. Bei der Messung von gestreutem Licht besteht eine direkte Beziehung zwischen den wachstumsbeschreibenden Größen und der Biomassekonzentration. Die Vorteile optischer Messmethoden bilden das Fundament des entwickelten Prototyps.

Das Grundsystem der neuen Sensortechnologie wurde bereits in einer vorangegangenen Diplomarbeit beschrieben [38] (siehe auch Abschnitt 3.4.2, S. 18f.). Es basiert auf der Technik des kommerziell erhältlichen Shake Flask Reader (SFR; Abbildung 4.1, unten) von PreSens GmbH, Regensburg und wurde für die durchgeführten Arbeiten zur Verfügung gestellt.



Abbildung 4.1: Ausgangsmodell des Multisensorsystems. Auf Grundlage des kommerziell erhältlichen Shake Flask Reader von PreSens GmbH [62] erfolgte die Entwicklung des Dreisensorsystems.

Der SFR verfügt in der Ursprungsvariante über die Möglichkeit zur optischen Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration (pO_2) und des pH-Werts (pH). Hierzu werden spezielle single-use Schüttelkolben verwendet, in denen für die o.g. Sensoren je ein Sensorspot integriert ist. Durch immobilisierte Fluoreszenzfarbstoffe auf diesen Spots kann das System beide Prozessgrößen durch den transparenten Kolbenboden nicht invasiv messen, in dem eine optische Anregung spezifischer Wellenlängen erfolgt. Der SFR besitzt neun Messstationen. Die Integration eines dritten optischen Sensors zur direkten Bestimmung des Zellwachstums schafft eine Plattform, die eine quasi-simultane Überwachung aller relevanten Prozessgrößen für den Schüttelkolbenmaßstab ermöglicht. Hierdurch wird für einen potentiellen Anwender das Maximum an Informationen über den jeweiligen betrachteten Bioprozess bereitgestellt.

Im Rahmen der o.g. Machbarkeitsstudie [38] wurden die elektrischen Kontakte des pO_2 -Kanals im ursprünglichen SFR mit den entsprechenden optoelektronischen Komponenten für die nephelometrische Messung ausgetauscht. Die räumliche Trennung zwischen LED und Photodiode konnte durch einen Kunststoffaufsatz für die Sensorik realisiert werden, auf dem die Kolbenklammer fixiert werden konnte (Abbildung 4.2, unten).



Abbildung 4.2: Foto des provisorischen Prototyps zur Streulichtsensorik. Die optischen Sensoren für pO_2 und pH wurden für den Testsensor entfernt. Diese Machbarkeitsstudie erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit [38].

Durch die provisorische Ausnutzung der Elektronik der Sauerstoffmessung konnte mit Hilfe des Streulichtensors erstmals ein reproduzierbares Verhalten des Anstiegs der Streulichtintensität in Abhängigkeit der Zunahme der Trübung bestätigt werden. Der entwickelte Trübungssensor nutzt die Möglichkeit einer kontinuierlichen Messung mit einem konstanten Messintervall von bis zu 10 s. Für eine nephelometrische Messung erweist sich ein statisches Messintervall als unzureichend. Es wird vermutet, dass eine starke Abhängigkeit zur Flüssigkeitsbewegung innerhalb des Kolbens besteht. Der Grund hierfür könnte die sich durch die Ausbildung einer Flüssigkeitssichel verändernde Messzone sein. Geplant ist neben der Entwicklung eines neuen Sensors, der die vorgenannten Schwächen kompensiert, die Integration dieser neuen Technik in den kommerziell erhältlichen SFR. Aus der Kombination der beiden vorhandenen Sensoren mit dem neuen Trübungssensor können zusätzliche Daten gewonnen werden, die die Grundlage für eine Verbesserung der Aussagekraft der generierten Informationen innerhalb des Multisensorsystems bilden.

Um die prognostizierte Beziehung zwischen Flüssigkeitsbewegung und Sensorsignal zu bestätigen und Lösungen zur Reduzierung von Messrauschen im Streulichtsignal zu entwickeln, werden zunächst Messwertbildung und beeinflussende Faktoren untersucht. Anschließend erfolgt die optimierte Konstruktion des Dreisensor-Prototyps.

4.1.1 Funktionsweise des Sensors

Es ist notwendig, den Ablauf einer Messung genau zu kennen, um störende Einflüsse auf das gemessene Amplitudensignal besser interpretieren zu können. Hierzu wurde eine experimentelle Reihe durchgeführt, bei der während unterschiedlicher

Trübungsmessungen der Spannungsverlauf mit Hilfe eines Oszilloskops verfolgt wurde. Der Verlauf einer Messung ist in Abbildung 4.3 beispielhaft dargestellt.

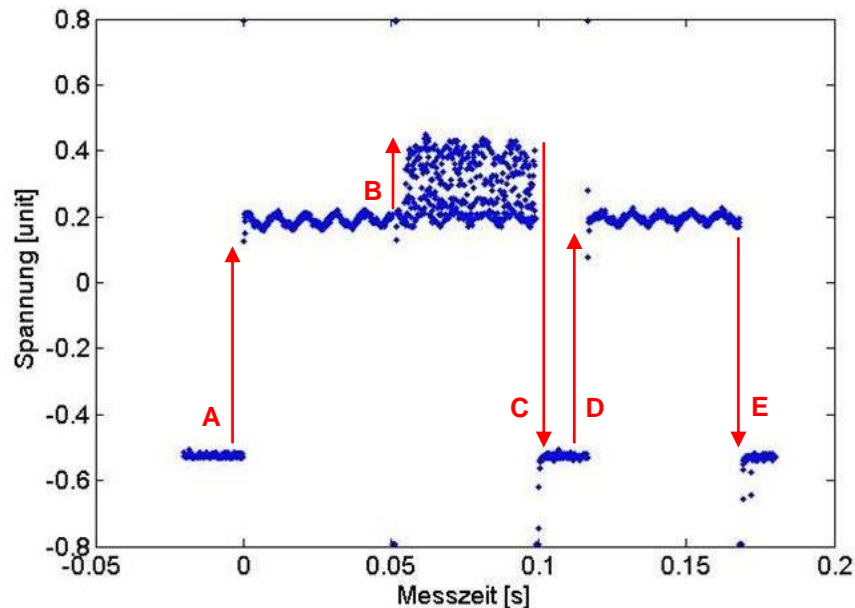


Abbildung 4.3: Oszilloskopmessung bei der Entstehung eines Messwertes am Beispiel einer Formazinlösung mit einem Streulichtsignal von 19.465 rel. AU unter konstanten Messbedingungen (500 mL, 10% Füllvolumen, $OD_{650} = 5,9$, 100 rpm). A: PD ein, B: LED ein, C: LED/PD aus, D: PD ein, E: PD aus.

Aus der Abbildung geht hervor, dass ein Messwert elektronisch innerhalb von 200 ms erhalten wird. LED und Photodiode (PD) werden separat voneinander gesteuert. Der Ablauf der Messung einer geschüttelten Trübungslösung erfolgt stets nach dem gleichen Prinzip. Zunächst wird die Photodiode aktiviert (A), die das Umgebungslicht detektiert. Anschließend wird die LED eingeschaltet (B) und die Aufnahme des Messlichts beginnt. LED und Photodiode werden gleichzeitig ausgeschaltet (C) und es folgt eine finale Messung des Umgebungslichts (D + E). Der detektierte Messwert wird schließlich durch Integration über die Messzeit mit Hilfe des GOERTZEL-Algorithmus erhalten.

Der Messwert setzt sich aus drei grundlegenden Schwingungen zusammen: der Schwingung des Umgebungslichts ($f = 100$ Hz), der Schwingung des Messlichts ($f = 4.460$ Hz) und der Schwingung der Flüssigkeitssichel bei Schüttelbetrieb ($f = \text{rpm}/60$ Hz). Bei geringer Rotationsgeschwindigkeit besitzt die Flüssigkeitsbewegung im Kolben nur einen geringen Einfluss (Abbildung 4.3, oben). Es wird ein Ergebnis erhalten, das der Trübung im Kolben entspricht. Wird die Frequenz des Schüttlers jedoch erhöht, überlagern sich die Schwingungen derart, dass keine reproduzierbaren Messwerte mit der Hardware moduliert werden können. Da die Schwingungsfrequenzen für Umgebungs- und Messlicht näherungsweise konstant bleiben, ergibt sich eine Abhängigkeit der Messwertbildung von der Schüttelfrequenz. Abbildung 4.4 zeigt das unterschiedliche Verhalten in der Messwertbildung unter

Extrembedingungen bei einer Schüttelfrequenz von 300 rpm. Trotz gleicher Messparameter werden Abweichungen im Sensorsignal von knapp 100% beobachtet.

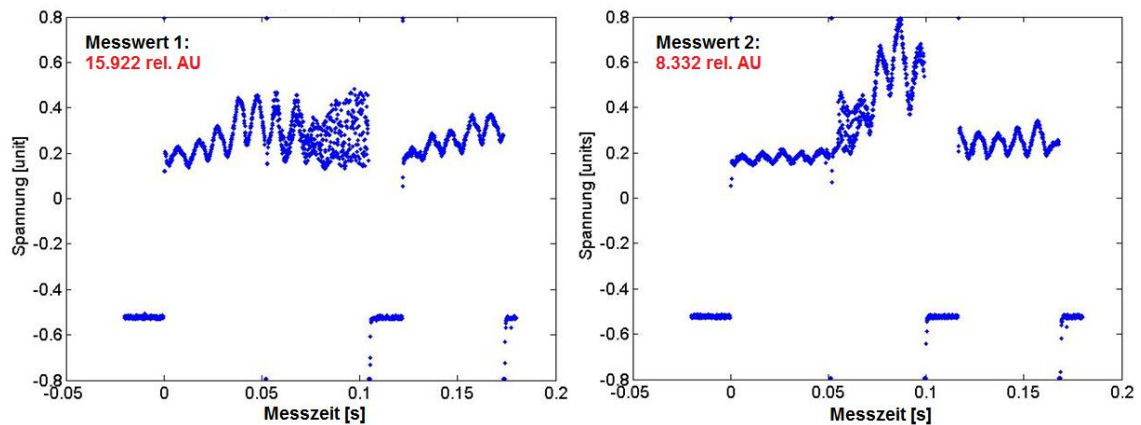


Abbildung 4.4: Darstellung nicht reproduzierbarer Verhalten bei der Messwertbildung hoher Schüttelfrequenzen. Als Extrembedingungen wurden 300 rpm und 10% Füllvolumen bestimmt. Links: $M_1 = 15.922$ rel. AU. Rechts: $M_2 = 8.332$ rel. AU.

Der schwankende Spannungsverlauf in den Oszilloskopmessungen ist durch die zeitlich variierende Intensität des gemessenen Streulichts zu erklären. Mit Hilfe dieser Messreihe konnte exemplarisch gezeigt werden, dass das Messprinzip im vorgestellten System bei hoher Schüttelfrequenz stark durch die rotierende Flüssigkeit im Kolben beeinflusst wird, da die Photodiode chaotische Spannungsverläufe zu einem Messwert umwandelt. Ist die Flüssigkeitsbewegung hingegen gering, werden auch ohne weitere Optimierungsschritte reproduzierbare Ergebnisse in hoher Präzision erhalten.

4.1.2 Die Flüssigkeitsbewegung im Kolben

Der bestehende Ablauf eines Messzyklus ist im Prototyp des nephelometrischen Sensors auf die phasenmodulierte Messung von pO_2 und pH ausgelegt [38]. Die Messung erfolgt kontinuierlich mit einem Messintervall von 10 s und innerhalb einer Messzeit von 200 ms. Für nephelometrische Messungen aus einem geschüttelten Medium heraus muss jedoch ein neuer Messzyklus entwickelt werden, um Schwankungen der Messamplitude durch auftretende Sichelbildung im Medium zu kompensieren.

Um diesen Einfluss näher charakterisieren zu können, wurden unterschiedliche Highspeed-Videoaufnahmen bei Parametervariation durchgeführt. Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Kamera mit einer Bildaufnahmezeit von bis zu 420 Bildern/s durch eine angefertigte Halterung auf dem Tablar des SFR befestigt. In Abbildung 4.5 (unten) ist der Messaufbau für diese experimentelle Reihe dargestellt.



Abbildung 4.5: Messaufbau zur Beobachtung der Flüssigkeitsbewegung im Kolben durch Highspeed-Videoaufnahmen unterschiedlicher Formazinlösungen.

In der vorgestellten Messreihe wurden Intensitätsmessungen mit Formazin als Trübungsstandard durchgeführt. Bei konstanter Trübung erfolgten Videoaufnahmen der Flüssigkeitsrotationen im Kolben (Variation von Schüttelfrequenz und Füllvolumen). Die erhaltenen Videos wurden anschließend in Zusammenarbeit mit Frau Dr. D. SOLLE (TCI, Hannover) mit *Matlab* durch einen Graustufenabgleich mit Hilfe von Bilderfassungs- und Bildverarbeitungssoftware ausgewertet. Der Graustufenverlauf wurde an verschiedenen mediangefilterten Bildstellen (Fensterbreite 50) geglättet.

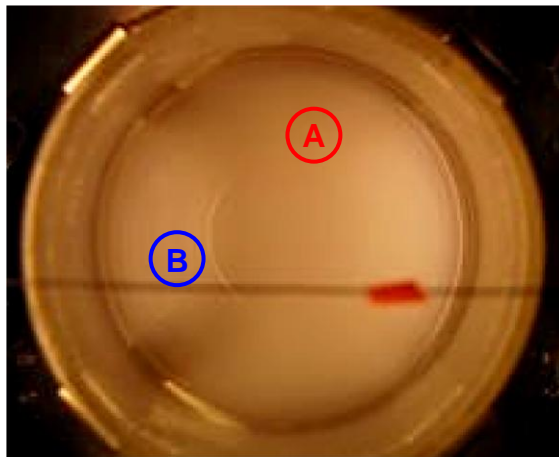


Abbildung 4.6: Aufsicht eines Schüttelkolbens. Blickwinkel der installierten Kamera zur Erfassung der Flüssigkeitsverteilung. Der gespannte Draht gilt als Referenz zur Flüssigkeit. A: Position der LED. B: Frei gewählte Stelle.

Unter dem roten Kreis (A) aus Abbildung 4.6 befindet sich die LED des Sensors, die während der Messung kontinuierlich aufleuchtet. Der blaue Kreis (B) liegt in einem hiervon entfernten Bereich. Aus dem intervallartigen Verlauf der Helligkeitsstufen wird die Schwingungsfrequenz der Flüssigkeitsbewegung erhalten. In Abbildung 4.7 (unten) ist die Bildauswertung eines Highspeed-Videos einer rotierenden Formazinlösung exemplarisch dargestellt.

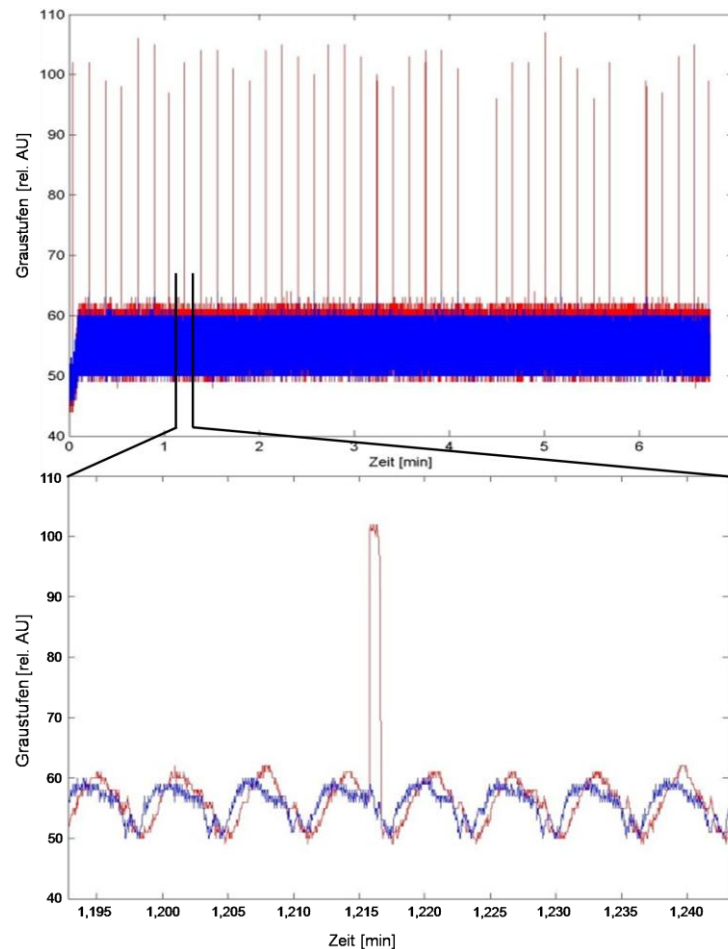


Abbildung 4.7: Bildauswertung des Highspeed-Videos von Formazin mit konstanten Messparametern (500 mL-Kolben, 20% Füllvolumen, 150 rpm, $OD_{650} = 0,5$). Oben: Darstellung der gesamten Messzeit (ca. 7 min). Unten: Darstellung zum Zeitpunkt einer Messauslösung.

Es ist deutlich zu erkennen, dass der blau markierte Bereich zwischen 50 - 60 Skaleneinheiten schwankt, hingegen der rot markierte Bereich zum Zeitpunkt der Messauslösung einen um 40 – 50 Graustufen höheren Wert anzeigt. In der unteren Darstellung sind 2,7 s im Zeitraum einer Messauslösung dargestellt. Beide Schwingungen sind in ihrer Periode zueinander versetzt, in ihrer Amplitude (abgesehen vom Zeitpunkt der Lichtemission durch die LED) jedoch identisch. Es ist weiterhin zu erkennen, dass während der Messung ein Absinken der Flüssigkeitshöhe im Detektionsbereich zu beobachten ist. Aus der Theorie ist bekannt, dass die Menge an Flüssigkeit zum Zeitpunkt einer Messung einen Einfluss auf den Messwert hat (Abschnitt 3.4.2, S. 18f.). Aus der Graustufenauswertung folgt, dass sich die Flüssigkeitssäule während einer Messung stark verändert. Wird die Drehzahl des Tischschüttlers erhöht, verkürzt sich die Periode. Hierdurch erfolgt eine noch stärkere Flüssigkeitsveränderung innerhalb des Detektionsfensters. In Anlehnung an Abschnitt 4.1.1 (S. 23f.) ist die große Messabweichung bei extremen Messbedingungen durch ein konstantes Messintervall zu erklären. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich die Schwingungen bei Veränderung des Füllvolumens in ihrer

Graustufendifferenz verändern. Eine Erhöhung des Füllvolumens führt zu einer geringeren Differenz.

Zusammenfassend konnte durch diese experimentelle Reihe die Abhängigkeit der Fluidbewegung von der Frequenz sowie des Füllvolumens im Kolben bestätigt werden.

4.1.3 Einflussfaktoren auf den Messwert

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben, wird die Ermittlung eines Streulichtwerts bei Messung einer trüben Lösung im geschüttelten System mit der ursprünglich vorhandenen Hardware von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Um einen Bezug von der sich ausbildenden Flüssigkeitssichel auf nephelometrische Messungen zu bekommen, wurden parallel zu den Highspeed-Videoaufnahmen aus Abschnitt 4.1.2 (S. 25f.) Intensitätsmessungen der untersuchten Parametervariationen durchgeführt. Wie in Abbildung 4.8 beispielhaft an einem NB-Kolben (no baffled) gezeigt, erhöht sich bei konstantem Füllvolumen das Messrauschen mit steigender Schüttelgeschwindigkeit.

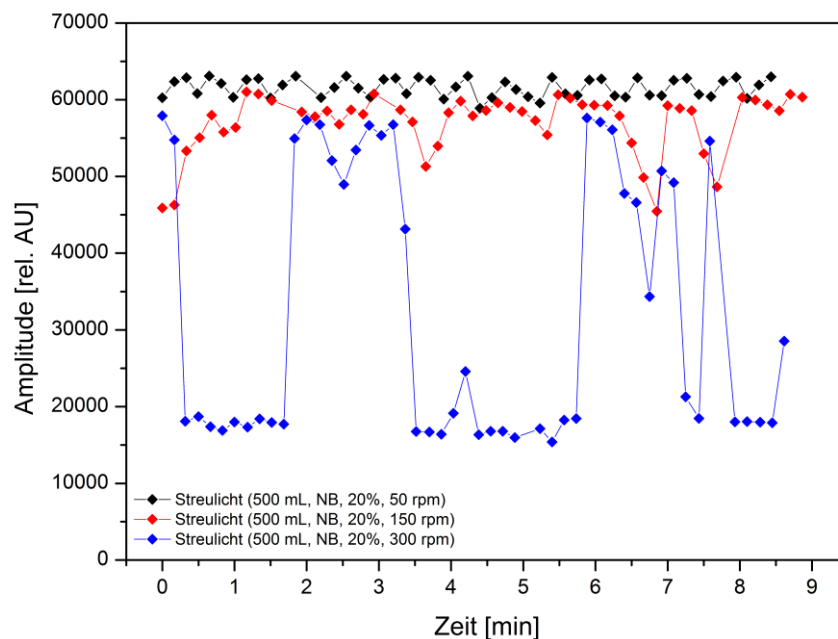


Abbildung 4.8: Verlauf des Streulichtsignals mit Kalibrationsstandard Formazin unterdefinierten Messbedingungen (500 mL Kolben, NB, 20% Füllvolumen, $OD_{600} = 6,8$).

Die schwankende Amplitude ist ein Resultat aus der kontinuierlichen Messung bei konstantem Messintervall und konstanter Messdauer. Während des Schüttelbetriebs bildet sich unabhängig von Kolbenart und -größe eine periodische Schwingungsfrequenz aus, die der Verteilung der Flüssigkeit im Schüttelkolben entspricht. Da sich die Position des Streulichtensors und somit der Detektionsbereich

relativ zum Schüttelkolben nicht verändert, wird die Messung bei einer homogenisierten Suspension stark von der Flüssigkeitshöhe über dem Detektor beeinflusst. Dies kann ebenfalls in den o.g. Highspeed-Videos beobachtet werden. Bei einer niedrigen Rotationsgeschwindigkeit bildet sich keine Flüssigkeitssichel aus. Der Höhenunterschied zwischen Minimum und Maximum ist sehr gering. In diesem Fall hat die Flüssigkeitsbewegung innerhalb des Schüttelkolbens nur einen marginalen Einfluss auf den gemessenen Wert. Die theoretische Überlegung wird durch die experimentelle Reihe gestützt. Bei einem konstanten Füllvolumen von 100 mL ist bei einer Geschwindigkeit von 50 rpm ein mittlerer Fehler von lediglich 1.193 rel. AU zu beobachten (Abbildung 4.8, schwarz). Dies entspricht einer prozentualen Abweichung von 1,9%. Wird die Geschwindigkeit des Schüttlers erhöht, bildet sich die Sichelform der Flüssigkeit aus. Bei 150 rpm entsteht bei vorgegebenen Messparametern aus dem Höhenunterschied ein Messrauschen von 7,0% bezogen auf den Mittelwert der Streulichtmessung (3.979 rel. AU, rot). Der Verlauf der blauen Messung entspricht dem Maximum des Messrauschens. Dies liegt bei 300 rpm und zeigt einen mittleren Fehler von 17.584 rel. AU (53,9%).

Der vorgestellte optische Sensor detektiert die Anzahl der Partikel bzw. Zellen im Detektionsfenster zum Zeitpunkt der Messauslösung. Viel Flüssigkeit führt zu einer größeren Menge an gerichteter Lichtstreuung, wenig Flüssigkeit hingegen zu einer geringeren Anzahl (vgl. Abschnitt 3.4.2, S. 18f.). Die Summe des detektierten Streulichts ergibt den Messwert. In Abbildung 4.9 ist dieses Verhalten dargestellt.

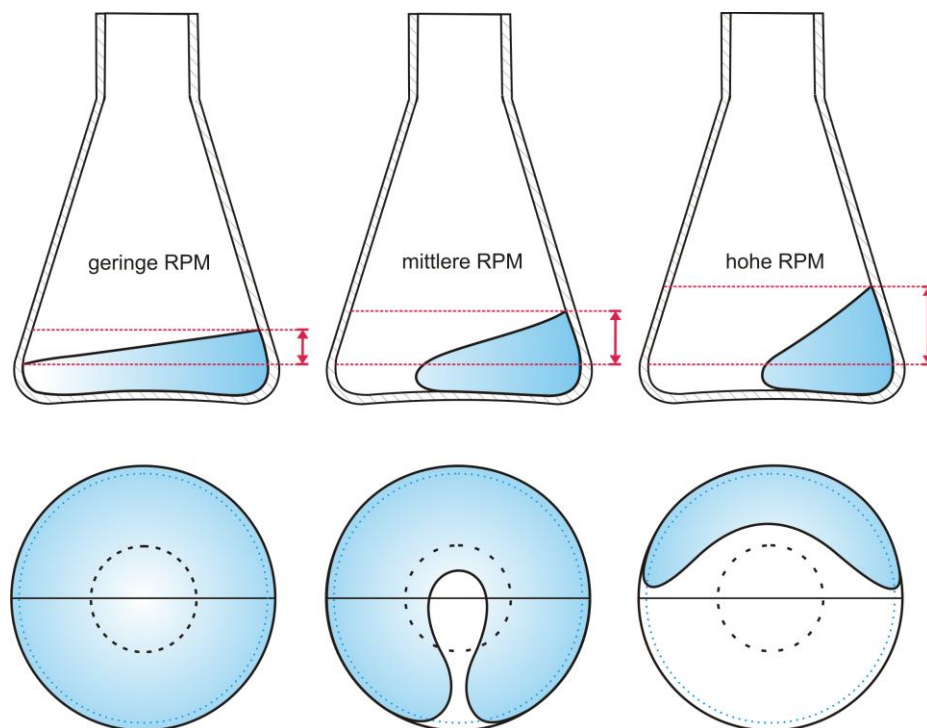


Abbildung 4.9: Darstellung der Ausbildung der Flüssigkeitssichel in Abhängigkeit zur RPM. Oben: Querschnittsansicht. Unten: Aufsicht.

Die in rot dargestellte Höhendifferenz ist proportional zur Standardabweichung der Messamplitude in den jeweiligen Intensitätsmessungen. Bei konstantem Füllvolumen erhöht sich diese Differenz über dem Detektionsfenster mit steigender Schüttelfrequenz. Dieses Verhalten konnte bei allen untersuchten Parametervariationen beobachtet werden. In Abbildung 4.10 ist das Streulichtverhalten aller Intensitätsmessungen exemplarisch anhand einer unverdünnten Formazinlösung dargestellt.

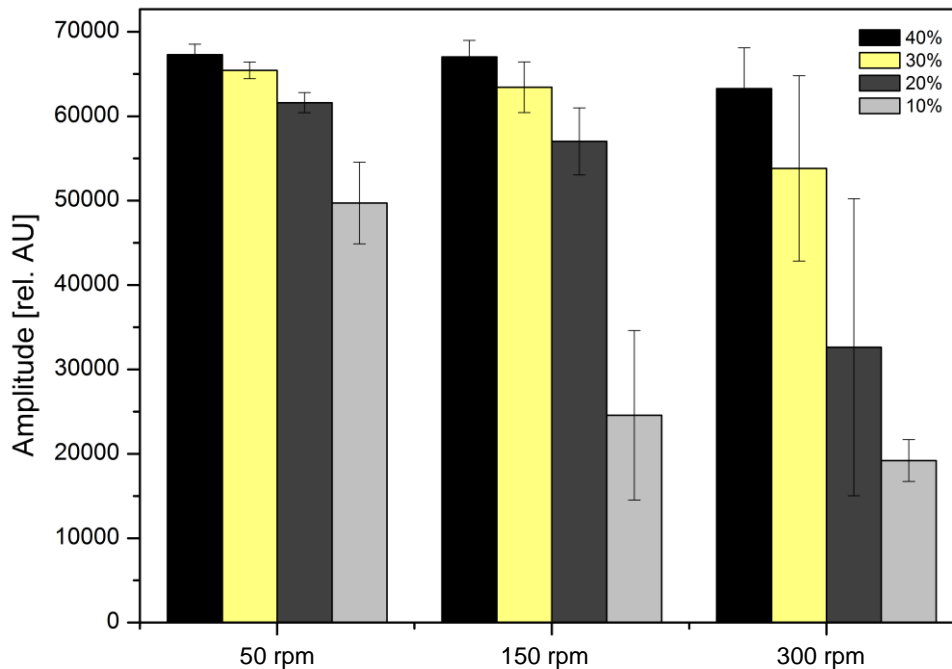


Abbildung 4.10: Streulichtverhalten von Formazin bei Veränderung der Messparameter Füllvolumen (in %) und Schüttelfrequenz (in rpm) am Beispiel eines 500 mL-Schüttelkolbens.

Ist das Füllvolumen bei 40% (schwarz), ist der maximale Streulichtmittelwert von 67.298 rel. AU bei 50 rpm erreicht. Selbst wenn die Schüttelfrequenz auf 300 rpm erhöht wird, ist lediglich ein leichtes Absinken dieses Amplitudensignals um 5,97% zu sehen, das vom mittleren Fehler kompensiert wird. Dies bedeutet, dass die maximale Amplitude ebenfalls bei einer hohen Schüttelfrequenz erreicht werden kann und nur durch den bestehenden statischen Messzyklus eingeschränkt wird. Durch eine Verringerung des Volumens im Kolben erhöht sich auch die Differenz zwischen den untersuchten Schüttelgeschwindigkeiten. Bei einem Füllvolumen von 30% (gelb) ist der Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit bereits bei 17,77% Abweichung bezogen auf das maximal mögliche Signal. Auch hier ist anhand der Standardabweichung zu erkennen, dass selbst bei erhöhter Schüttelfrequenz das maximale Amplitudensignal noch verfügbar ist. 20% Füllvolumen (dunkelgrau) führt unter gegebenen Messbedingungen hingegen zu einer Differenz von 47,03%. Ein Füllvolumen von 10% (hellgrau) ergibt schließlich einen um 61,35% reduzierten maximalen Streulichtwert. In beiden letztgenannten Intensitätsmessungen ist die maximale Amplitude durch Erhöhung der Schüttelfrequenz nicht mehr zu erreichen. Tabelle 4.1 (unten) zeigt Intensitäts-

messungen bei Veränderung der Messparameter und die Abweichungen zum maximal möglichen Streulichtwert für eine unverdünnte Formazinlösung ($OD_{600} = 6,8$) mit Kolbengröße 500 mL. Weitere Trübungswerte und eine Kolbengrößenvariation sind dem Anhang zu entnehmen (Tabelle B.1– B.3, S. 121 - 123).

Tabelle 4.1: Streuverhalten einer Suspension in Abhängigkeit von Füllvolumen und Schüttelfrequenz am Beispiel einer unverdünnten Formazinlösung.

Füllvolumen	Drehzahl	Streulicht Mittelwert	σ	σ
[%]	[rpm]	[rel. AU]	[rel. AU]	[%]
10	50	49.706	4.842	9,74
	150	24.562	10.041	40,88
	300	19.210	2.473	12,87
20	50	61.604	1.193	1,94
	150	57.019	3.979	7,00
	300	32.630	17.584	53,89
30	50	65.439	976	1,49
	150	63.437	3.006	4,74
	300	53.813	10.987	20,42
40	50	67.298	1.232	1,83
	150	67.028	1.951	2,91
	300	63.277	4.830	7,63

Zusammenfassend gilt, dass bei einem großen Füllvolumen nur eine geringe Abhängigkeit von der Schüttelfrequenz besteht. Mit einer Reduzierung des Volumens auf $< 30\%$ erhöht sich dieser Einfluss unter gegebenen Messbedingungen jedoch drastisch. Als Erklärung hierzu muss der Prozess der Lichtemission berücksichtigt werden. Wird Licht durch eine LED emittiert, wird der Lichtstrom auf einen Raumwinkel verteilt. Je größer die Beleuchtungsfläche ist, desto mehr rückwärtige Lichtstreuung kann durch den Detektor registriert werden. Abbildung 4.11 zeigt diesen Prozess schematisch.

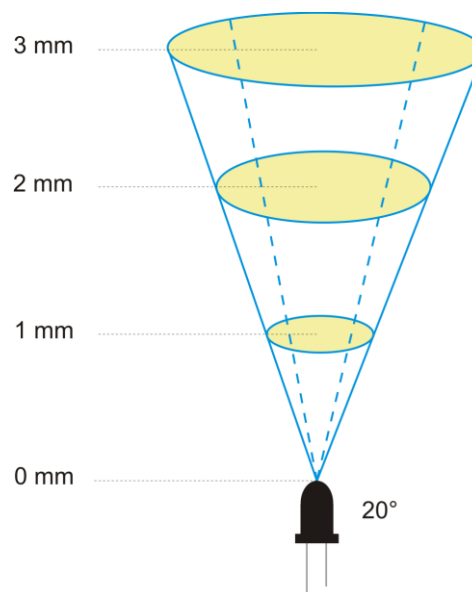


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Vergrößerung der Beleuchtungsfläche mit fortschreitender Entfernung von der Lichtquelle.

Mit fortschreitender Entfernung sinkt jedoch die Lichtstärke nach dem photometrischen Entfernungsgesetz unabhängig von weiteren physikalischen Prozessen mit dem Quadrat. Ab einer bestimmten Grenzhöhe, ist die Intensität des gestreuten Lichts so gering, dass eine Detektion nicht mehr möglich ist.

Für eine reproduzierbare Streulichtmessung muss eine Mindestflüssigkeitshöhe über dem Sensor vorhanden sein, die abhängig vom Trübungsgrad der Suspension ist (vgl. Abschnitt 4.2.4, S. 57f.). Befindet sich zu wenig Flüssigkeit im Detektionsbereich, wird ein Teil des eingestrahnten Lichts durch einen Brechungsprozess an der Phasengrenze abgelenkt und steht für einen Streuprozess nicht mehr zur Verfügung. In der betrachteten experimentellen Reihe besitzt selbst das Minimum ab einem Füllvolumen von 30% ausreichend trübe Flüssigkeit, um den Großteil des potentiell zur Verfügung stehenden Lichts zu streuen. Eine weitere Verringerung der Flüssigkeitshöhe bedeutet jedoch, dass der Einfluss der Lichtmessung im geschüttelten System durch die ansteigende Höhendifferenz bei entsprechend hoher Schüttelgeschwindigkeit steigt.

4.1.4 Verbesserungsbedarf im Streulichtsensor

Aus den bisherigen Ergebnissen folgt, dass bei der Integration des Streulichtsenors in ein Multisensorsystem eine Verbesserung der Funktionsfähigkeit erfolgen muss. Erfolgt dies nicht, sind reproduzierbare Messdaten ausschließlich für geringe Schüttelfrequenzen und großem Füllvolumen möglich.

Aus den Oszilloskopmessungen ist zu beobachten, dass im Fall einer hohen Schüttelfrequenz der detektierte Spannungsverlauf, der einen gemeinsamen Messwert bildet, chaotischen Mustern folgt. In Verbindung mit den Highspeed-Videoaufnahmen ergibt sich eine starke Abhängigkeit von der Flüssigkeitsmenge über dem Sensor zum Zeitpunkt der Messung. Die Messdauer von 200 ms ist prinzipiell zu lang, da hierdurch im Fall hoher Schüttelfrequenzen der Messwert durch Volumenveränderung der rotierenden Flüssigkeit im Detektionsfenster beeinflusst wird. Weiterhin ist der Zeitpunkt der Messung entscheidend. Die folgende Gleichung beschreibt die Kreisbewegung der Flüssigkeit exemplarisch für eine Schüttelfrequenz von 300 rpm.

$$\text{Kreisbewegung } x = \frac{300 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 200 \cdot 10^{-3} \text{ s} \cdot 360^\circ}{60 \text{ s} \cdot \text{min}^{-1}} = 360^\circ \quad (4.1)$$

Bei dieser Geschwindigkeit rotiert die Flüssigkeitssichel im Kolben während der Messung genau ein Mal um ihre eigene Achse. Dies führt dazu, dass während des Messvorgangs sowohl Streulichtwerte hoher Flüssigkeit (Wellenberg) als auch niedriger Flüssigkeit (Wellental) im GOERTZEL-Algorithmus berücksichtigt werden (vgl. Abschnitt 4.1.1, S. 23f.). Durch eine Verringerung der Schüttelgeschwindigkeit wird das Problem einer konstanten Messung deutlich (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Einfluss der Schüttelgeschwindigkeit auf die Kreisbewegung der Flüssigkeit während einer Messung.

Drehzahl [rpm]	Umdrehungen beim Messvorgang [U]	Kreisbewegung [°]
300	1	360
200	0,66	240
150	0,5	180
100	0,33	120
50	0,17	60
0	0	0

Abhängig vom Start des Messvorgangs befindet sich unterschiedlich viel Flüssigkeit im Detektionsbereich. Die Mittelwertbildung ergibt Messdaten, die sich durch die verändernde Messzone ergeben. Es zeigt sich, dass für eine Optimierung der Zeitpunkt der Messung mit der Flüssigkeitsbewegung im Schüttekolben synchronisiert werden muss. Der Messzyklus muss dynamischer gestaltet werden. Um diesen optimierten Messzyklus zu realisieren, wurde in den konstruierten Prototyp ein Beschleunigungssensor [63] implementiert, der die Vorhersage der Position des Kolbens relativ zum Schütteltisch ermöglicht. Die neue Elektronik des Streulichtsenors kann durch diesen sog. G-Sensor den Zeitraum zwischen zwei Messungen verändern. Im konstruierten Dreisensor-Prototyp wurde weiterhin eine schnellere Elektronik verwendet, so dass das Messintervall auf bis zu 7 s und die Messzeit auf 80 ms reduziert werden konnte. Weitere Informationen über die Verbesserung der Streulichtsensorik und Funktionsweise des G-Sensors sind Abschnitt 4.2.1 (S. 41f.) zu entnehmen.

4.1.5 Einfluss des Abstands innerhalb der Optoelektronik

Aus den vorangegangenen Untersuchungen zeigt sich, dass bei der Einhausung des Sensors in ein Tablar zuvor die optimale Position der optoelektronischen Komponenten bestimmt werden muss. Unter Berücksichtigung des 180°-Setups und des bestehenden Raumwinkels der LED von $\Omega = 20^\circ$ (Abschnitt A1.1, S. 115f.) ist zu vermuten, dass mit steigender Entfernung zwischen LED und Photodiode das detektierbare Signal sinken wird, da hierdurch die Menge rückgestreuten Lichts im Bereich der Messzone sinkt. Um diese Theorie zu belegen, wurden Intensitätsmessungen bei konstanter Trübung (Formazin, $OD_{600} = 6,8$) und mit verschiedenen Geschwindigkeiten durchgeführt. Hierzu wurde der Abstand zwischen Lichtemitter und -detektor variiert. Um den Einfluss von Fehlmessungen während dieser experimentellen Reihe möglichst gering zu halten und ein reproduzierbares Messergebnis zu bekommen, wurde ein prozentuales Füllvolumen von 40% gewählt und jeweils der Mittelwert aus 30 Messungen bestimmt. Die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Messreihe konnte durch modifizierte Optikblöcke realisiert werden (Abbildung 4.12).



Abbildung 4.12: Darstellung des modifizierten Optikblocks zur Abstandsvariation zwischen den optoelektronischen Komponenten.

Die vorgestellten Optikblöcke lassen eine Abstandsvergrößerung im Bereich von 7 - 20 mm zu. Das Abstandsminimum wurde aus der Summe der Radien von LED und Photodiode und der Mindestdicke der räumlichen Abtrennung berechnet. In Abbildung 4.13 ist die experimentelle Reihe dargestellt.

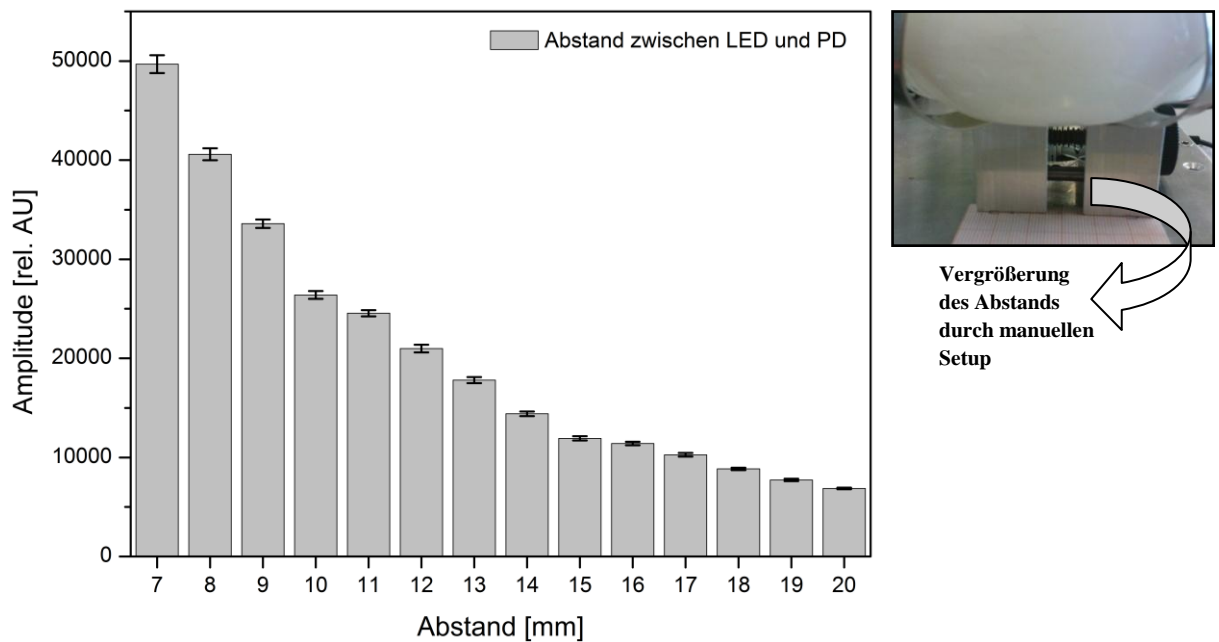


Abbildung 4.13: Veränderung der Streulichtintensität bei Vergrößerung des Abstandes zwischen den optoelektronischen Komponenten. Die Messung erfolgte ohne Schüttelbewegung (Ruhelage) unter Verwendung der Kolbengröße 500 mL.

Die Messreihe in Abbildung 4.13 (oben) bestätigt die zuvor aufgestellte Prognose. Steigt der Abstand zwischen Leuchtdiode (LED) und Photodiode (PD), sinkt die Intensität des rückgestreuten Lichts bei konstanter optischer Dichte. Es ist ein exponentieller Abfall zu beobachten, bei dem sich die Intensität des Lichts langsam

einem konstanten Wert annähert, der als Grundamplitude des Prototyps bei vorherrschenden Bedingungen identifiziert werden konnte. Das gezeigte Verhalten konnte bei Formazinlösungen unabhängig von der Geschwindigkeit des Tischschüttlers beobachtet werden (Tabelle B.4, S. 124).

Für eine zukünftige Umrechnung des Streulichtwerts in eine bekannte Basisgröße (OD_{600} , BTM oder ZZ) ist ein möglichst hohes Signal sinnvoll. Bei der Entwicklung eines nephelometrischen Sensors im 180° -Setup ist es bei den gewählten optoelektronischen Komponenten somit von entscheidender Bedeutung, dass diese nah aneinander positioniert werden, um die maximale Menge an rückwärtigem Streulicht detektieren zu können. Bei der Integration dieses dritten Sensors in die entwickelte Multisensorplattform konnte eine Reduzierung des Abstands zwischen LED und PD von ursprünglich 9,3 mm auf 7,2 mm realisiert werden.

4.1.6 Einfluss des Abstands zwischen Sensor und Schüttelkolben

Um einen neuen optischen Sensor in den Multisensor zu integrieren, ist nicht nur die Kenntnis der exakten Position der Komponenten innerhalb des Sensors wichtig. Bei der Positionierung in das bereits bestehende Messgerät muss darüber hinaus der optimale Abstand der Sensorik relativ zum Schüttelkolben bestimmt werden. Da die Funktionsfähigkeit eines Streulichtsensors stark von der Flüssigkeitshöhe über dem Sensor beeinflusst wird, ist eine konzentrische Lage der Sensorik unter dem Schüttelkolben nicht sinnvoll. In Grenzfällen kommt es dazu, dass der Kolbenboden hier frei liegt (geringes Füllvolumen, hohe Schüttelgeschwindigkeit). Weiterhin würden die optoelektronischen Komponenten in so einem Fall von der Bodenplatte der Kolbenklammer verdeckt werden. Es muss deshalb eine Position gewählt werden, die sich möglichst weit an der Kolbenwölbung befindet, durch diese jedoch nicht negativ beeinflusst wird. Zusätzlich soll die neue Position der optoelektronischen Komponenten des Trübungssensors die bestehenden Sensoren für pO_2 und pH in ihren Positionen nicht verändern, da diese bereits durch den kommerziell erhältlichen SFR validiert sind. Um die quasi-parallele Messung der drei wichtigen Kultivierungsgrößen pO_2 , pH und Biomasse in einem Multisensorgerät zu kombinieren, wurde eine experimentelle Reihe zur Positionierung der neuen Technik auf Basis der Lage des Sensors aus vorangegangenen Arbeiten [38] durchgeführt. Aus diesen Vorarbeiten ist bekannt, dass die Funktionsfähigkeit des Streulichtsensors auf Basis der Lage des pO_2 -Sensors relativ zum Schüttelkolben gegeben ist. Auf dieser Grundlage wurde ausgehend von der pO_2 -Photodiode der Kolben abstandsweise in Richtung der Kolbenmitte verändert (Abbildung 4.14).

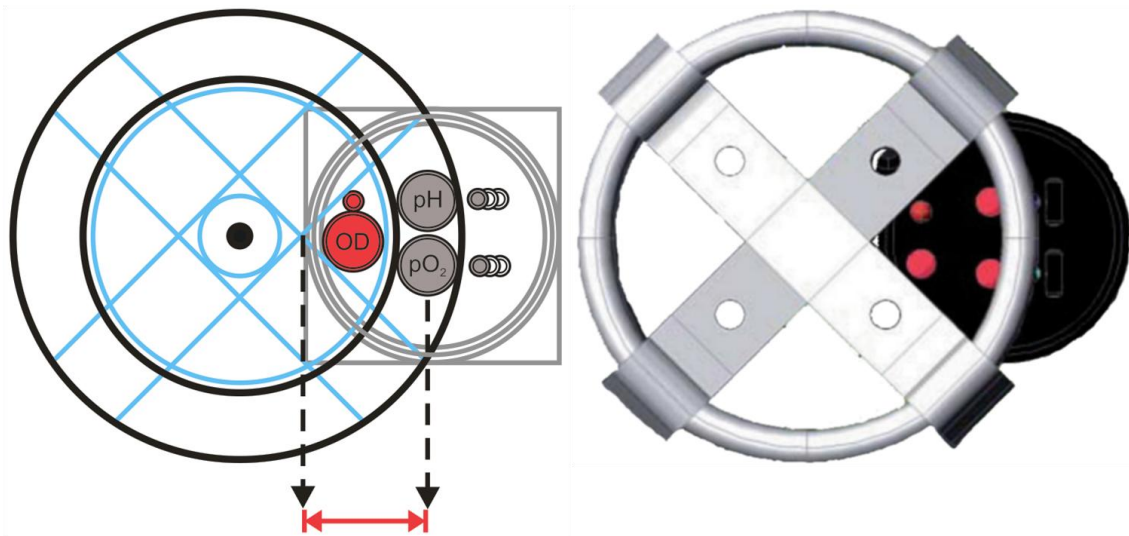


Abbildung 4.14: Skizze zur Neupositionierung der Streulichtsensorik relativ zum Schüttelkolben und den optoelektronischen Komponenten für pO_2 und pH am Beispiel eines 500 mL-Schüttelkolbens. Links: Schematische Darstellung. Der rote Abstand markiert die mögliche Position der neuen Sensortechnik. Rechts: 3D-Modell der Lage aller Sensoren relativ zum Schüttelkolben.

Für die Entwicklung des analytischen Messgeräts mit drei Sensoren wurde die Position gewählt, die sich möglichst nah an den anderen Sensoren befindet. Durch diese Ballung der Elektronik in der Multisensorplattform wird eine spätere Miniaturisierung des Messgeräts zusätzlich vereinfacht.

Die Lage des zu integrierenden Sensors wird durch zwei Grenzen eingeschränkt. Da in allen drei Sensortypen baugleiche Photodioden ($r = 5,35 \text{ mm}$) verwendet werden, ist der Mindestabstand der doppelte Radius der verwendeten Detektoren. Dies kann geringfügig weiter reduziert werden, da der Abstand zwischen LED und PD von den ursprünglichen 9,3 mm auf 7,2 mm reduziert wurde (Abschnitt 4.1.5, S. 33f.). Der Maximalabstand ist durch die auf der Bodenplatte des Multisensors fixierten Kolbenklammer gegeben (Abbildung 4.14, oben; blau skizziert). Innerhalb dieser Grenzen wurde die optimale Position des neuen optischen Sensors gesucht. Abbildung 4.15 (unten) zeigt die experimentelle Reihe beispielhaft bei einer Kolbengröße von 500 mL und einer Schüttelfrequenz von 150 rpm.

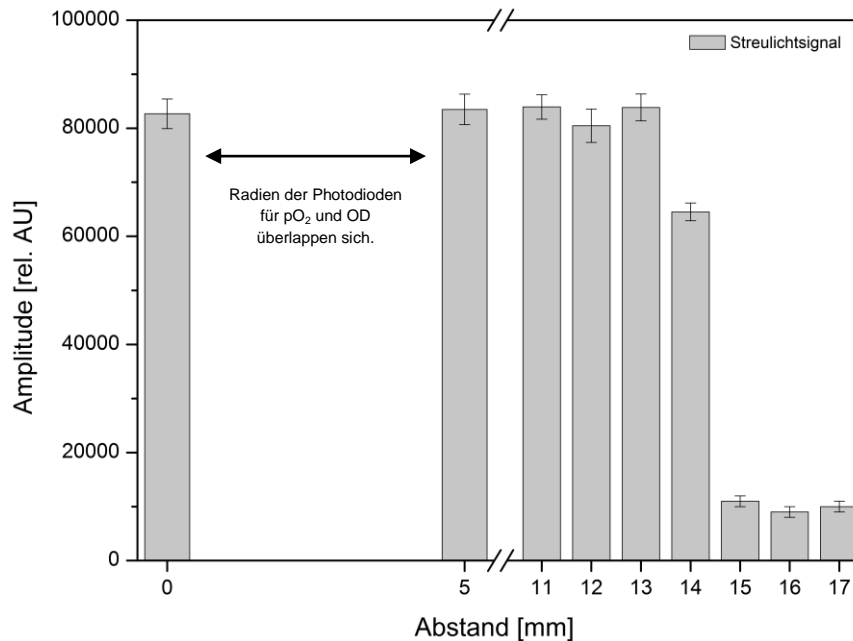


Abbildung 4.15: Integration der neuen Sensorik in den Dreisensor-Prototyp. Die Messreihe erfolgte durch Verschiebung der Kolbenklammer relativ zur pO_2 -Photodiode bei einer Kolbengröße von 500 mL und 150 rpm (Ausgangsposition des provisorischen Streulichtsenors).

Wie in Abbildung 4.15 beispielhaft gezeigt, verändert sich unter gegebenen Messbedingungen der Mittelwert der Streulichtmessung erst ab einem Abstand von 14 mm. Wird die Sensorik über diesen Wert hinaus verschoben, werden die optoelektronischen Komponenten durch die Kolbenklammer verdeckt. Dies führt zu einer Störung der Detektion und somit zu einer stark verringerten Amplitude. Vorher hat der Sensor keinen signifikanten Einfluss auf die Verschiebung der Sensorik relativ zum Schüttelkolben.

Die Integration des nephelometrischen Sensors in den Dreisensor-Prototyp ist ohne Veränderung der Positionen der bereits integrierten Sensoren und ohne Verlust der Signalstärke möglich. Ein Abstand von 9,5 mm von der pO_2 -Photodiode in Richtung Kolbenmitte, nach Reduzierung des Abstands innerhalb der Elektronik, wurde als Optimum für die Position des Sensors im Prototyp relativ zum Schüttelkolben festgelegt. Die neue Position der Streulichtsensorik wurde vor Konstruktion des Prototyps durch unterschiedliche Messungen des Kalibrationsstandards Formazin validiert und mit der alten Position verglichen. Abbildung 4.16 (unten) zeigt dies beispielhaft an zwei Messreihen identischer Parameter.

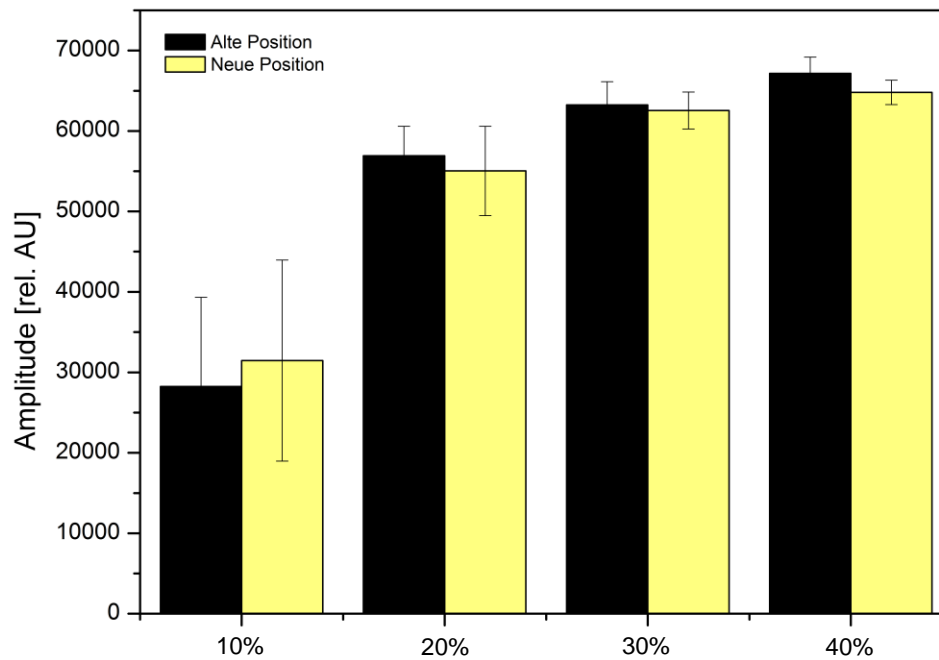


Abbildung 4.16: Beispielhafter Vergleich zwischen alter und neuer Position der Streulichtsensorik anhand von Formazin unter definierten Messparametern (500 mL, NB, 150 rpm).

Es ist zu erkennen, dass die festgelegte Position im entwickelten Prototyp keinen erkennbaren negativen Einfluss auf die Messamplitude im Vergleich zur alten Sensorposition aufweist. Wie bereits in Abbildung 4.10 (S. 30) zu sehen war, sinkt auch hier bei konstanter Trübung (4.000 NTU) der mittlere Fehler mit steigendem Füllvolumen im Kolben, während der maximale Mittelwert des Streulichts steigt. Durch weitere Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine Änderung der Kolbengröße ohne weiteres möglich ist. In keiner der validierten Kolbengrößen ist eine Schwächung des Amplitudensignals zu beobachten (vgl. Abbildung B.3, S. 125). Die Verwendung von Kolben mit und ohne Schikanen ist ebenfalls möglich. Weiterhin ist die Streulichtmessung in dieser Sensorposition unbeeinflusst von den eingeklebten Fluoreszenzpatches im Kolben, die für die optische Messung von pO_2 und pH notwendig sind (vgl. Abbildung B.3, S. 125).

4.1.7 Schlussfolgerung und Vorstellung des Multisensorprototyps

Die aus den vorangegangenen Abschnitten gewonnenen Erkenntnisse bilden die Basis zur Konstruktion des Multisensorprototyps. Durch die Kombination aus genau aufeinander abgestimmten Bauteilen des nephelometrischen Sensors, mit der Neupositionierung des Trübungssensors und der Einführung eines Beschleunigungssensors wird eine verbesserte Messung des Streulichts parallel zur Detektion von pO_2 und pH im Schüttelkolbenmaßstab realisiert. In Abbildung 4.17 (unten) ist der Aufbau des entwickelten Dreisensor-Prototyps auf Grundlage des

kommerziellen SFR [62] vorgestellt. Der Bau des Prototyps erfolgte in Kooperation mit PreSens GmbH, Regensburg.

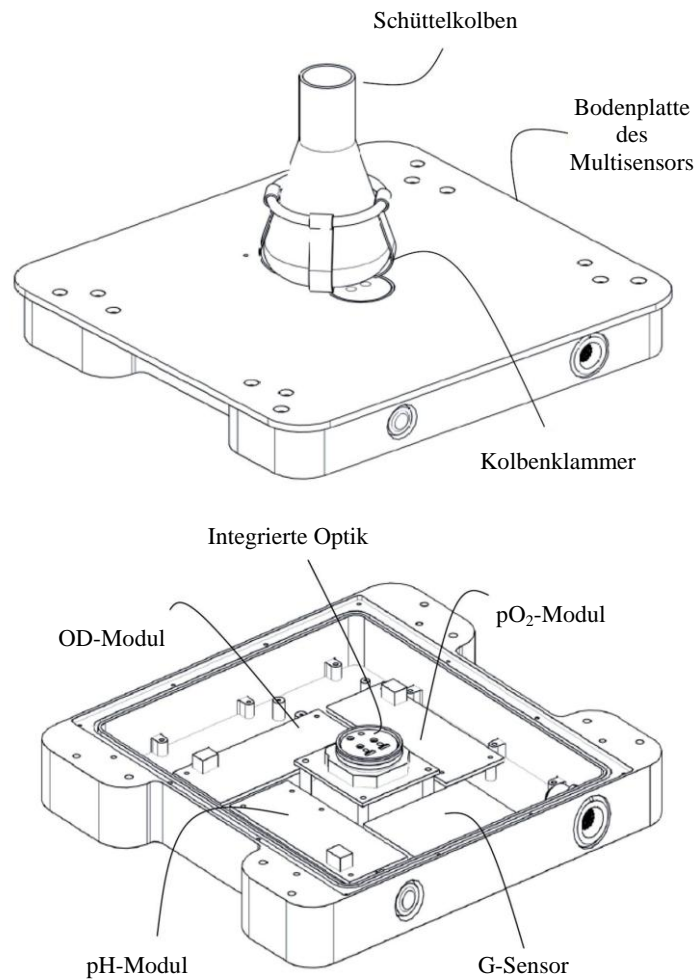


Abbildung 4.17: Technische Zeichnung des Dreisensor-Prototyps zur quasi-simultanen Messung der optischen Messgrößen pO₂, pH und Streulicht.

Der Multisensorprototyp verfügt im Gegensatz zum SFR über einen Messplatz. Für jede Sensorart wurde ein eigenes Elektronikmodul gewählt, um einzelne Bauteile leichter auswechseln zu können. Durch die gebündelte Positionierung der optoelektronischen Komponenten ist eine Miniaturisierung und eine damit einhergehende Integration von kombinierten Elektronikmodulen in späteren Versionen jedoch wahrscheinlich. Der Messplatz ist für die Kolbengrößen 125 mL, 250 mL, 500 mL und 1.000 mL validiert. Die Bohrlöcher zur Befestigung der Kolbenklammern entsprechen dem kommerziell erhältlichen SFR (Abbildung 4.18, unten).

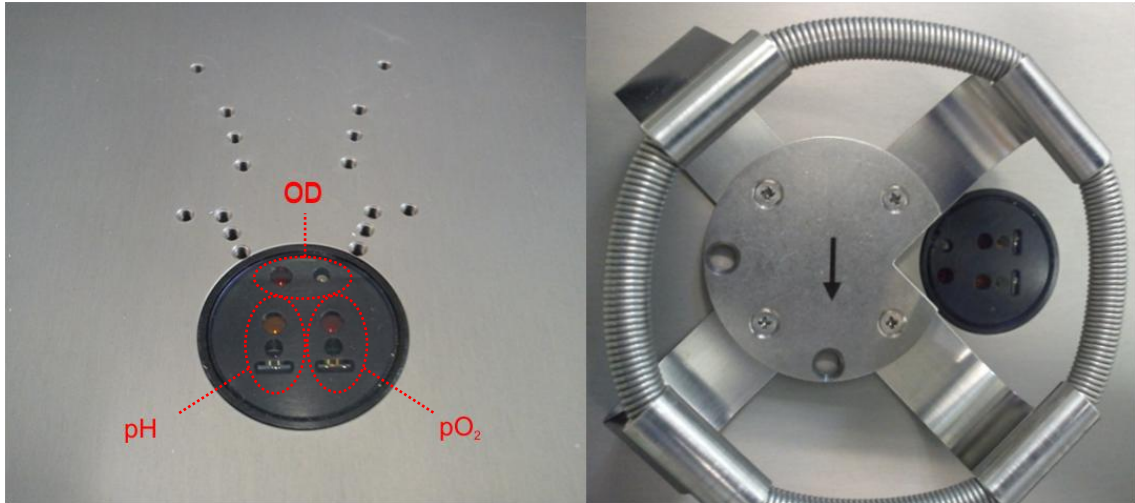


Abbildung 4.18: Lage der neu integrierten Messoptik relativ zu M3-Bohrlöchern für unterschiedliche Kolbenklammern im entwickelten Dreisensor-Prototyp.

Durch eine Vielzahl unterschiedlicher experimenteller Reihen konnte die Funktionsweise des Streulichtensors genau beschrieben und die Schwachstellen der ursprünglichen Technik aufgedeckt werden. Mit dem neu konstruierten Prototyp besteht nun die Möglichkeit, die Hauptschwachstellen des Streulichtensors im geschüttelten System in zukünftigen Messungen durch Synchronisation mit der Schüttelfrequenz zu eliminieren. Hierdurch kann die Messgenauigkeit des Streulichtwerts stark erhöht werden, die entscheidend für spätere Kalibrationen mit relevanten Kultivierungsbasisgrößen ist.

4.2 Charakterisierung des optimierten Messzyklus

Mit der Konstruktion des Multisensorprototyps sind die Rahmenbedingungen für eine optimierte Streulichtmessung parallel zu den optischen Messungen von pO_2 und pH geschaffen. Mit dem vorgestellten Sensorprototyp (Abschnitt 4.1.7, S. 38f.) wird durch richtige Verwendung des Beschleunigungssensors der Einfluss der Flüssigkeitshöhe auf das Amplitudensignal der Streulichtmessung eliminiert. Dadurch kann eine automatisierte Prozessüberwachung der Biomasse für den biotechnologischen Bereich realisiert werden.

Im folgenden Abschnitt wird die Verwendung des Beschleunigungssensors zur Verbesserung der Genauigkeit bei Messungen konstanter Suspensionen im geschüttelten System vorgestellt. Es werden anschließend potentielle Einflussfaktoren untersucht, die bei einer automatisierten Streulichtmessung während Kultivierungsexperimenten auftreten und die Messgenauigkeit beeinträchtigen können.

4.2.1 Automatische Anpassung des Messzyklus

Für eine Intensitätsmessung von rückgestreutem Licht aus einem geschüttelten Medium heraus wurde in den entwickelten Prototyp ein piezoelektrischer Beschleunigungssensor integriert [63]. Die Aufgabe dieses elektrischen Bauteils ist es, Schwankungen der Messamplitude durch auftretende Sichelbildung der Flüssigkeit im Medium zu kompensieren. Der G-Sensor ermöglicht die Vorhersage der Position des Kolbens relativ zum Schütteltisch. Bei einer konstanten Schüttelfrequenz wird die rotierende Flüssigkeit in der Software als shaker angle visualisiert, die in Abbildung 4.19 in Kästchen A markiert ist.

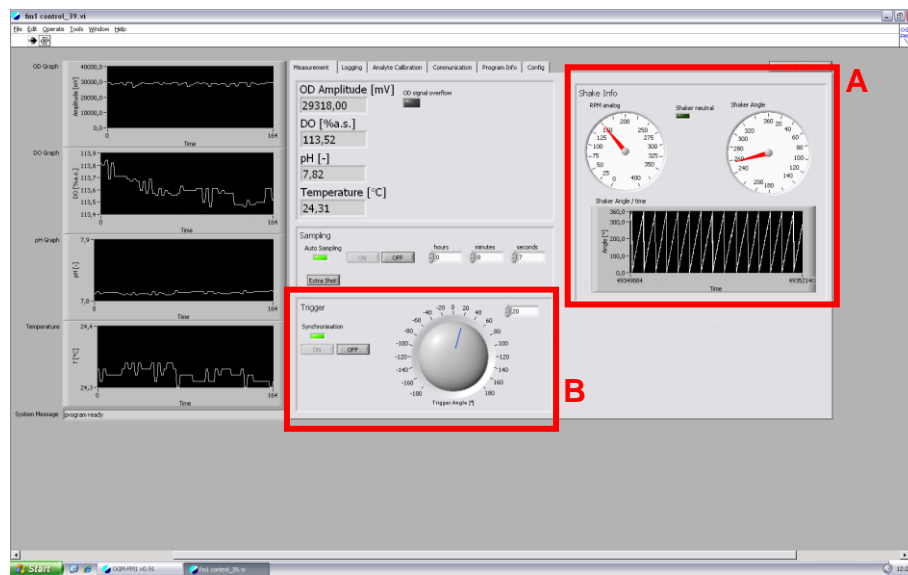


Abbildung 4.19: Oberfläche der Software zur Einstellung des integrierten G-Sensors (rote Kästchen). A: Derzeitige RPM, Visualisierung rotierender Flüssigkeit, zeitlicher Winkel. B: offset-Funktion zur Einstellung der Auslöseverzögerung einer Messung.

Durch die in die Software implementierte offset-Funktion (Abbildung 4.19, Kästchen B) kann eine Verkürzung und Verzögerung der Zeit zwischen zwei Messungen erreicht werden. Unter der Annahme, dass die Flüssigkeit im Schüttelkolben mit einer konstanten Geschwindigkeit rotiert und dies durch den G-Sensor robust wiedergegeben wird, kann durch korrekte Einstellung des Triggers immer das höchste Amplitudensignal ermittelt werden. Dies geht einher mit der geringsten Messabweichung.

Bei einer nicht synchronisierten Messung des Streulichts wird neben der Datenspeicherung des relevanten Amplitudenwerts ebenfalls der tatsächliche shaker angle durch die Software registriert. Eine Verbindung von Streulichtwert und tatsächlichem Winkel bildet die Grundlage der folgenden experimentellen Reihen. Zum besseren Verständnis ist in Abbildung 4.20 (unten) die Funktionsweise der Einstellung des Triggerwinkels vorgestellt.

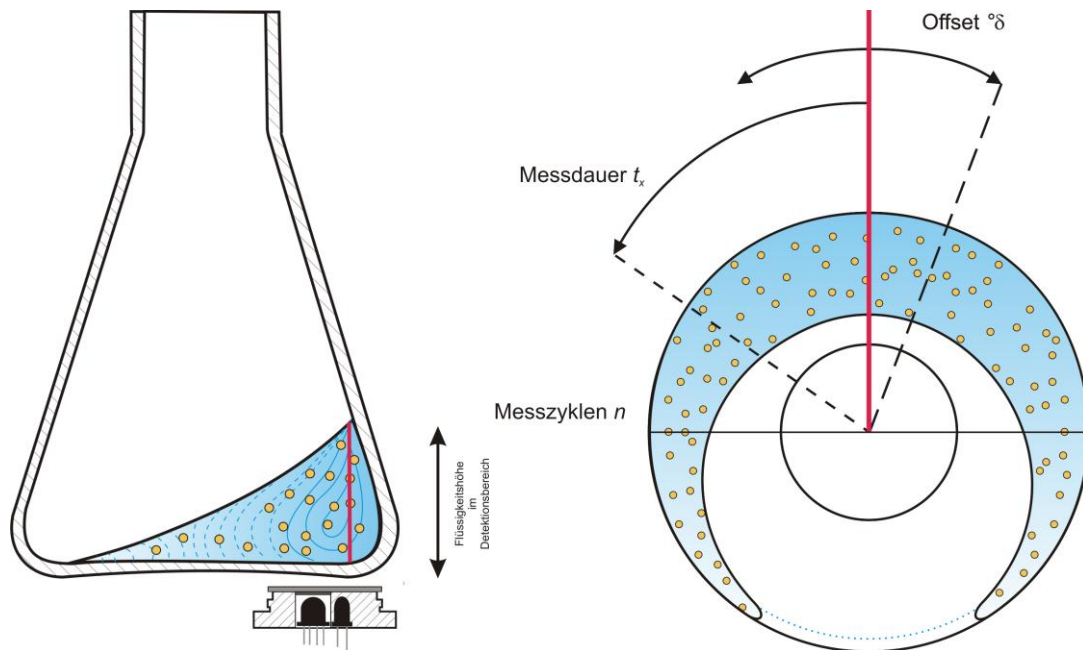


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der Funktionsweise des variablen Messzyklus durch offset-Funktion der Messauslösung. Links: Querschnittsansicht. Rechts: Aufsicht.

In der Aufsicht der Sichelform (Abbildung 4.20, rechts) ist der Beginn der Messung rot markiert. Da jede Messung im Prototyp eine Messzeit von 80 ms besitzt, muss der Mittelwert der Flüssigkeitshöhe in diesem Zeitraum im Detektionsbereich maximal sein. Dies ist zu erreichen, wenn die Messauslösung um den radialen Winkel δ verschoben wird.

Um die Abhängigkeit des Triggerwinkels von beeinflussenden Messparametern näher bestimmen und diesbezüglich eine spätere Automatisierung einführen zu können, wurde ein Kolbenscreening durchgeführt. Hierfür wurden spezielle single-use Schüttelkolben (PC, Polycarbonat) der Firma Corning Inc. in den Größen 125 mL, 250 mL und 500 mL verwendet, die zuvor mit Sensorspots für die optische pO_2 - und pH-Messung ausgestattet wurden. Es wurden sowohl NB-Kolben (no baffled) als auch WB-Kolben (with baffled) verwendet (vgl. Abschnitt D3, S. 150f.). In diesen Messreihen wurden Daten der Intensitätsmessungen einer unverdünnten Formazinlösung mit Variation von Kolbengröße, Kolbenart, Füllvolumen und Schüttelgeschwindigkeit erhoben. Für die Darstellung des Kolbenscreenings zur optimalen Einstellung des Triggerwinkels ist in Abbildung 4.21 (unten) exemplarisch die Kolbengröße 125 mL mit Schikanen bei einer Schüttelfrequenz von 150 rpm dargestellt.

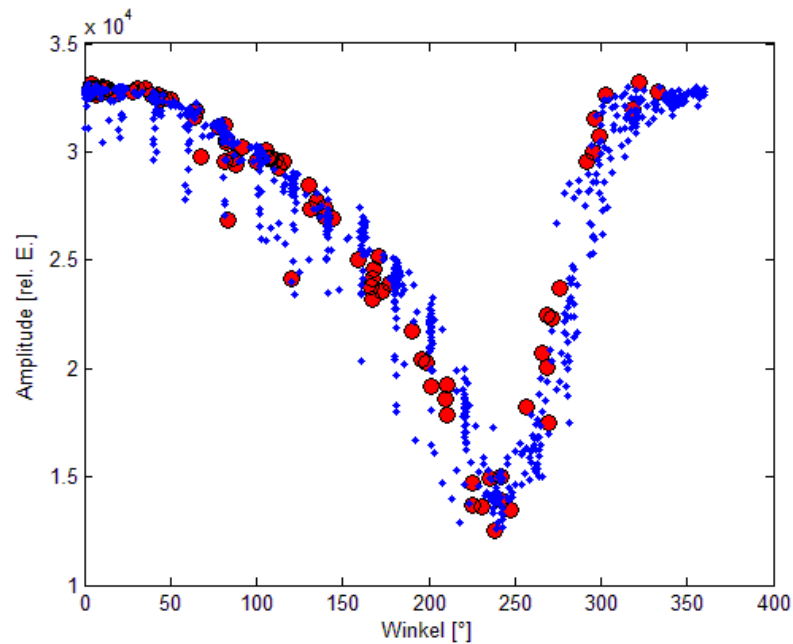


Abbildung 4.21: Exemplarische Darstellung des Kolbenscreenings zur optimalen Einstellung des Triggerwinkels abhängig von unterschiedlichen Messparametern eines WB-Kolbens (125 mL Kolbengröße, 20% Füllvolumen, 150 rpm Schüttelfrequenz).

Jeder Punkt in dieser Graphik entspricht einem detektierten Messwert. Die roten Punkte geben hierbei die winkelabhängige Amplitude einer nicht synchronisierten Messung an. Die blauen Punkte stellen Messwerte verschiedener fest eingestellter Winkel dar; in diesem Beispiel 18 Messreihen in 20° -Schritten mit einer Messdauer von je 5 min. Je länger die Messung läuft, desto detaillierter wird der Schwingungsverlauf der rotierenden Flüssigkeit im Kolben dargestellt. Die Reproduzierbarkeit dieses Messverfahrens konnte anhand von Mehrfachmessungen bestätigt werden (vgl. Abschnitt B1.4, S. 126f.).

Die Einstellung des Triggerwinkels der maximalen Amplitude ist hauptsächlich abhängig von der Rotationsgeschwindigkeit des Tischschüttlers, wie in Abbildung 4.22 (unten) bei einer konstanten Geschwindigkeit und variierender Kolbengröße und Kolbenart zu erkennen ist.

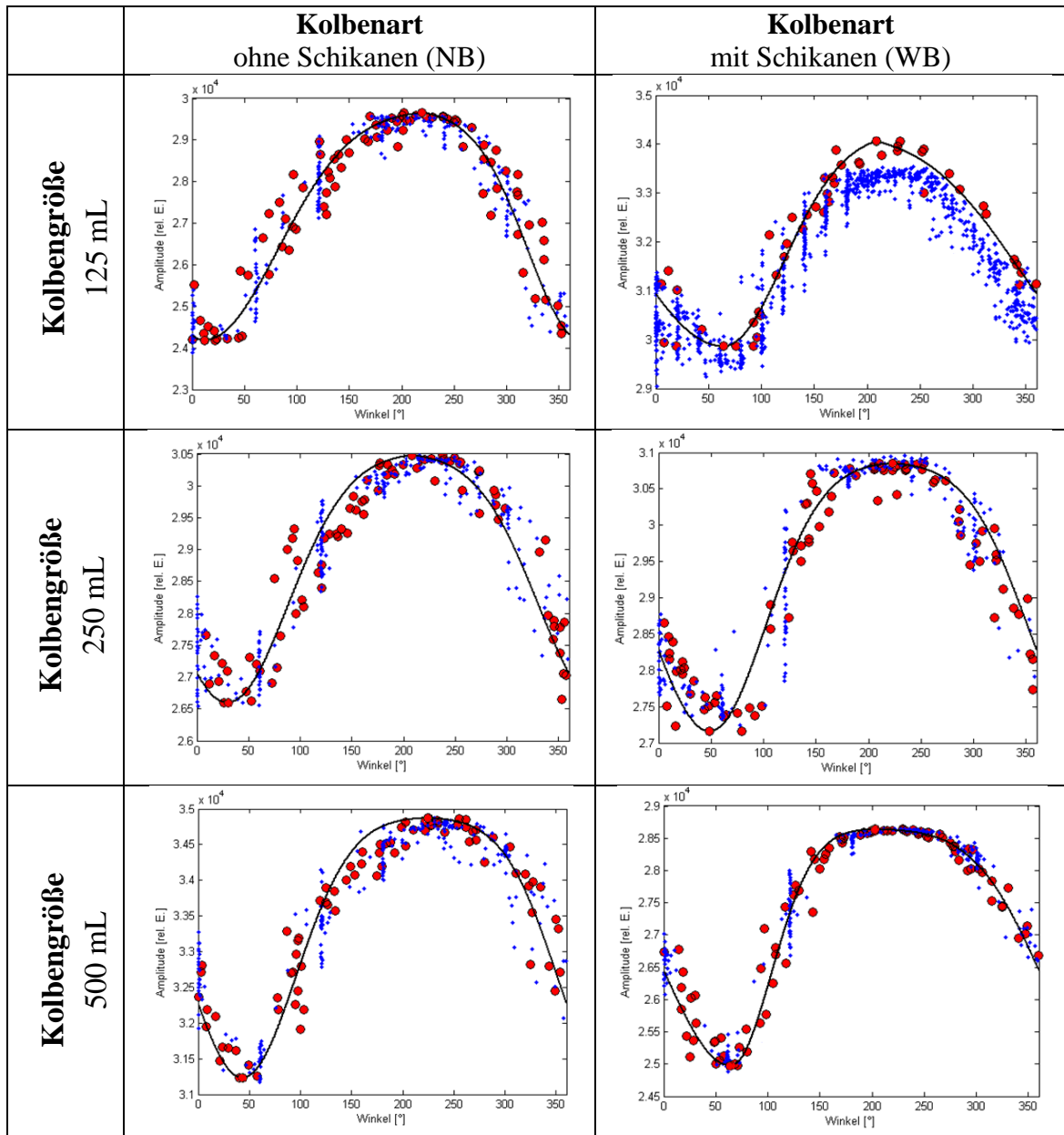


Abbildung 4.22: Verhalten der Flüssigkeitsbewegung konstanter Schüttelfrequenz und variierender Kolbengröße/-art. Das beste Ergebnis ist der Winkel maximaler Amplitude.

Die schwarzen Linien entsprechen dem entwickelten Algorithmus zur nicht linearen Anpassung. Die Berechnung erfolgte mit *Matlab*. Der Mittelwert der maximalen Amplitude liegt bei 100 rpm und 20% Füllvolumen bei 214,4°. Die erhaltenen optimalen Trigger für die oben dargestellten Messbedingungen weichen in diesem Beispiel nur geringfügig ab (2,3 - 5,3%). Im Bereich niedriger Schüttelgeschwindigkeit ist der Winkel der maximalen Amplitude unabhängig von Kolbengröße und -art. Eine allgemeingültige lineare Regression, die ausschließlich abhängig von der Drehzahl des Tischschüttlers ist, ist jedoch nicht möglich. Wird die Geschwindigkeit der Flüssigkeit im Kolben erhöht, verändert sich das Verhalten deutlich. Das Plateau des Wellenbergs wird durch die Flüssigkeitsverteilung im Schüttelbetrieb beeinflusst. Die Ausbildung

dieser Form hängt von den betrachteten Messparametern ab. Allgemein gilt, dass eine hohe Geschwindigkeit und ein geringes Füllvolumen zu einem kleinen Plateau führen. Die Einstellung des Winkels muss in diesem Grenzfall möglichst genau erfolgen, da bereits geringe Abweichungen um $\pm 20^\circ$ zu einer deutlichen Reduzierung in der maximalen Amplitude führen. Bei einem größeren prozentualen Füllvolumen und einer geringeren Schüttelfrequenz vergrößert sich dieses Plateau auf einen Δ Winkel von $121,6^\circ$ bei 100 rpm und von $66,6^\circ$ bei einem Füllvolumen von 30%. In Abbildung 4.23 ist die Veränderung der Flüssigkeitsform im rotierenden System in Abhängigkeit zu Schüttelfrequenz und Füllvolumen dargestellt.

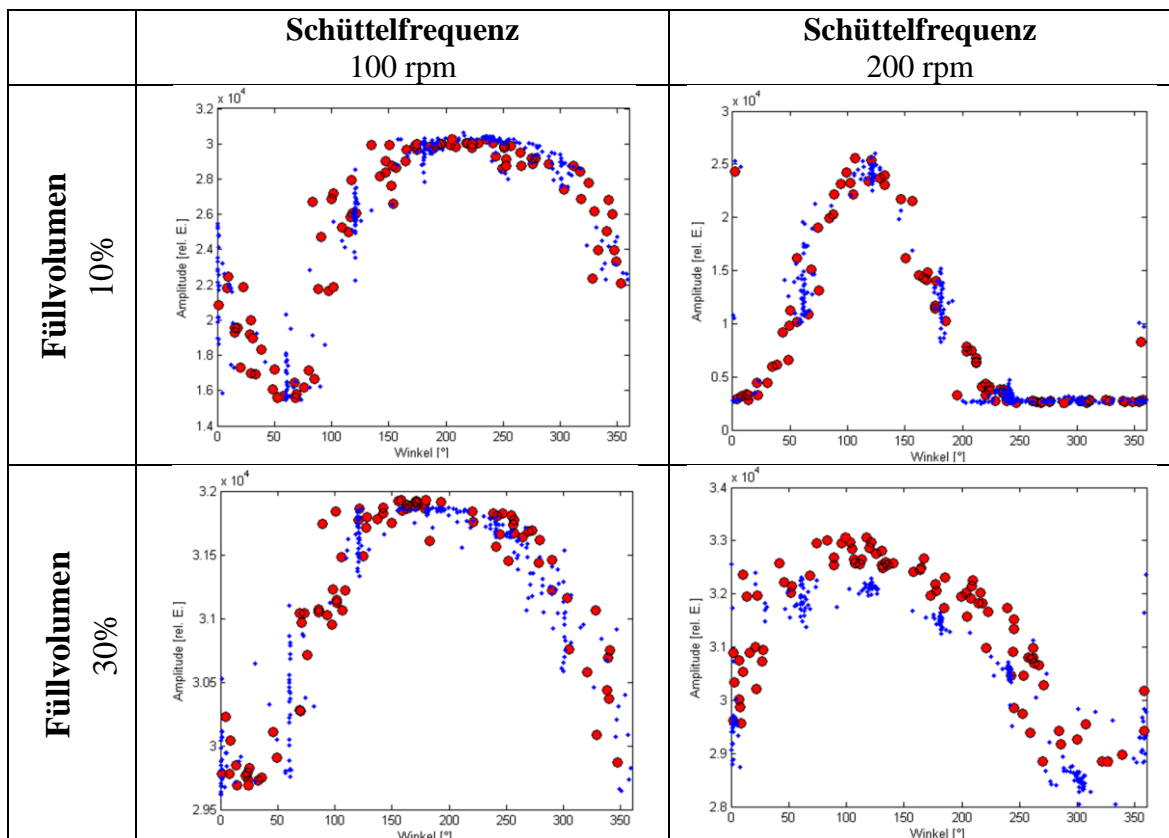


Abbildung 4.23: Einfluss der Schüttelfrequenz und des Füllvolumens auf die Ausbildung der Sichelform und das maximale Amplitudensignal bei einem NB-Kolben von 250 mL.

Weiterhin zeigt ein Vergleich zwischen NB- und WB-Kolben eine unterschiedliche Ausbildung der Form der Flüssigkeit. Schikanierte Kolben weichen stärker vom typischen Verhalten ab als Kolben ohne Wellenbrecher. Bei ihnen bildet sich neben dem großen Flüssigkeitsberg noch ein zweiter aus, der als Flüssigkeit identifiziert werden konnte, die durch die Schikanen in der Geschwindigkeit abgebremst wurde. Eine Wiedergabe der Flüssigkeitsverteilung ist durch den entwickelten Algorithmus in diesem Fall extrem schwierig. Die Erhöhung des Füllvolumens auf 20% zeigt jedoch eine Angleichung des Signalverhaltens zwischen den beiden Kolbenarten. Der zweite Wellenberg verschwindet und der entwickelte Algorithmus kann das

Schwingungsverhalten unter vorherrschenden Bedingungen wiedergeben. Der optimale Triggerwinkel für die maximale Amplitude ist von der Ausbildung der Form jedoch nicht abhängig und muss bei der Findung diesbezüglich auch nicht berücksichtigt werden. Es wird lediglich die Anpassungsfunktion erschwert (Abbildung 4.24).

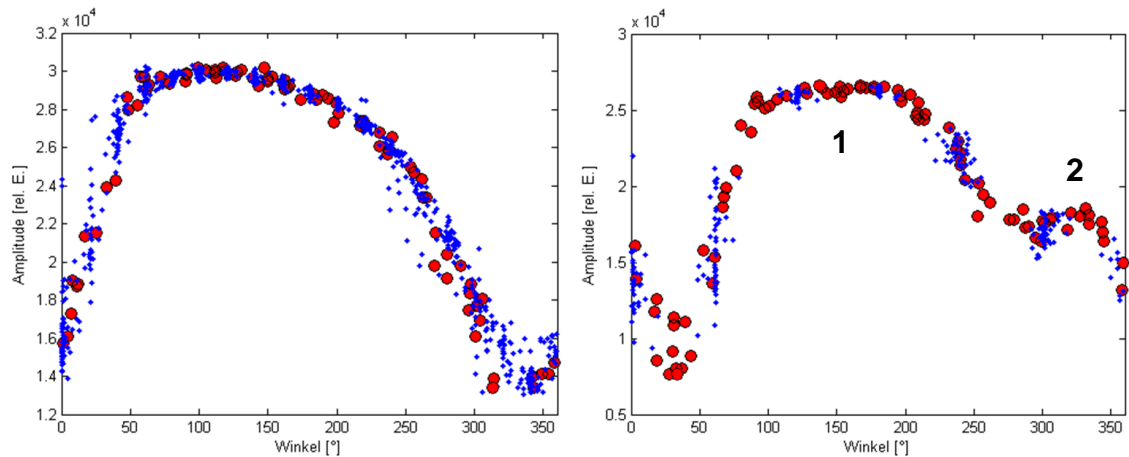


Abbildung 4.24: Abhängigkeit des Signalverhaltens von der Kolbenart. Links: Bei NB-Kolben bildet sich nur ein Wellenberg aus. Rechts: WB-Kolben führen bei geringem Füllvolumen zu der Ausbildung von zwei Flüssigkeitsbergen (1: von Schikanen unbeeinflusster Flüssigkeitsberg; 2: von Schikanen abgebremste Flüssigkeit).

Zusammenfassend gilt, dass die Einstellung des optimalen Triggerwinkels hauptsächlich von der Geschwindigkeit der Tischschüttlers abhängt. Die Art des Kolbens verändert zwar die Form der Flüssigkeitsverteilung im Bereich geringen Füllvolumens, führt jedoch ähnlich wie die Größe des Kolbens zu keiner Verschiebung der Lage des optimalen Winkels. Die Schwierigkeit einer allgemeinen automatischen Winkeleinstellung besteht in der Anpassung des Messalgorithmus, der dieses Verhalten genau beschreiben muss. Durch das Kolbenscreening konnte eine lineare Abhängigkeit zwischen Drehzahl und Winkel der maximalen Amplitude innerhalb konstanter Messparameter gefunden werden (Einzelkalibrationen siehe Abschnitt B1.5, S. 127). Durch einen Toleranzbereich, der durch die Breite des Plateaus beschrieben wird, können einzelne Regressionen gleichen Füllvolumens jedoch auch zusammengefasst werden (Abbildung 4.25, unten).

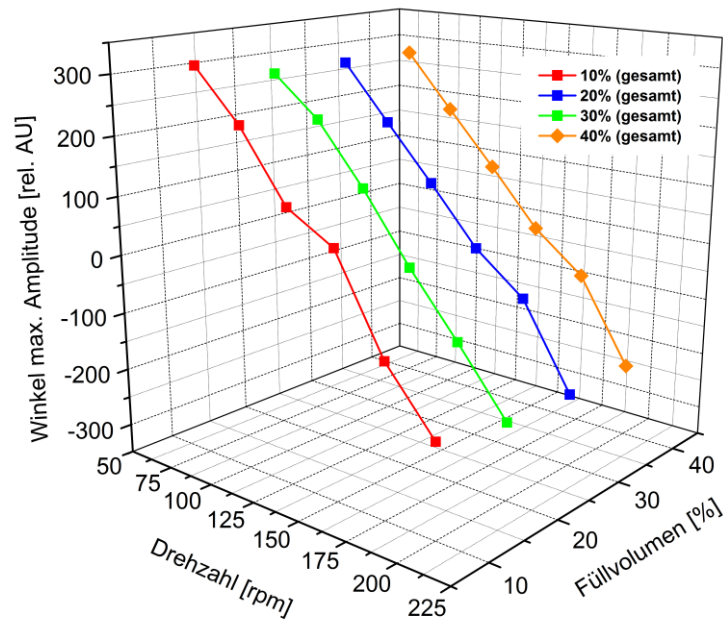


Abbildung 4.25: Abhängigkeit der Anpassungsfunktionen vom Füllvolumen. Zu sehen ist das ähnliche Verhalten unterschiedlicher Füllvolumina.

In Tabelle 4.3 sind hierzu exemplarisch die Anpassungsfunktionen der vier ausgewählten Volumina zur Berechnung des Winkels maximaler Amplitude gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Güte der linearen Regression mit zunehmendem Volumen im Kolben zunimmt.

Tabelle 4.3: Anpassungsfunktionen optimaler Triggerwinkel (verallgemeinert auf Füllvolumen).

Messbedingungen	Lineare Regression
10% Füllvolumen (allgemein)	$y = -4,02 \cdot x + 627,20;$ $R^2 = 0,983$
20% Füllvolumen (allgemein)	$y = -4,08 \cdot x + 607,80;$ $R^2 = 0,994$
30% Füllvolumen (allgemein)	$y = -3,90 \cdot x + 578,04;$ $R^2 = 0,991$
40% Füllvolumen (allgemein)	$y = -4,14 \cdot x + 596,91;$ $R^2 = 0,996$

Je mehr Flüssigkeit sich im Kolben befindet, desto weniger „Ausreißer“ werden registriert, die dieser Anpassungsfunktionen nicht folgen. Dies wird in Verbindung mit dem erhaltenen Amplitudensignal verständlich, denn die Möglichkeit einer Abweichung durch Signaldifferenz (Unterschied zwischen min. und max. Amplitude) sinkt mit steigendem Volumen. In Abbildung 4.26 (unten) ist dargestellt, dass dieses Verhalten in allen untersuchten Schüttelgeschwindigkeiten zu beobachten ist. Ab einem Füllvolumen von 30% (vgl. Abschnitt 4.1.3, S. 28f.) ist die Amplitudendifferenz unabhängig von der Schüttelgeschwindigkeit.

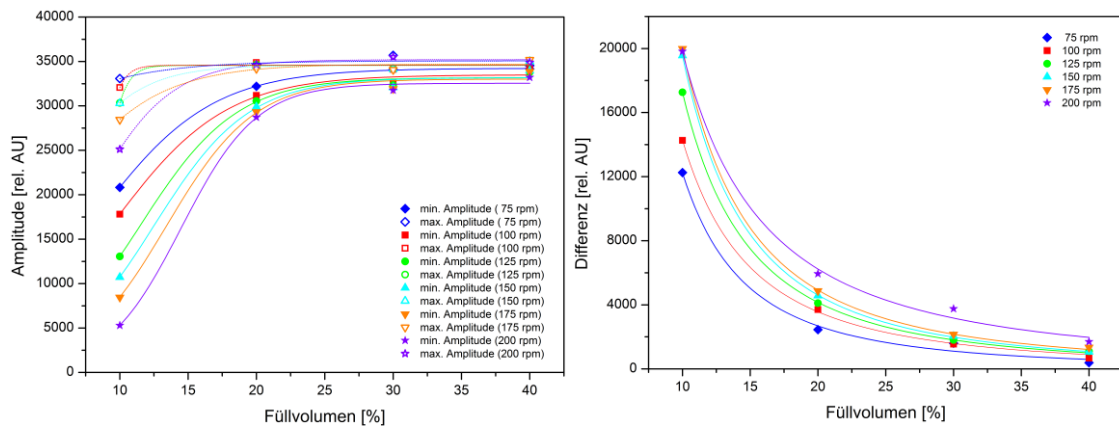


Abbildung 4.26: Amplitudenabhängigkeit vom Füllvolumen. Exemplarische Darstellung für Kolbengröße 500 mL (NB).

Anhand der gesamten experimentellen Reihe ist zu überlegen, ob eine Hinterlegung mehrerer Anpassungsfunktionen, die abhängig von Schüttelfrequenz, Füllvolumen und weiteren Faktoren sind, in die Software sinnvoll ist. Die Erstellung und Validierung solcher Regressionen ist sehr zeitaufwändig und würde den potentiellen Verbraucher des Multisensorgeräts in der Wahl des zu verwendeten Volumens einschränken. Es konnte zwar gezeigt werden, dass eine Verallgemeinerung auf das Füllvolumen durchführbar ist, diese jedoch bereits Spielraum für Ausreißer bietet. Eine Alternative zu einer Hinterlegung von Anpassungsfunktionen ist eine automatische Bestimmung der optimalen Einstellung vor jedem Experiment durch eine Eigenkalibration. Hierzu muss das Messgerät vor Beginn der Messung ca. 5-10 min einen Selbsttest durchführen und währenddessen den optimalen Triggerwinkel durch interne Bestimmung des Amplitudenmaximums festlegen. Eine Kombination aus beiden Möglichkeiten wäre ebenfalls denkbar.

4.2.2 Einfluss der Viskosität auf die Streulichtmessung

In den bisherigen Experimenten wurde gezeigt, dass eine optimierte Anpassung der Messauslösung manuell und teilweise automatisiert möglich ist. Die Schritte zur Messzeitregulierung werden unter der Annahme durchgeführt, dass die Flüssigkeit im Kolben bei einer konstanten Geschwindigkeit rotiert. Aus dem biotechnologischen Bereich ist jedoch bekannt, dass sich während Kultivierungsexperimenten mit der Zunahme der Zellkonzentration ebenfalls die Viskosität der Suspension verändert [64]. Eine Änderung dieser physikalischen Eigenschaft könnte einen Einfluss auf die Rotationsbewegung der Flüssigkeit haben. Um zu überprüfen, ob die Zunahme der Viskosität eine Verschiebung des optimalen Triggerwinkels verursacht, wurde eine experimentelle Reihe durchgeführt, in der unterschiedliche Lösungen definierter

Viskosität untersucht wurden. Als Zusatz wurde Glycerin verwendet. Zunächst wurde die Verdünnungsreihe Formazin-Glycerin bei einer $OD_{600} = 2,0$ untersucht, anschließend die Messungen mit der klassischen Verdünnungsreihe von Wasser und Glycerin wiederholt. Der Ablauf der Intensitätsmessungen erfolgte gemäß den experimentellen Messreihen aus Abschnitt 4.2.1 (S. 41f.).

Um eine konstante OD zu halten, wurde die benötigte Wassermenge zur Verdünnung prozentual mit Glycerin ausgetauscht. Wird von einer unverdünnten Formazinlösung ausgegangen, bedeuten 100% Glycerin in diesem Fall, dass die Verdünnung auf $OD_{600} = 2,0$ ohne weitere Zugabe von Wasser erfolgte. Dies entspricht bei $T = 30\text{ °C}$ einer Viskosität von $22,42\text{ mPa} \cdot \text{s}$ [65]. Weitere Daten sind Tabelle 4.4 zu entnehmen.

Tabelle 4.4: Einfluss der Viskosität auf das max. Amplitudensignal bei $OD_{600} = 2,0$.

Glycerin	Viskosität $\eta_{30\text{ °C}}$	Winkel max. Amplitude	Max. Amplitude
[%]	[mPa · s]	[°]	[rel. AU]
0	0,80	309,1	13.150
50	2,56	314,1	11.250
60	3,74	316,0	9.162
70	5,72	327,1	8.894
80	8,06	319,5	8.030
90	12,19	319,1	7.439
100	22,42	323,1	6.599

Ohne Glycerin ist unter gleichen Messbedingungen bei einer $OD_{600} = 2,0$ ein ähnliches winkelabhängiges Verhalten im Vergleich zu einer unverdünnten Formazinlösung zu beobachten (vgl. Abbildung 4.21, S. 43 und Abbildung 4.27, unten). Die Zugabe von Glycerin bei einer konstanten OD führt zunächst zu einem stärker verrauschten Signal, so dass eine automatische Bestimmung durch den entwickelten Algorithmus nicht möglich ist. Die manuelle Bestimmung mit Matlab zeigt, dass durch Erhöhung der Viskosität der optimale Winkel nicht verschoben wird (Abbildung 4.27, unten). Dieser schwankt in der experimentellen Reihe um $318 \pm 9^\circ$. Die Berechnung des Triggerwinkels nach Tabelle 4.3 (S. 47) führt zu 355° . Die Abweichung zu diesem Wert kann durch das Plateau der Flüssigkeit kompensiert werden.

Glycerin führt jedoch zu einer Veränderung des optischen Verhaltens. Es ist zu beobachten, dass trotz gleichbleibender OD mit zunehmender Glycerinkonzentration die maximale Amplitude linear abnimmt (vgl. Abschnitt B1.6, S. 128). Weiterhin ist im Signalverhalten beim Flüssigkeitsminimum ($\sim 200^\circ$) eine Anomalie zu erkennen. Befindet sich wenig Flüssigkeit über dem Sensor, führt dies zu einer Erhöhung des Streulichtwerts, wie in Abbildung 4.27 (rechts) zu sehen ist.

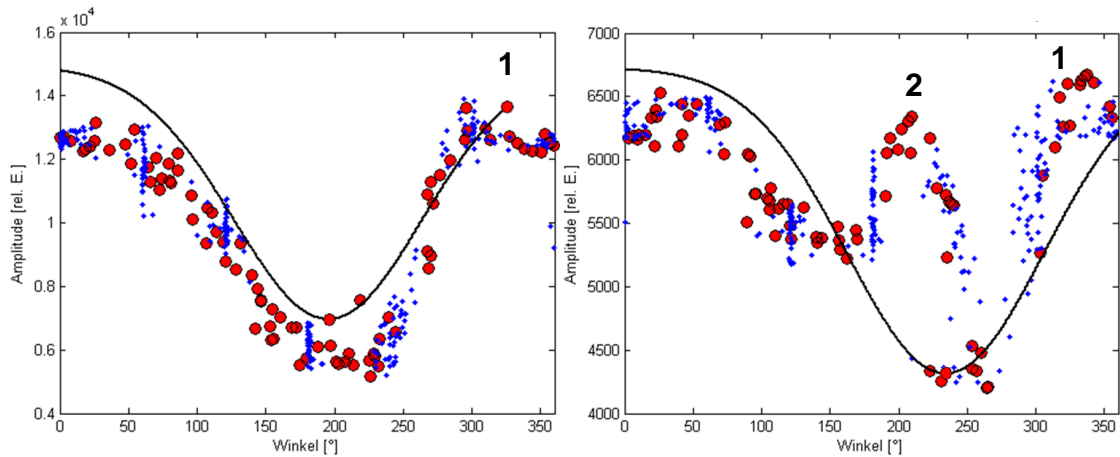


Abbildung 4.27: Einfluss der Viskosität auf die Anpassung der Messzeitregulierung ($OD_{600} = 2,0$) am Beispiel von Kolbengröße 125 mL und Füllvolumen 20% bei 150 rpm (1: Signal bei Flüssigkeitsmaximum; 2: Signal bei Flüssigkeitsminimum). Links: 0% Glycerin (Wasser). Rechts: 100% Glycerin.

Das oben dargestellte Phänomen kann durch den stärkeren Zusammenhalt der Moleküle bei hoher Viskosität erklärt werden. Die Ausbildung der rotierenden Flüssigkeit formt sich zu einem schmalen Peak, wodurch im geschüttelten System im Minimum der Flüssigkeit (Wellental) noch weniger Flüssigkeit zur Verfügung steht. Hierdurch erhöht sich das Reflexionspotential der Grenzfläche. In Abbildung 4.28 ist dieses Verhalten bei der klassischen Verdünnungsreihe von Wasser-Glycerin festgehalten.

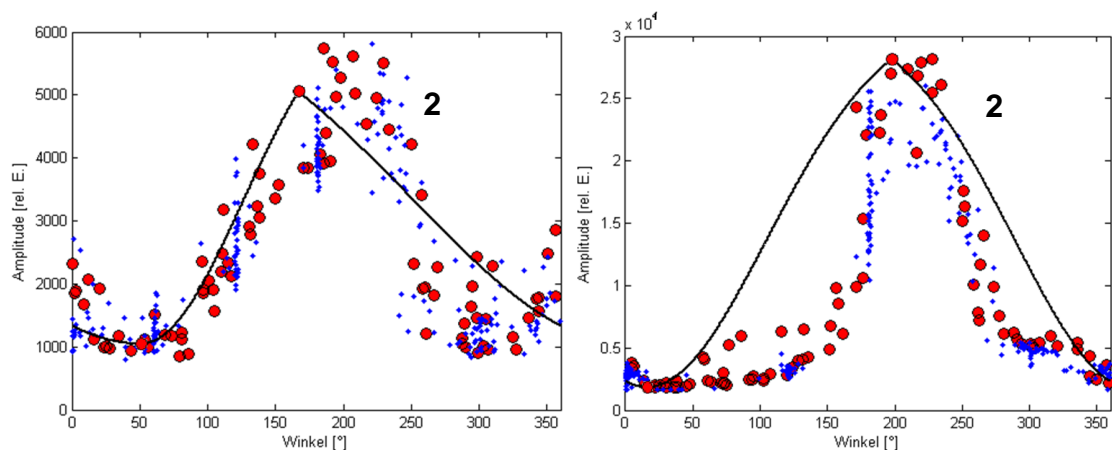


Abbildung 4.28: Einfluss der Viskosität auf die Anpassung der Messzeitregulierung ($OD_{600} = 0$) am Beispiel von Kolbengröße 125 mL und Füllvolumen 20% bei 150 rpm (2: Signal bei Flüssigkeitsminim). Links: 0% Glycerin (Wasser). Rechts: 100% Glycerin.

Eine klare Flüssigkeit zeigt im Hinblick auf die maximal mögliche Amplitude bei dem vorgestellten Streulichtsensor ein inverses Verhalten zu Trübungsmessungen gleicher Messbedingungen (Tabelle 4.5, unten). Dies kann durch einen zweiten physikalischen Effekt beschrieben werden. Das eingestrahelte Licht der LED wird nicht an den Teilchen innerhalb der Lösung gestreut, sondern an der Phasengrenze zwischen Flüssigkeit und

Luft reflektiert. Je weniger Flüssigkeit sich über dem Sensor befindet, desto mehr reflektiertes Licht wird von der Photodiode detektiert. Abbildung 4.28 (oben) zeigt genau dieses Verhalten. Ein Vergleich unterschiedlich viskoser Trübungslösungen (Abbildung 4.27, S. 50) führt zu der Erkenntnis, dass mit zunehmender Viskosität bei wenig Flüssigkeit im Detektionsbereich das Streulichtsignal durch Grenzflächenreflexionen überlagert wird (vgl. Abschnitt 4.2.3, S. 51).

Tabelle 4.5: Einfluss der Viskosität auf das max. Amplitudensignal bei $OD_{600} = 0$.

Glycerin [%]	Viskosität $\eta_{30\text{ °C}}$ [mPa · s]	Winkel max. Amplitude [°]	Max. Amplitude [rel. AU]
0	0,80	207,0	5.606
10	1,03	210,6	6.172
20	1,52	214,7	7.525
30	2,16	213,5	7.397
40	3,45	215,4	7.698
50	3,68	222,3	7.732
60	10,34	211,3	8.259
70	22,42	214,2	8.054
80	49,87	214,8	7.023
90	181,38	218,3	8.120
100	597,92	209,1	27.360

4.2.3 Streuverhalten geringer optischer Dichten

Im vorgestellten Prototyp erfolgt die automatisierte nephelometrische Messung bei einer konstanten Lichtstärke. Aus den bisherigen Experimenten ist bekannt, dass zwischen der Höhe des Amplitudensignals und dem Füllvolumen im Kolben eine direkte Abhängigkeit besteht. Abbildung 4.29 (unten) zeigt beispielhaft anhand einer Formazinslösung, dass diese volumenabhängige Amplitude mit zunehmender optischer Dichte im Bereich geringen Füllvolumens stärker ausgeprägt ist. Die Eindringtiefe des Lichts in die Suspension wird mit steigender Anzahl der vorhandenen Partikel reduziert. Im Bereich geringer Trübung ist die Eindringtiefe größer. Aus der Grenzwertbetrachtung folgt, dass das maximal erreichbare Messsignal in Suspensionen geringer optischer Dichten niedriger ist.

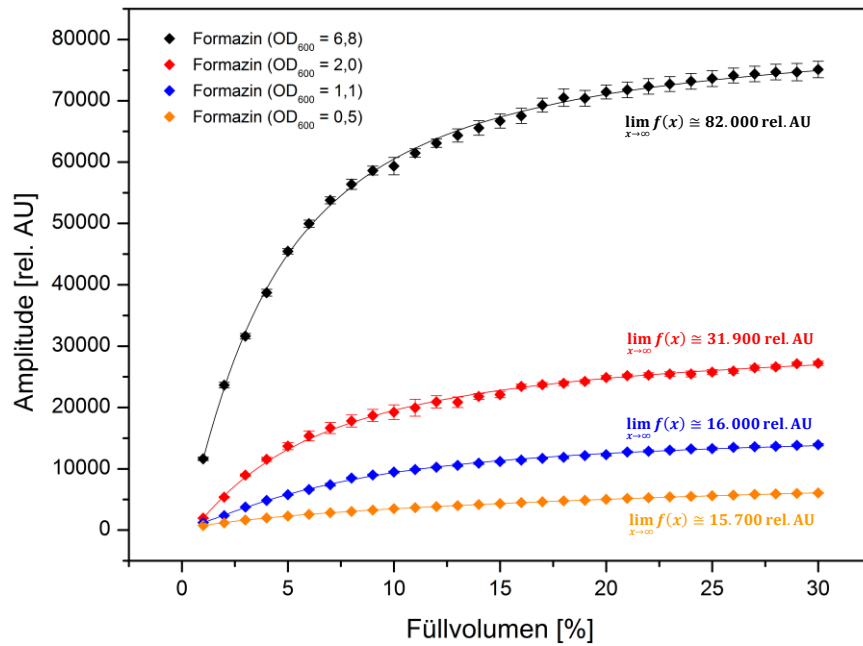


Abbildung 4.29: Abhängigkeit des Streulichtsignals vom Füllvolumen unterschiedlicher optischer Dichte am Beispiel von Formazin ohne Schüttelbewegung (Ruhelage).

Für die nephelometrische Messung ist eine Mindestanzahl an Partikeln im Detektionsbereich des Sensors notwendig. Neben dem Prozess der Streuung nimmt die Intensität des emittierten Lichts gemäß dem photometrischen Entfernungsgesetz mit zunehmender Distanz von der Lichtquelle ab (vgl. Abbildung 4.11, S. 31). Die Erhöhung der optischen Dichte führt zu einer Verringerung der Eindringtiefe. Ist die Eindringtiefe hingegen groß, kann ein zweiter physikalischer Vorgang das Signal des Streuprozesses überlagern (Fazit aus Abschnitt 4.2.2, S. 48f.).

Um die Prognose der reflektierenden Phasengrenze zu bestätigen, wurden diverse Untersuchungen durchgeführt. Ausgehend von der theoretischen Betrachtung des Streulichtverhaltens unterschiedlicher Grenzfälle, wurde die winkelabhängige Amplitude der Verdünnungsreihe Formazin-Wasser untersucht, um das unterschiedliche Verhalten definierter Trübungen zu vergleichen. Anschließend wurde der physikalische Effekt der Grenzflächenreflexion durch einen umgebauten Schüttelkolben mit höhenverstellbarer Messzone nachgewiesen.

Das mögliche theoretische Verhalten einer Streulichtmessung in Abhängigkeit vom Suspensionsgrad ist in Abbildung 4.30 (unten) schematisch dargestellt.

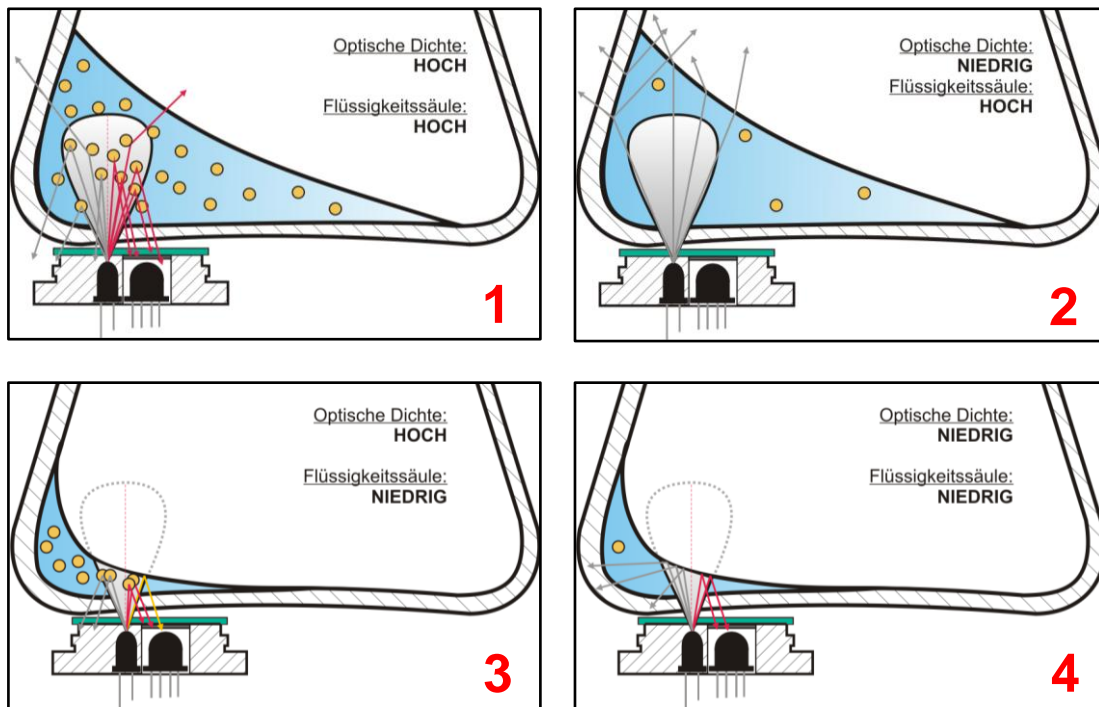


Abbildung 4.30: Theoretisches Verhalten von Streulichtmessung bei unterschiedlichen Trübungswerten.

In (1) sind die idealen Bedingungen einer nephelometrischen Messung gezeigt. Ist während der Messung die maximale Flüssigkeitshöhe über dem Sensor und zusätzlich ausreichend suspendierte Flüssigkeit vorhanden, wird ausschließlich Streulicht detektiert. Die Eindringtiefe des Lichts ist so gering, dass äußere Störfaktoren (u.a. Grenzflächenreflexionen) keinen Einfluss auf das Messsignal haben. Der detektierte Messwert setzt sich aus einem Grundsignal und dem Streulicht zusammen. Im Fall einer sehr geringen optischen Dichte (2) ist hier kein Streulicht messbar, da keine Partikel für den Streuprozess zur Verfügung stehen. Das Licht breitet sich radial aus und der Messwert entspricht dem Grundsignal. Ist in diesem Fall zusätzlich die Flüssigkeitshöhe gering (4), wird nach der Theorie die überschüssige Intensität des eingestrahlt Lichts für die Reflexion an der Phasengrenze aufgewandt. Es ist ein erhöhtes Signal im Flüssigkeitsminimum zu beobachten. Der Messwert setzt sich aus der Grenzflächenreflexion und dem Grundsignal zusammen. Dieser Störfaktor ist ebenfalls im Flüssigkeitsminimum bei Suspensionen hoher optischer Dichten zu beobachten, solange die auf die Phasengrenze auftreffende Lichtintensität so hoch ist, dass Reflexionen ebenfalls durch die trübe Lösung zurückreflektieren können (3). Der Messwert ergibt sich aus dem Grundsignal, der Grenzflächenreflexion und dem Streulicht. Eine reproduzierbare Kalibration des Streulichtwerts in eine bekannte Basisgröße ist in diesem Fall nicht möglich.

Das o.g. Verhalten bei der Streulichtmessung konnte anhand der Verdünnungsreihe Formazin-Wasser aus Abschnitt 4.2.2 (S. 48f.) bestätigt werden. Hierbei wurde die winkelabhängige Amplitude in Abhängigkeit zur optischen Dichte bestimmt und

miteinander verglichen. Die Intensitätsmessungen erfolgten jeweils unter den gleichen Messbedingungen (125 mL, WB, 20%, 150 rpm). Abbildung 4.31 zeigt eine Auswahl von drei Suspensionen unterschiedlicher optischer Dichten.

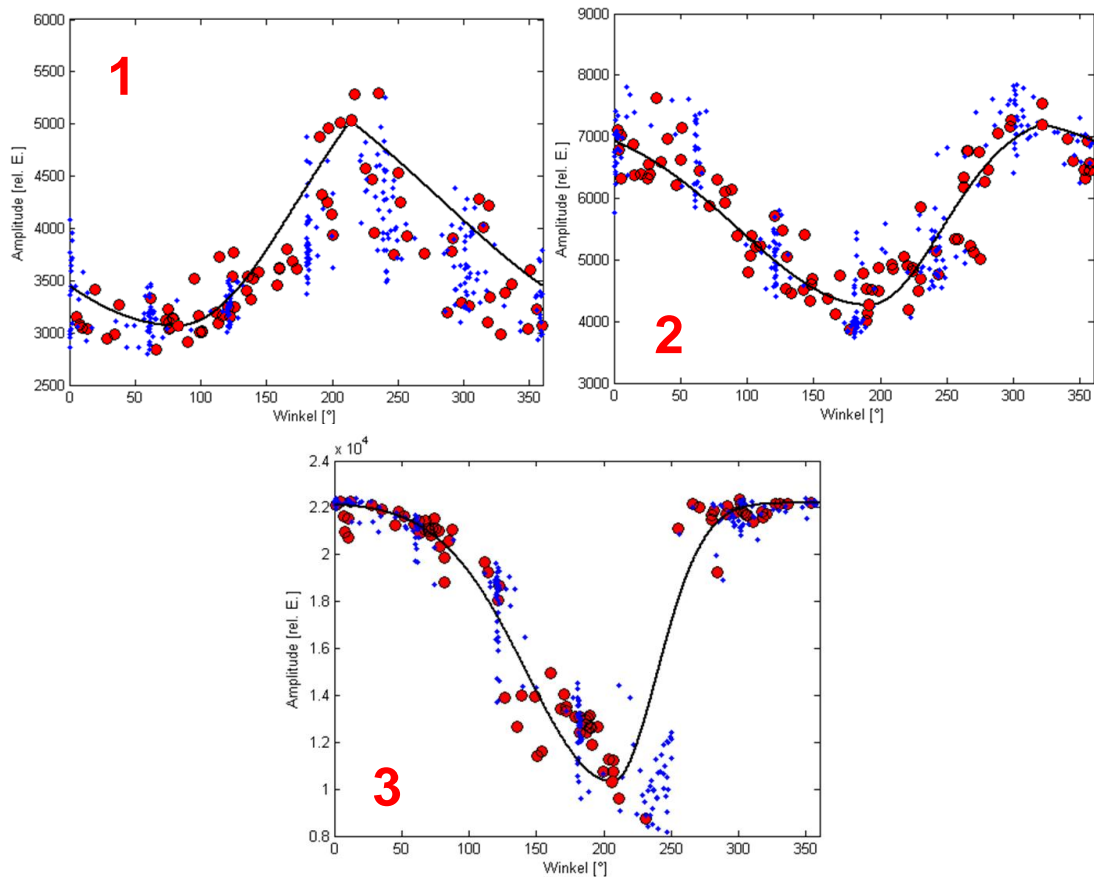


Abbildung 4.31: Signalverhalten unterschiedlicher optischer Dichten bezogen auf den Triggerwinkel bei definierten Messbedingungen (125 mL, WB, 20%, 150 rpm). 1: 4% Formazin ($OD_{600} = 0,3$). 2: 10% Formazin ($OD_{600} = 0,8$). 3: 60% Formazin ($OD_{600} = 4,3$).

Aus den vorherigen Abschnitten ist bekannt, dass bei einer Geschwindigkeit von 150 rpm der Wellenberg der Flüssigkeit bei $ca. 355 \pm 35^\circ$ liegt. Im Bereich geringer Trübung (Abbildung 4.31, 1) befindet sich die Amplitude mit einem maximalen Signal von 5.838 rel. AU im Flüssigkeitsminimum. Dies bestätigt das zuvor prognostizierte Signalverhalten aus Abbildung 4.30, 4 (S. 53). Das Messrauschen hat im Vergleich zu höherer OD zugenommen. Grund hierfür ist die irreguläre Grenzflächenreflexion der sich bewegenden Wasseroberfläche. Zum Zeitpunkt hoher Flüssigkeitssäule wird gemäß der erstellten Prognose ein geringeres Amplitudensignal von 2.736 rel. AU beobachtet (vgl. Abbildung 4.30, 2, S. 53). Im Bereich geringer optischer Dichte ähnelt das Signalverhalten einer klaren wässrigen Lösung. Ab einer optischen Dichte von $OD_{600} \approx 0,8$ invertiert dieses Verhalten (Abbildung 4.31, 2). Sowohl das maximale (7.199 rel. AU) als auch das minimale Amplitudensignal (4.266 rel. AU) entsprechen dem Verhalten einer unverdünnten Formazinlösung (Signalmaximum bei

Flüssigkeitsmaximum). Je weiter der Suspensionsgrad steigt, desto stärker sinkt das Messrauschen im Bereich hoher Flüssigkeitssäule über dem Sensor (Abbildung 4.31, 3, oben). Einen gesamten Überblick über das Signalverhalten in Abhängigkeit zur OD_{600} zeigt Abbildung 4.32.

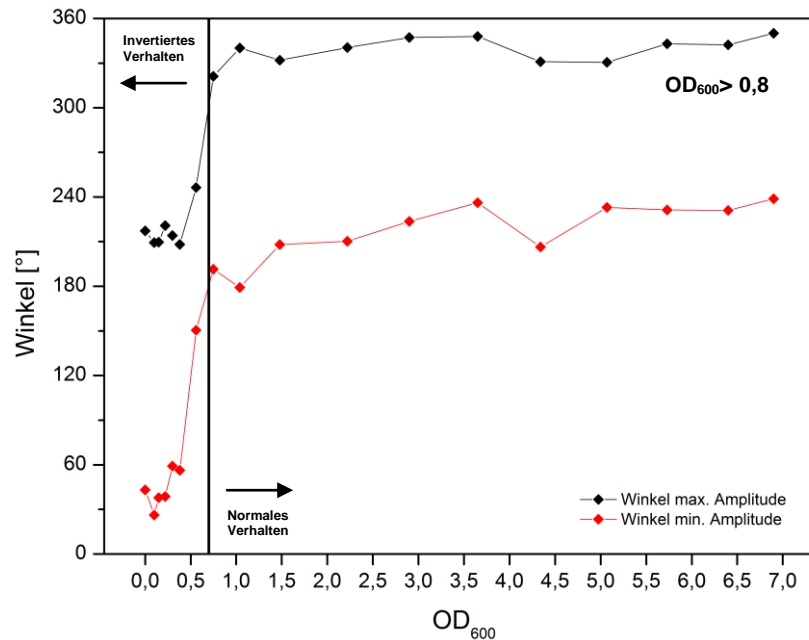


Abbildung 4.32: Abhängigkeit des Triggerwinkels vom Suspensionsgrad der Lösung. Exemplarisch an einer Verdünnungsreihe von Formazin-Wasser (125 mL, WB, 20%, 150 rpm).

Die Inversion des Signalverhaltens zwischen hoher und niedriger Trübung ist deutlich zu erkennen. Es kann eine Klassifizierung in zwei unterschiedliche Verhaltensweisen erfolgen: wasserähnliches und formazinähnliches Verhalten. Wasserähnliches Verhalten ist bei einer $OD_{600} < 0,8$ zu beobachten (Abbildung 4.31, 3). Oberhalb dieses Trübungsgrads entspricht die Einstellung der winkelabhängigen Amplitude dem normalen Verhalten. Der Grund für das inverse Verhalten bei Messungen geringer optischer Dichten ist das erhöhte Messsignal durch den zusätzlichen Vorgang der Grenzflächenreflexion.

Um den Einfluss der Grenzflächenreflexion auf die Messungen im Prototyp zu verifizieren, wurde eine experimentelle Reihe durchgeführt, bei der im geschüttelten System die durchschnittliche Intensität einer klaren Lösung durch Höhenverstellung einer Blende (matte Kunststoffblende) gemessen wurde. Die Intention dieser Messreihe war es, das unterschiedliche Rauschverhalten in Abhängigkeit von der Position der Blende (ober-/unterhalb der Flüssigkeitsgrenze) zu beobachten. Besitzt die Grenzfläche einen störenden Einfluss auf die Messung, steigt die Standardabweichung ab der Höhe deutlich an, bei der sich die Blende über der Flüssigkeitsgrenze befindet. Für die Messungen wurde ein Corning-Schüttelkolben mit einer höhenverstellbaren Blende versehen, wie in Abbildung 4.33 (unten; rechts) dargestellt ist.

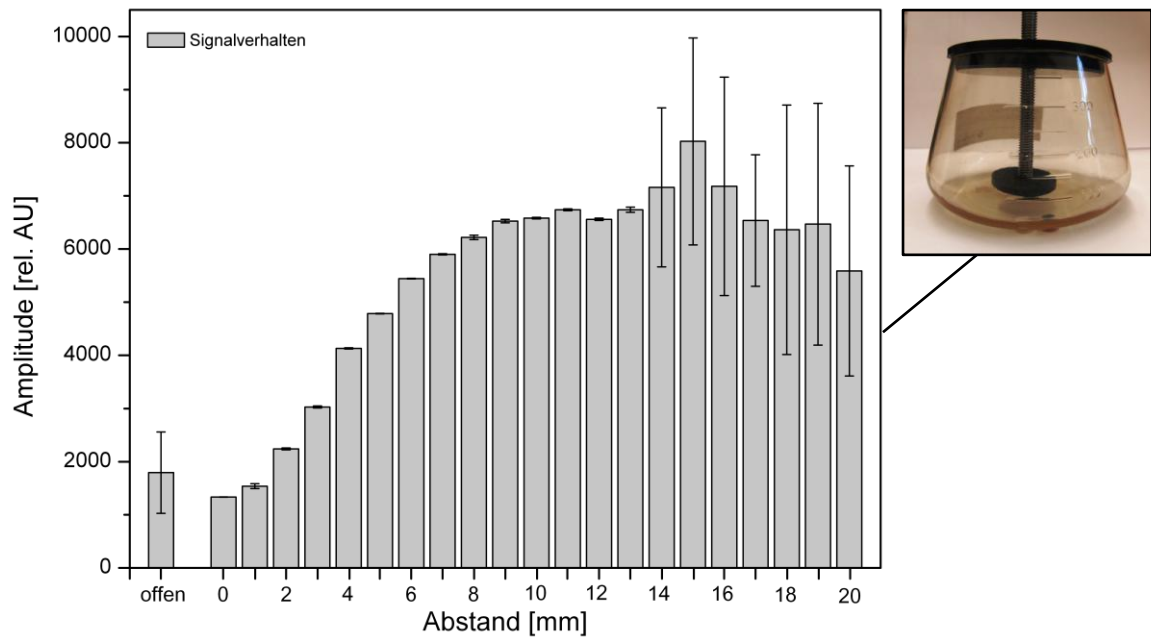


Abbildung 4.33: Verifizierung des Grenzflächeneinflusses auf das Messsignal. Für die Messungen wurde ein herkömmlicher Schüttelkolben (500 mL, NB) verwendet. Für jede Einstellung wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus 50 Messwerten bestimmt.

Bei Abständen von 14 mm und mehr befindet sich die Messblende oberhalb der Wasseroberfläche. Ab dieser Höhe steigt das Messrauschen um einen durchschnittlichen Faktor von 89 an. Zuvor ist trotz des geschüttelten Systems (150 rpm) ein reduziertes Rauschen von $< 1\%$ zu beobachten. Das starke Ansteigen des prozentual gemessenen Fehlers beweist den Einfluss der Grenzflächenreflexion auf das Amplitudensignal.

Mit der schrittweisen Erhöhung der Messblende steigt das Amplitudensignal in der Lösung an, obwohl sich keine Partikel im Detektionsbereich befinden. Der Anstieg des Signalverhaltens bei Erhöhung des Volumens von Wasser konnte ebenfalls in Ruhelage beobachtet werden (vgl. Abbildung B.6, S. 128). Eine Erklärung hierfür liefert das Messprinzip. Das Licht strahlt mit einem für die LED spezifischen Abstrahlwinkel in die Lösung ein. Dabei breitet es sich radial in alle Richtungen aus (vgl. Abbildung 4.11, S. 31). Die matte Oberfläche der Blende absorbiert nicht das komplette Licht. Ein kleiner Anteil wird an der schwarzen Oberfläche reflektiert und erhöht somit das Sensorsignal. Ist die Distanz zwischen Detektor und Messblende gering, sind die Beleuchtungsfläche und die daraus resultierende Reflexionsmöglichkeit ebenfalls gering. Mit zunehmender Entfernung des schwarzen Reflektors von der Lichtquelle erhöht sich die Reflexionsfläche bis zu einem Maximum, der dem Durchmesser der Blende entspricht. Ab einem Abstand von 8 mm ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten.

4.2.4 Eindringtiefe des Lichts

Der Einfluss von Grenzflächenreflexionen im Bereich geringer optischer Dichten verringert die Effektivität des Biomassesensors für biotechnologische Anwendungen enorm. In der für Kultivierungen wichtigen *lag*-Phase kann das Streulicht durch die Überlagerung von Reflexionslicht nicht reproduzierbar wiedergegeben werden. Erst wenn die Eindringtiefe des eingestrahelten Lichts im Detektionsbereich des rotierenden Mediums so klein ist, dass Reflexionen nicht mehr durch die Suspension auf den Detektor gelangen, wird ein hiervon unabhängiges Signal erhalten. Die Kenntnis der relevanten Eindringtiefe ist für das entwickelte Multisensorsystem besonders interessant. Sie ermöglicht die Bestimmung der Mindestflüssigkeitshöhe in Abhängigkeit zur optischen Dichte und gibt somit eine Limitation des Systems an.

Die experimentelle Reihe zur Berechnung der Eindringtiefe wurde exemplarisch mit Formazin und zwei unterschiedlichen Zellsuspensionen (*E. coli* K12, *P. pastoris*) definierter Trübungswerte durchgeführt. Nach dem photometrischen Grundgesetz folgt die Abnahme der Lichtintensität in Suspensionen einer exponentiellen Funktion 1. Grades (Gleichung 4.2, S. 59). Für die entsprechenden Messreihen wurde eine speziell angefertigte Apparatur verwendet (Abbildung 4.34).

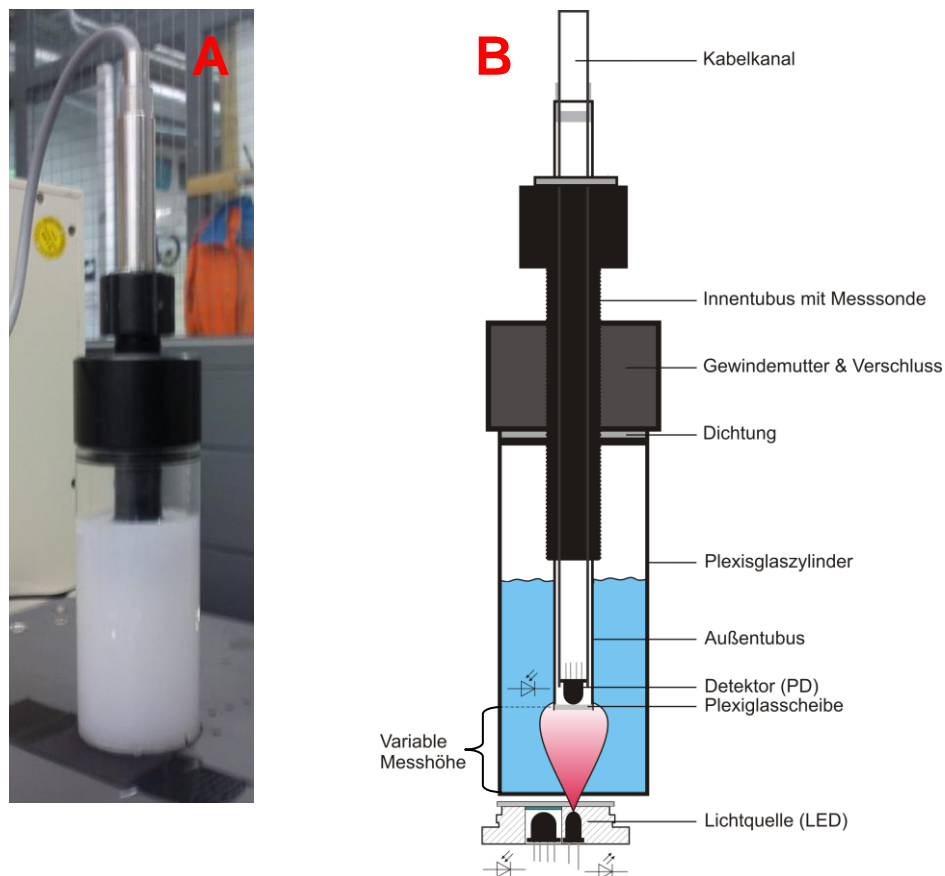


Abbildung 4.34: Experimenteller Aufbau zur Bestimmung der Eindringtiefe in unterschiedlichen Suspensionslösungen. **A:** Fotografie des Messzylinders. **B:** Schematischer Aufbau der experimentellen Reihe.

Die Abbildung zeigt die entwickelte Apparatur, bestehend aus einem lichtdurchlässigen Plexiglaszylinder und einem höhenverstellbaren Innentubus. In diesem befindet sich eine Photodiode, die mit einem Signalverstärker und Oszilloskop verbunden ist. Der Außentubus ist am Boden mit einer Plexiglasscheibe ausgestattet, so dass einfallendes Licht detektiert werden kann. Für die hierdurch ermöglichten Transmissionsmessungen wurde die baugleiche Photodiode verwendet, die bereits in den Multisensor integriert wurde [66]. Die Apparatur wurde zentrisch über der LED des nephelometrischen Sensors positioniert. Die optoelektronischen Komponenten der pO_2 - und pH-Sensoren wurden für die experimentelle Reihe abgedeckt. Über das millimetergenaue Gewinde sind Messungen der Intensitätsabnahme des vom Sensor ausgesandten Lichts in unterschiedlichen Höhen und optischen Dichten möglich. Im Gegensatz zur experimentellen Reihe der Grenzflächenreflexion (Abbildung 4.33, S. 56) erfolgten die Messungen in Ruhelage. Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Oszilloskopmessungen wurde für jede Höhe der Mittelwert aus 10 Messungen bestimmt.

Bei jeder Messauslösung durch den Multisensorprototyp wurde die Intensität der LED als Signalpeak mit Hilfe des Oszilloskops gemessen. Im Bereich höherer optischer Dichte und größeren Entfernungen wurden hierbei breitere Peaks beobachtet, die sich asymptotisch einem Grenzwert annäherten. Um einen Zusammenhang zwischen Entfernung und Intensität zu erhalten, wurde jeweils das Peakmaximum in Abhängigkeit zur Distanz gesetzt. Die Sensitivität des Oszilloskops betrug maximal 3.000 mV. In Abbildung 4.35 ist das exponentielle Verhalten der untersuchten Suspensionen exemplarisch mit Formazin unterschiedlicher OD-Wertedargestellt.

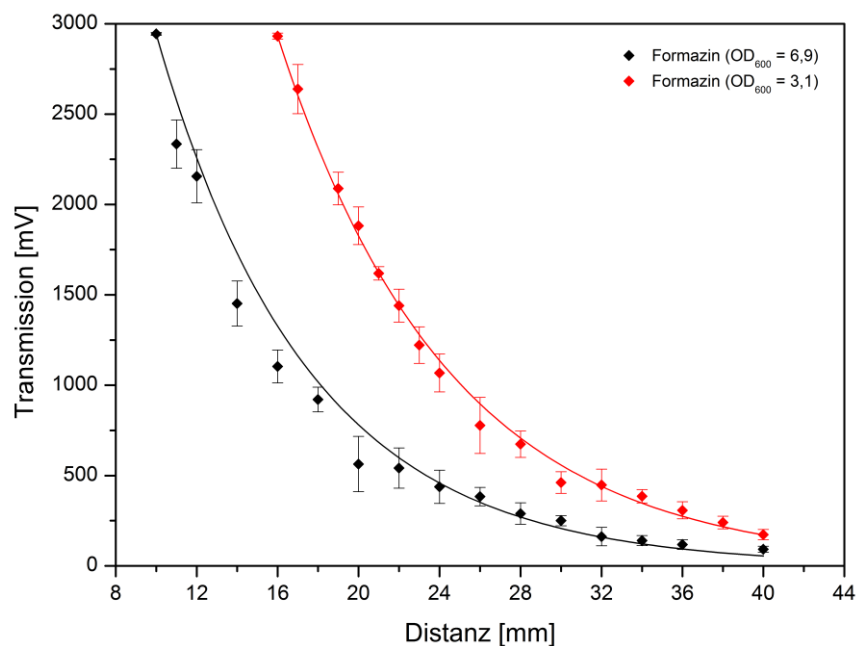


Abbildung 4.35: Transmission in Abhängigkeit von der Distanz zwischen LED und PD bei Formazin.

Es ist zu sehen, dass das absinkende Verhalten jeweils gegen Null strebt. In allen Fällen transmittiert das Licht ungehindert über eine große Distanz, bis die Intensität in ein exponentielles Absinken übergeht. 10% des eingestrahlten Lichts sind nach 27,2 bzw. 35,3 mm noch zu beobachten (Tabelle 4.6, unten). Vergleichbar hierzu sind Zellsuspensionen nur bei hochdichten Lösungen ($OD_{600} > 18$). Offenbar reicht die optische Dichte der Suspension alleine nicht aus, um Informationen über die Eindringtiefe zu erhalten. Die Art und Beschaffenheit der suspendierten Partikel muss ebenfalls berücksichtigt werden.

Für den vorgestellten nephelometrischen Sensor im 180° -Setup ist die Eindringtiefe des Lichts nicht direkt entscheidend, sondern die Kenntnis über die Höhe der Suspensionslösung, die die Grenze dafür bildet, dass kein Reflexionslicht mehr durch den eingebauten Detektor gemessen werden kann. Die Berechnung dieser Mindestflüssigkeitshöhe kann ausgehend von der Funktion des exponentiellen Wachstums 1. Grades mathematisch gelöst werden.

Hierzu erfolgt zunächst die Bestimmung des exponentiellen Abfalls für jede Suspension und Trübung nach Gleichung 4.2. Wird anschließend der x-Terminus quadriert (Gleichung 4.3) und die Gleichung nach Variable x umgeformt (Gleichung 4.4), kann nach Einsetzen der Konstanten die Mindestflüssigkeitshöhe in Abhängigkeit zur Trübung berechnet werden.

$$y = I_0 \cdot e^{-\frac{x}{c}} \quad (4.2)$$

$$y = I_0 \cdot e^{-\frac{2 \cdot x}{c}} \quad (4.3)$$

$$x = \frac{-c \cdot \ln\left(\frac{y}{I_0}\right)}{2} \quad (4.4)$$

Die Konstanten I_0 und c ergeben sich aus den Regressionen der experimentellen Reihe. Die Variable y gibt die eingestellte Messempfindlichkeit des verwendeten Oszilloskops zum Zeitpunkt der Messung an. I_0 stellt das theoretisch maximal erreichbare Messsignal dar. Die Variable c bezeichnet eine Konstante, die eine starke Abhängigkeit zur Trübung der Lösung hat. In Tabelle 4.6 (unten) sind die Ergebnisse der experimentellen Reihe vorgestellt.

Tabelle 4.6: Eindringtiefen und Mindestflüssigkeitshöhe von Formazin und Zellsuspensionen bei unterschiedlichen optischen Dichten.

Suspension	OD ₆₀₀	Anpassungsfunktion	Eindringtiefe	Messzonenhöhe
			10% [mm]	minimal [mm]
Formazin	6,9	$f(x) = 11.082,06 \cdot e^{(-x/7,54)}$	27,2	13,6
Formazin	3,1	$f(x) = 19.506,18 \cdot e^{(-x/8,44)}$	35,3	17,6
<i>E. coli</i> K12	41,3	$f(x) = 6.944,75 \cdot e^{(-x/7,04)}$	22,1	11,1
<i>E. coli</i> K12	18,1	$f(x) = 8.649,70 \cdot e^{(-x/8,02)}$	27,0	13,5
<i>P. pastoris</i>	32,0	$f(x) = 8.565,81 \cdot e^{(-x/8,23)}$	27,6	13,8
<i>P. pastoris</i>	18,1	$f(x) = 8.363,34 \cdot e^{(-x/9,05)}$	30,1	15,1
<i>P. pastoris</i>	10,1	$f(x) = 11.667,86 \cdot e^{(-x/10,03)}$	36,7	18,4
<i>P. pastoris</i>	5,1	$f(x) = 19.336,45 \cdot e^{(-x/11,06)}$	46,1	23,1

Werden die berechneten minimalen Flüssigkeitshöhen ins Verhältnis zur optischen Dichte gesetzt, ist innerhalb von Zellsuspensionen ein exponentiell absteigender Zusammenhang zu beobachten. Formazin besitzt ein hierzu abweichendes Verhalten. Es streut und absorbiert das Licht im Vergleich zu Zellsuspensionen wesentlich stärker. Dies ist anhand von Abbildung 4.36 deutlich zu erkennen.

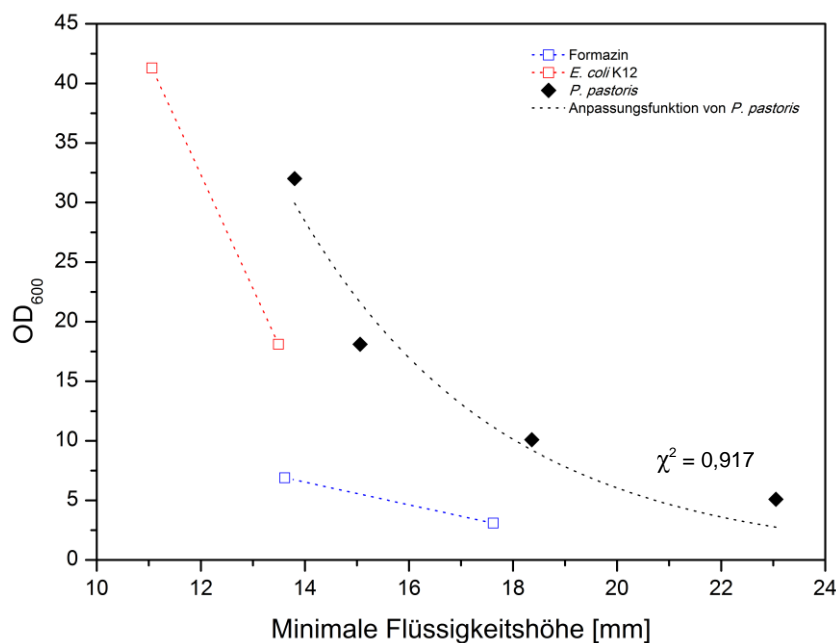


Abbildung 4.36: Bestimmung der minimalen Flüssigkeitshöhe über dem Sensor in Abhängigkeit zur OD₆₀₀. Es besteht ein exponentiell abfallender Zusammenhang bei der Betrachtung von Zellsuspensionen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass für die Eindringtiefe nicht allein der Trübungsgrad entscheidend ist. Einen nicht zu unterschätzenden Einfluss besitzt die Art und Beschaffenheit der Partikel bzw. Zellen in der Suspension. Es konnte gezeigt

werden, dass der Kalibrationsstandard Formazin als Ersatz für charakteristisches Zellverhalten nicht herangezogen werden kann, da das Streuverhalten deutlich abweicht. Darüber hinaus ist auch in verschiedenartigen Zellsuspensionen kein einheitliches Bild zu erhalten, was auf unterschiedliche Größe, Geometrie und das damit einhergehende optische Verhalten zurückzuführen ist.

4.2.5 Einfluss unterschiedlicher Medien auf das Signalverhalten

Veränderungen der Intensität des gemessenen Streulichtsignals sind in der Regel auf Effekte zurückzuführen, die Einfluss auf die Opazität haben. Es wird von transluzenten und transparenten Medien gesprochen. Bisher wurden eingehend Suspensionen einer bestimmten optischen Dichte behandelt. Jedoch können auch klare Lösungen abweichende Intensitäten zeigen, wenn der Brechungsindex n der Lösung variiert oder das Medium unterschiedlich große Absorptionsfähigkeit zeigt. Die Funktionsweise des Sensors ist durch die Konstruktion (180° -Setup) auf eine bestimmte Winkelbreite auftreffenden Streulichts geeicht. Da der Multisensorprototyp die online-Überwachung aller Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab, unabhängig von Mikroorganismen (MO) und Additiven dem Medium, realisieren soll, ist zu überprüfen, wie groß der Signalunterschied bei der Verwendung unterschiedlicher Medien ist. Die praktischen Arbeiten dieser experimentellen Reihen entstanden im Rahmen einer betreuten Abschlussarbeit von C. UDE [67] und werden nun in den Kontext der Charakterisierung des entwickelten Multisensorprototyps gebracht.

Zunächst wurde ein Vergleich ausgewählter, häufig verwendeter Medien vorgenommen. Anschließend wurde durch Reflexionsmessungen unterschiedlicher Flüssigkeitshöhen ein Bezug zum Brechungsverhalten hergestellt. Für beide Messreihen wurde eine abgewandelte Version der in Abbildung 4.34 (S. 57) vorgestellten Messapparatur verwendet (Messung in Ruhelage). Zur Verifizierung der Messdaten wurde der Mittelwert aus je 10 Messwerten berechnet. Abbildung 4.37 zeigt das Amplitudensignal in Abhängigkeit zur Flüssigkeitshöhe unterschiedlicher herkömmlicher Medien.

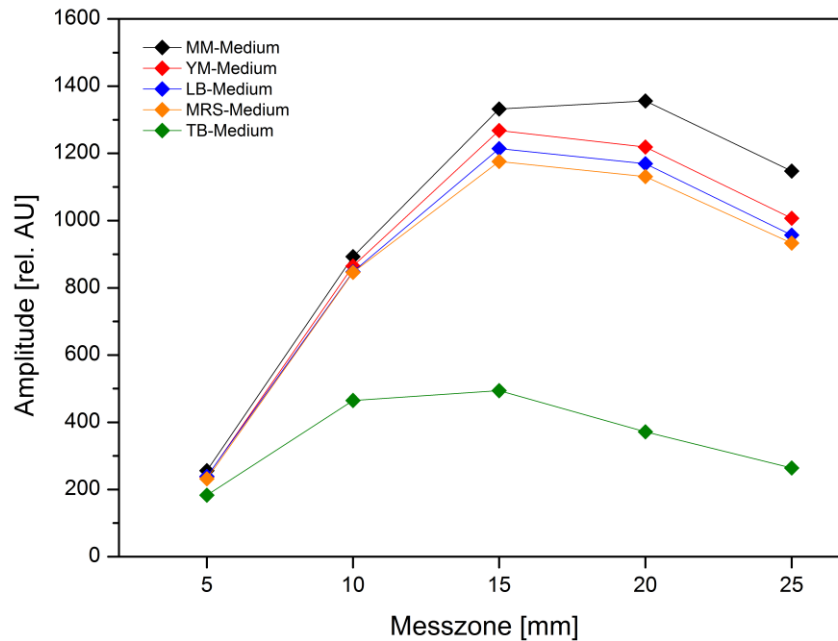


Abbildung 4.37: Streulichtverhalten unterschiedlicher Kultivierungsmedien ohne Einfluss der Grenzfläche (Mittlere Fehler je <math>< 0,5\%</math>), nach [67].

Durch Verwendung der abgewandelten Apparatur mit Messblende wurde der Einfluss der Grenzflächenreflexion für die Messungen eliminiert. Wie bereits in Abbildung 4.33 (S. 56) zu sehen war, steigt das detektierte Signal auch hier mit zunehmender Flüssigkeitshöhe aufgrund des sich weiter ausbreitenden Lichtkegels (vgl. Abbildung 4.11, S. 31). Die Beleuchtungsfläche vergrößert sich und die geringe Reflexionseigenschaft der matten Kunststoffblende steigt bis zu einem Maximum (Fläche der Messblende). Wird die Flüssigkeitshöhe über dem Sensor weiter erhöht, sinkt das Amplitudensignal wieder ab, da durch den Abstrahlwinkel der LED ($\Omega = 20^\circ$) eine größere Fläche als die Blende beleuchtet wird und die Beleuchtungsintensität und Reflexionseigenschaften des schwarzen Kunststoffs hierdurch sinken.

Die untersuchten Medien zeigen generell kaum Unterschiede im Intensitätsverhalten. Es wird eine Grundamplitude erhalten, die max. 1.356 rel. AU erreicht. Exklusive des TB-Mediums sind hierbei Abweichungen bis 11% zu beobachten, die aufgrund der geringen absoluten Amplitude jedoch kaum signifikant sind. Das glycerolhaltige TB-Medium bildet eine Ausnahme. Das Streulichtsignal weicht bereits bei sehr geringer Messzone vom allgemeinen Verhalten ab. Bei 15 mm ist hier das maximale Signal von 494 rel. AU festzustellen. Dies entspricht einer Abweichung von 63% bezogen auf die anderen Medien. Die Maxima aller anderen untersuchten Medien werden erst bei einer Flüssigkeitshöhe von 20 mm erreicht. Die Bestandteile des TB-Mediums sind ursächlich für das unterschiedliche Verhalten. Durch Zugabe von Glycerol verändert sich der Brechungsindex des Lichts. Die Verwendung der fünffachen Menge an Hefeextrakt (ca. 24 g/L) färbt die klare Lösung deutlich stärker ein. Demzufolge wird mehr Licht absorbiert und steht nicht mehr dem physikalischen Vorgang der

Lichtstreuung zur Verfügung. Allgemein ist zu sehen, dass Medien mit weniger Bestandteilen (z.B. im Minimalmedium MM) höhere Reflexionssignale zeigen. Beide Effekte führen beim TB, bezogen auf den Mittelwert aller anderen Medien, zu einer Signalreduzierung bis zu 77%.

Werden die Reflexionseigenschaften verschiedener Medien betrachtet, sind deutlichere Unterschiede zu beobachten. Bei Erhöhung der Distanz zwischen LED und Phasengrenze zeigt sich, dass TB die stärksten Reflexionseigenschaften aufweist. Wie in Abbildung 4.38 dargestellt, werden bei einer Erhöhung der Flüssigkeit im Plexiglaszylinder (ohne Verwendung einer Messsonde bzw. Messblende) die Messsignale bereits ab 7 mm aufgespalten.

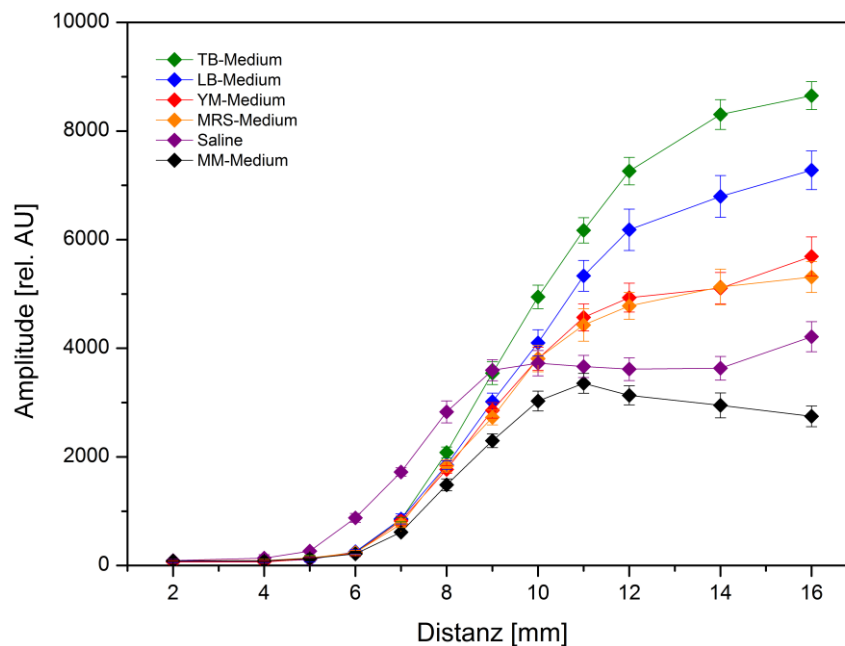


Abbildung 4.38: Abhängigkeit der Grenzflächenreflexion von der Gelöststoffkonzentration unterschiedlicher Medien bei konstanter Temperatur, nach [67].

Trotz Messungen im ungeschüttelten System wurde ein deutlich erhöhtes Messrauschen festgestellt. Mit zunehmender Distanz fächern sich die Sensorsignale auf. Es ist der Trend zu beobachten, dass eine hohe Gelöststoffkonzentration zu einem höheren Amplitudensignal führt. Aus der Literatur ist bekannt, dass der Brechungsindex durch Erhöhung der Gelöststoffkonzentration zunimmt, wobei in der Regel eine lineare Beziehung zur Konzentration besteht [68]. Zusätzlich wird der Brechungsindex durch Temperatur und Wellenlänge des Lichts beeinflusst. Unter der Annahme, dass sich durch Erhöhung des Brechungsindex der Ausfallswinkel beim Reflexionsvorgang zum Detektor hin richtet, wird eine logische Verbindung zwischen Gelöststoffkonzentration und Amplitudensignal erhalten. Diese Beziehung ist erwartungsgemäß erfüllt (vgl. Abbildung B.7, S. 129).

Zusammenfassend ergibt sich, dass das Amplitudensignal durch den Brechungsindex des verwendeten Mediums ohne Zellen nur geringfügige Veränderungen zeigt. Das Grundsignal kann zwischen 892 - 1.356 rel. AU liegen (11% Abweichung, bei 20 mm Flüssigkeitshöhe). Wird dem Medium Glycerol hinzugefügt, stellt sich eine deutliche Veränderung des Brechungsverhaltens ein. Der Brechungsindex ist eine optische Materialkonstante, die den Lichteinfall in die Lösung verändert. Neben einer Glycerolzugabe ($n = 1,4745$) führt auch die Erhöhung der Gelöststoffkonzentration zu einer Zunahme. Bei der konstanten Orientierung der optoelektronischen Komponenten im vorgestellten Sensor, erhöht sich hierdurch die Reflexionsfähigkeit an der Phasengrenze. Eine Aussage über eine Veränderung des Streulichtverhaltens kann hierüber jedoch nicht getroffen werden, da das Verhalten der beiden physikalischen Vorgänge nicht identisch ist. Außerdem besteht im Grundsignal in der Messreihe 1 (Abbildung 4.37, S. 62; ohne Grenzflächeneinfluss) nur einer Abweichung von max. 463 rel. AU. Aus den bisherigen Intensitätsmessungen ist bekannt, dass dies bei einer Streulichtmessung in der Regel nur einer geringen Abweichung entspricht (ca. 1-2%). Aufgrund anderer, deutlich stärkerer Einflüsse auf das Streulichtsignal ist der Unterschied bei Veränderung des Brechungsindex zur Bewertung der Messgenauigkeit weniger bedeutend.

4.2.6 Schlussfolgerung zum optimalen Messzyklus des Streulichtensors

Durch die experimentellen Arbeiten zur Einstellung des Beschleunigungssensors kann der größte Einfluss auf den gemessenen Streulichtwert im geschüttelten System kompensiert werden. Es ergibt sich, dass i.d.R. eine verallgemeinerte lineare Regression zwischen Schüttelfrequenz und Winkel max. Amplitudensignals verwendet werden kann. Ausnahmen bilden extreme Messbedingungen (geringes Volumen, hohe Schüttelfrequenzen). Die Flüssigkeitsrotation ist bei konstanter Geschwindigkeit unabhängig von der Viskosität. Es wird lediglich die Form der Flüssigkeit verändert. Somit ist es möglich die Messzeitregulierung ohne Berücksichtigung der Zähigkeit durchzuführen. Wird der Messzyklus den bestehenden äußeren Bedingungen angepasst, kann eine genauere Charakterisierung des Streulichtverhaltens in geschüttelten Systemen erfolgen. Das Streulichtsignal in Suspensionen geringerer Trübung wird durch einen zweiten physikalischen Effekt beeinträchtigt. Detaillierte Untersuchungen hierzu ergaben, dass die Reflexionseigenschaften von der Phasengrenze nicht allein durch den Trübungsgrad beeinflusst werden. Es besteht eine Abhängigkeit zur Größe bzw. Geometrie der Partikel bzw. Zellen, die das eingestrahlte Licht unterschiedlich stark streuen. Die Konsequenzen aus stark streuenden Suspensionen sind, dass weniger Lichtintensität für einen Brechungsvorgang zur Verfügung steht. Weiterhin wird das Brechungsverhalten durch hohe Gelöststoffkonzentration verändert.

4.3 Prozessüberwachung mittels Streulicht

Für die geplante Anwendung des integrierten Streulichtensors als Teil eines Prozessüberwachungssystems relevanter Kultivierungsparameter ist eine hohe Präzision der Messdaten erforderlich. Die Charakterisierung des Systems hat gezeigt, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Messparameter Einfluss auf das Sensorsignal haben. Die Messgenauigkeit konnte durch eine Änderung der Konstruktion gegenüber dem provisorischen Sensor aus [38] verbessert werden. Unter Einhaltung o.g. Bedingungen und Grenzen (korrekter Triggerwinkel, Mindestflüssigkeitshöhe, Mindestwert der OD) ist ein reproduzierbares Signal möglich, das mit steigender Trübung proportional zunimmt. Um mit dem entwickelten Streulichtsensor eine Alternative zu offline-Bestimmungen der Biomasse zu bieten, muss die Streulichtintensität in eine bekannte Kultivierungsbasisgröße übertragen werden (vgl. Abschnitt 3.1, S. 3f.). Dabei darf die Messgenauigkeit durch diesen Vorgang nicht negativ beeinflusst werden.

In diesem Kapitel wird die Applikation der Messtechnik auf den mikrobiologischen Bereich vorgestellt. Durch eine valide Kalibration ist es möglich, den Streulichtwert in eine Basisgröße umzurechnen. Hierzu ist die Aufbereitung der Rohdaten durch digitale Datenverarbeitung notwendig. Es werden die Kalibrationen unterschiedlicher MO innerhalb einer Basisgröße miteinander verglichen und Einschränkungen in der Sensorik aufgedeckt. Eine Auswahl der entwickelten Kalibrationen wurde mit Hilfe des RMSEP validiert und steht für die Integration in die Software des geplanten Multisensorsystems zur Verfügung.

4.3.1 Übertragung der Technik auf den Bioprozess

Das Einsatzgebiet des entwickelten Streulichtensors ist vielfältig. Er kann in allen mikrobiologischen Schüttelkolbenkultivierungen verwendet werden, solange die Suspension homogen ist und die Messung innerhalb der Grenzparameter liegt. Ist dies der Fall, wird eine automatisierte Prozessüberwachung des Zellwachstums im Schüttelkolbenmaßstab realisiert. Für eine genaue Messung durch diese optische Methode ist es notwendig, dass die Kultivierungsbedingungen während der Versuche konstant gehalten werden. Die vorgestellten biotechnologisch relevanten MO wurden jeweils unter optimal definierten Vorgaben überwacht. Hierzu gehört u.a. der nach Abschnitt 4.2.1 (S. 41f.) berechnete korrekte Triggerwinkel, bezogen auf die jeweiligen Messbedingungen. Dieser führte im Bioprozess zu einer deutlichen Reduzierung des von der Flüssigkeitshöhe verursachten Rauschverhaltens um bis zu 50% (vgl. Abbildung B.8, S. 129). Für alle durchgeführten Kultivierungsexperimente wurden vom

Hersteller bereitgestellte Schüttelkolben verwendet. In Abbildung 4.39 ist beispielhaft die Prozessüberwachung des Modellorganismus *E. coli* K12 vorgestellt.

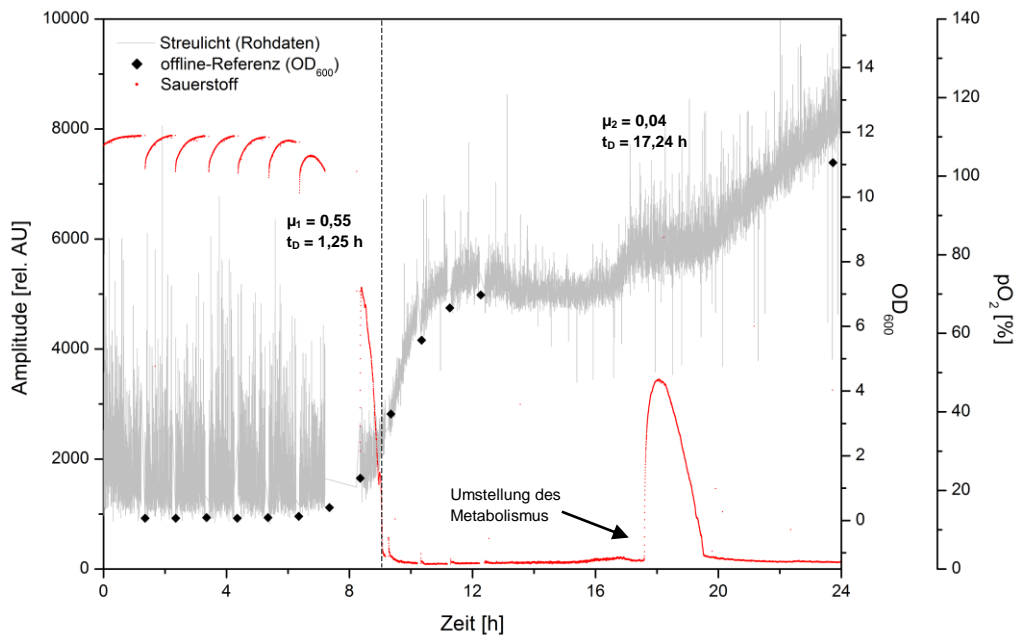


Abbildung 4.39: Exemplarische Darstellung der Prozessüberwachung von *E. coli* K12 in TB-Medium.

Zu beobachten ist, dass die hohe Datendichte der Rohwerte trotz des optimalen Setups besonders im Bereich geringer optischer Dichte ein stark verrauschtes Messsignal zeigt. Das Messrauschen ist zu höheren Amplituden hin gerichtet. Die Abweichung vom Grundsignal ist auf die Oberflächenverformung der rotierenden Grenzfläche und die damit einhergehende Veränderung der Reflexionsfläche zum Detektor hin zurückzuführen. Im Bereich des exponentiellen Wachstums (ab 8 h) ist ein verringertes Rauschen zu beobachten. Ab einer optischen Dichte von $OD_{600} > 6$ erfolgt unter vorgegebenen Kultivierungsbedingungen die Umstellung der Zellen vom unlimitierten in ein sauerstofflimitiertes Wachstum. Es ist eine temporäre Wachstumshemmung von 4 h festzustellen, die mit einem Metabolismuswechsel endet. Dies ist durch den Anstieg von pO_2 im geschlossenen System deutlich zu erkennen (vgl. Abschnitt 4.4.1, S. 86f.). Die beiden Phasen unterscheiden sich durch unterschiedliche spezifische Wachstumsraten. Im Bereich großer Trübung erfolgt das Messrauschen ebenfalls in Richtung geringerer Amplituden.

Um den Wachstumsverlauf der Zellen während einer Kultivierung besser darstellen zu können, wurden die ermittelten Rohdaten einer digitalen Datenfilterung unterzogen. Damit kann verhindert werden, dass beim Vorgang der Kalibration die Werte der offline-Referenz mit Ausreißern des Streulichtsignals kombiniert werden. Diese Rechenvorschrift soll in der Endversion des Multisensorgeräts hinterlegt und direkt mit einer geringen zeitlichen Verzögerung (Fensterbreite des Filters) vom System ausgegeben werden. Es wurden hierzu unterschiedliche digitale Filtermethoden und

Fensterbreiten getestet. Ziel war es, das beste Ergebnis einer Anpassung zu finden, das den Verlauf der Biomasse während einer Kultivierung eines MO möglichst reproduzierbar wiedergibt.

Wird der gesamte Wachstumsverlauf einer Kultivierung betrachtet, zeigt eine Datenfilterung durch einen auf Mittelwertbildung basierenden Filter die besten Ergebnisse (vgl. Abbildung B.9, S. 130). In Abbildung 4.40 sind die Filterwirkungen der unterschiedlichen Fensterbreiten des Medianfilters vorgestellt.

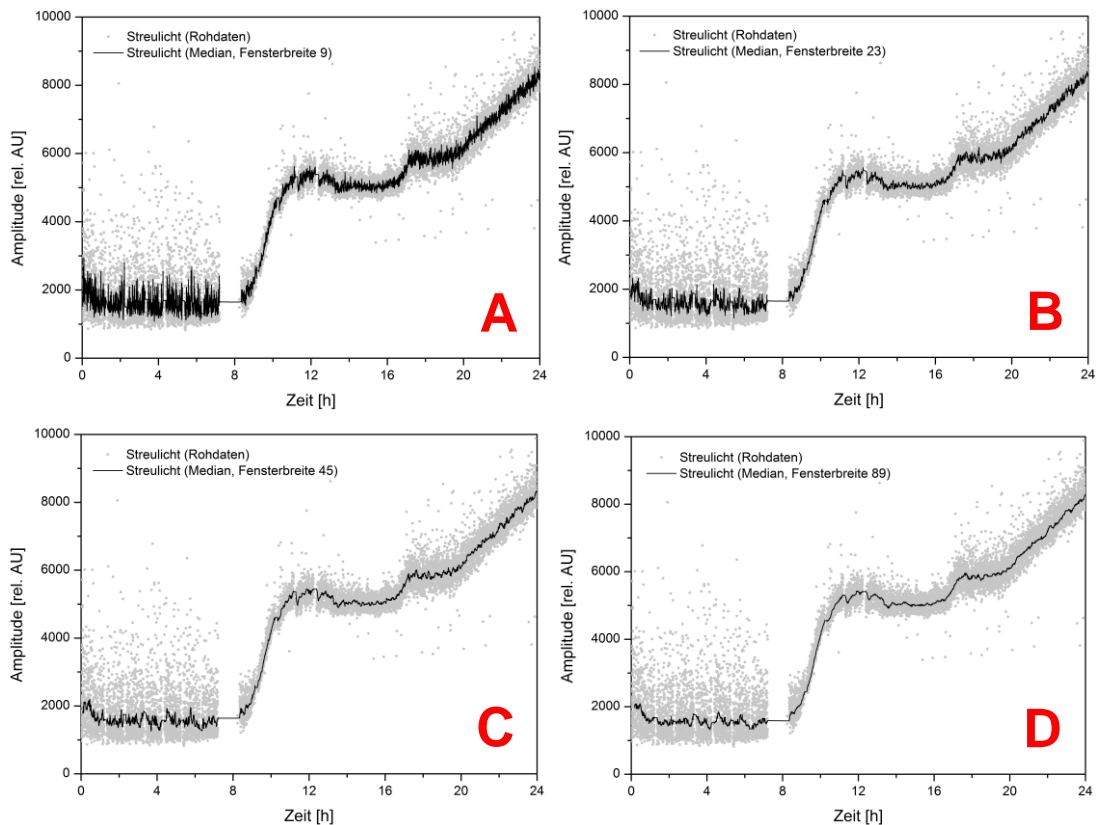


Abbildung 4.40: Digitale Datenfilterung der Streulichtwerte anhand einer Kultivierung von *E. coli* K12 in TB-Medium. **A:** Fensterbreite (FB) 9; **B:** 23; **C:** 45; **D:** 89. Die Messbedingungen entsprechen Tabelle 4.9 (S. 76).

Kombinationen unterschiedlicher Filtermethoden führen zu keiner weiteren Verbesserung, so dass für das Multisensorsystem die digitale Datenfilterung mittels Medianfilter festgelegt wurde.

Allen Filtervarianten ist gemein, dass die Messdaten durch eine Fensterbreite von 9 (ca. 1 min) weiterhin stark verrauscht vorliegen. Durch weitere Erhöhung der Fensterbreite werden die Messdaten besser modelliert. Da die Fensterbreite zu einer verzögerten Ausgabe der real-time Messdaten führt und einen der entscheidenden Vorteile des Messsystems reduziert, darf die Fensterbreite nicht zu groß gewählt werden. Eine Filterung über 45 Messwerte hinaus (ca. 5 min) konnte zu keiner weiteren Verbesserung führen, so dass für zukünftige Kultivierungen der Medianfilter mit

Fensterbreite 45 als Standard definiert wurde. Eine verzögerte Ausgabe der fortlaufenden aktuellen Messdaten von 5 min muss hierbei toleriert werden.

4.3.2 Strategie bei der Kalibrationsbildung

Die Umrechnung des vom nephelometrischen Sensor gemessenen Lichts in eine bekannte Kultivierungsgröße erfolgt über die logische Verknüpfung des Streulichtwerts mit einem durch Probennahme erhaltenen offline-Wert. Durch eine Anhäufung der hierdurch erhaltenen zeitlich passenden online-/offline-Wertepaare wird eine Rechenvorschrift zur Umrechnung des online-Signals in eine Basisgröße realisiert.

Bei der Erstellung der Kalibration wurde der in Abschnitt 4.3.1 (S. 65f.) festgelegte Medianfilter (verwendet als kontinuierlicher Rückwärtsfilter) auf die Rohdaten des online-Signals angewandt und für die Zusammenstellung der Wertepaare verwendet. Während der Entnahme einer Probe wurde die Messung jeweils unterbrochen, so dass kein direkt zeitlich passender online-Wert gemessen werden konnte. Somit stehen für die Wertepaarerstellung unterschiedliche Möglichkeiten zur Auswahl.

Es kann zwischen dem letzten Wert vor der Unterbrechung und dem ersten Wert nach der Probennahme ausgewählt werden. Im ersten Fall ist der zeitliche Unterschied zwischen beiden Werten grundsätzlich zu groß. Es wird besonders bei schnell wachsenden MO künstlich eine Abhängigkeit zur Dauer der Probennahme geschaffen. Ein fortlaufender Rückwärtsmedian schließt nach der Probennahme jedoch auch Werte vor dem Aussetzen der Messung mit ein. Bei sich verändernder Trübung ergibt sich ein verfälschter Medianwert nach dem erneuten Start der Messung, bis die Amplitudensignale vor der Probennahme durch den Filter nicht mehr berücksichtigt werden (Abbildung 4.41, unten, A). Aus diesem Grund wurde nach Fortsetzung der Messung für die Erstellung der Kalibrationen ein Vorwärtsmedian mit entsprechender Fensterbreite verwendet (Abbildung 4.41, unten, B). Diese Veränderung des kontinuierlichen Filterprozesses wird ausschließlich für die Kalibrationserstellung verwendet. Der hierdurch erhaltene Wert wird dann mit dem über diesen Zeitraum ermittelten Rückwärtsmedian verbunden. Der auf diesem Weg neu berechnete erste online-Wert nach der Probennahme kann dem zeitlich passenden offline-Wert zugewiesen werden.

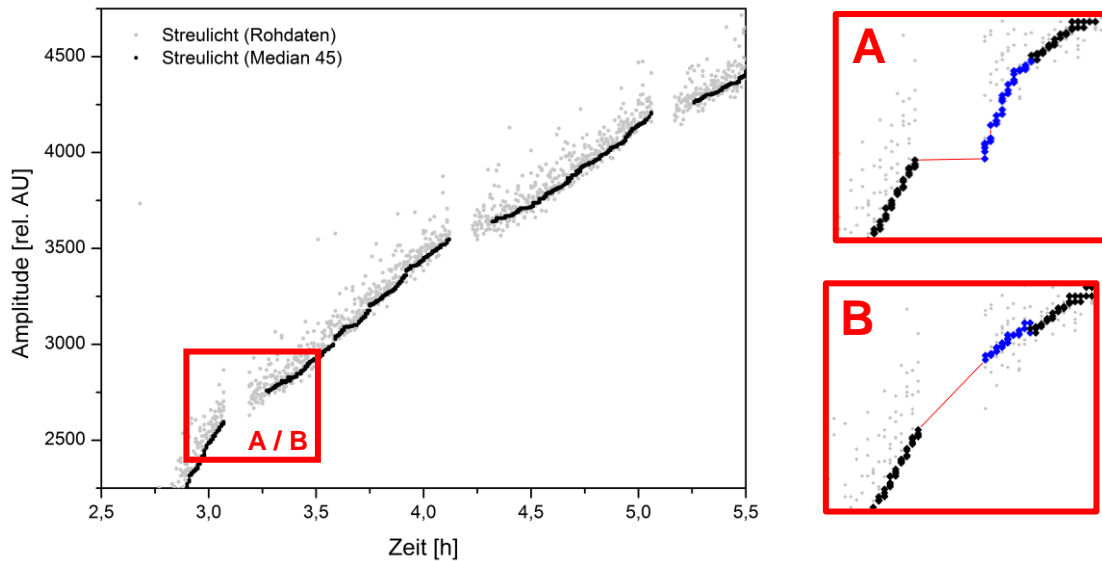


Abbildung 4.41: Einfluss der Probennahme auf einen kontinuierlichen Rückwärtsmedian. A: Unmodifizierte Darstellung. B: Verbesserter Rückwärtsmedian (siehe Text).

Der Unterschied in den Amplitudenwerten ist im Bereich hoher Zellteilungsrate besonders hoch. Am vorliegenden idealisierten Beispiel sind Abweichungen bis 112 rel. AU zu beobachten (Tabelle 4.7). Wird die Probennahme (PN) im Zeitraum des exponentiellen Wachstums durchgeführt, können Abweichungen bis zu 500 rel. AU festgestellt werden.

Tabelle 4.7: Einfluss der Wachstumsphase bei Vergleich der Amplitudensignale in Abhängigkeit unterschiedlicher Medianwerte.

Zeit	μ	Amplitude vor PN	Amplitude nach PN	Amplitude nach PN (verbessert)
[h]		[rel. AU]	[rel. AU]	[rel. AU]
3,07	0,57	2.596	2.598	2.708
4,12	0,18	3.548	3.548	3.608
5,06	0,15	4.207	4.207	4.209

Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 (S. 51f.) beschrieben, ist unter Einfluss der Grenzflächenreflexion während des Schüttelbetriebs (und selbst in Ruhelage) die Standardabweichung des Streulichts stark erhöht. In Kultivierungsexperimenten ergibt sich in der *lag*-Phase kein Zusammenhang zwischen Biomassekonzentration und Streulichtsignal. Die Verwendung von online-/offline-Wertepaaren ist erst ab dem Zeitpunkt sinnvoll, ab dem die Reflexion an der Phasengrenze zu keiner merklichen Erhöhung des Messrauschens mehr führt (Abbildung 4.42, unten; roter Pfeil).

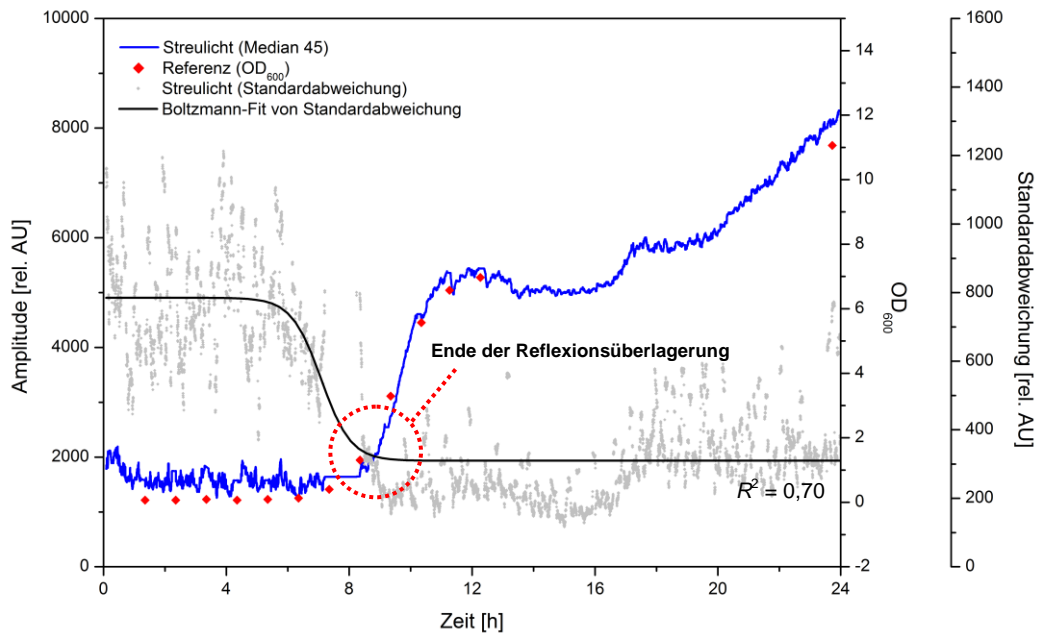


Abbildung 4.42: Grenzflächenreflexion in Abhängigkeit zum Zellwachstum. Die kontinuierliche Standardabweichung wurde mit einer Fensterbreite 45 als Rückwärtsfilter verwendet.

Zu Beginn jeder Kultivierung wird das Messrauschen durch die unregelmäßige Grenzflächenreflexion verstärkt. Da mit zunehmender optischer Dichte dieser Einfluss abnimmt, erreicht das Messrauschen ab einer bestimmten Trübung einen konstanten Wert. Bei der Erstellung von Kalibrationen ist es daher sinnvoll, die Mindestgrenze einer Kalibration dahingehend zu definieren, dass das zufällige Signalverhalten durch Reflexionen an der Phasengrenze unwahrscheinlich wird. Der Mindestwert einer zuverlässigen Aussage entspricht der Summe aus dem Grundsignal und einem gewichteten statistischen Fehler, der durch das Messverfahren entsteht (unabhängig von Grenzflächenreflexionen). Dieser Wert kann durch die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) speziell für jede Kultivierung berechnet werden. Zur Beurteilung eines Messverfahrens wird im Allgemeinen die LOD als Schwellenwert durch folgende Formel bestimmt.

$$\text{LOD} = \bar{x} + 3 \cdot \sigma_x \quad \text{mit} \quad \lim_{t \rightarrow \infty} \sigma_x \quad (4.5)$$

Unter Verwendung konstanter Messbedingungen nähert sich die LOD somit dem Grundsignal an, wenn der statistische Fehler σ_x des Messverfahrens minimiert wird. Unter Verwendung einer kontinuierlichen Standardabweichung (Abbildung 4.42, oben) ist im vorgestellten Beispiel aufgrund des starken Messrauschen ($\sigma_x = 675$ rel. AU) die LOD erst bei einer Amplitude von 4.224 rel. AU erreicht. Messwerte zwischen dem Grundsignal und diesem Schwellenwert besitzen eine erhöhte Ungenauigkeit.

Für eine valide Kalibration sind für jeden MO mindestens drei Kultivierungen notwendig. Zwei dienen hierbei der Erstellung der Kalibrationsgleichung, durch die

dritte Kultivierung erfolgt eine Überprüfung der Gleichung. Unter Einhaltung der festgelegten Vorschriften sind die Kultivierungen nacheinander im gleichen System durchzuführen. Die Probenahmen zur offline-Analytik erfolgten in allen Experimenten bei Bakterien und Hefen nach Kultivierungsbeginn mit einem Intervall von je 1 h unter sterilen Bedingungen.

Zusammenfassend ergibt sich für eine Kalibration mit einer Kultivierungsbasisgröße die Notwendigkeit der Ansammlung von online-/offline-Wertepaaren. Die Rohdaten des Sensorsignals müssen hierfür durch einen Medianfilter mit Fensterbreite 45 digital geglättet sein. Für die Kalibration wird der kontinuierliche Filterprozess mit Hilfe einer Nachbearbeitung angepasst, um den Streulichtwert durch den automatisierten Rückwärtsmedian nicht zu verfälschen. Reproduzierbare Wertepaare werden erst oberhalb der Nachweisgrenze erhalten.

4.3.3 Schäumende Kulturen

Werden der zeitliche Verlauf des Streulichtsignals und die offline-Referenz OD_{600} gemeinsam verfolgt (Abbildung 4.43), ist zu erkennen, dass im betrachteten Messbereich zwischen den offline-Werten (rote Punkte) und dem digital aufgearbeiteten Streulichtsignal (blaue Wachstumskurve) kein linearer Zusammenhang besteht. Weiterhin ist im vorliegenden Beispiel der Kultivierung von *E. coli* K12 in TB-Medium ein folgenschweres Problem bei der Kalibrationsbildung zu beobachten.

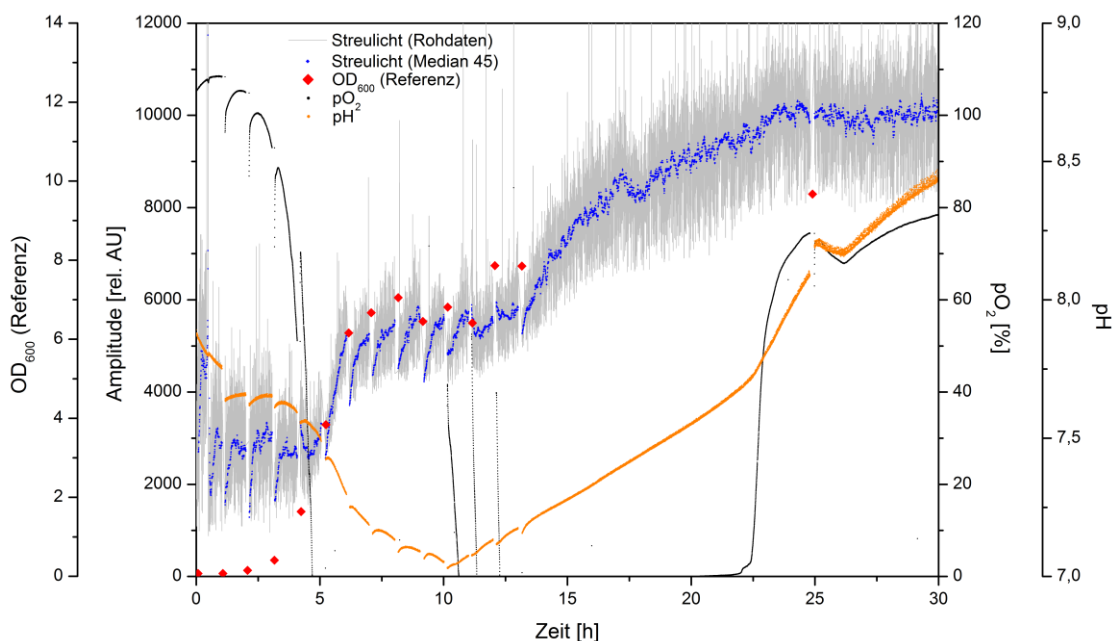


Abbildung 4.43: Prozessüberwachung von *E. coli* K12 in TB-Medium. Alle detektierten Größen (Streulicht, pO₂, pH) sind in der Darstellung enthalten.

Trotz des optimierten Messzyklus ist unter realen Bedingungen das Rauschverhalten gegenüber Formazinslösungen deutlich erhöht. Zusätzlich bildet sich durch die Probennahme zur offline-Analytik eine zackenartige Wachstumskurve im online-Signal aus. Dieses sägezahnartige Verhalten tritt bei jeder Probennahme in unterschiedlicher Stärke auf und beeinflusst die Erstellung der Kalibration beträchtlich. Im Beispiel von *E. coli* K12 ist ein Absinken des Amplitudensignals im Mittel um 28% zu beobachten. Aus den Beobachtungen aller durchgeführten Kultivierungen von *E. coli* K12 zeigt sich, dass dieser Einfluss mit zunehmender Dichte abnimmt (Abbildung 4.44).

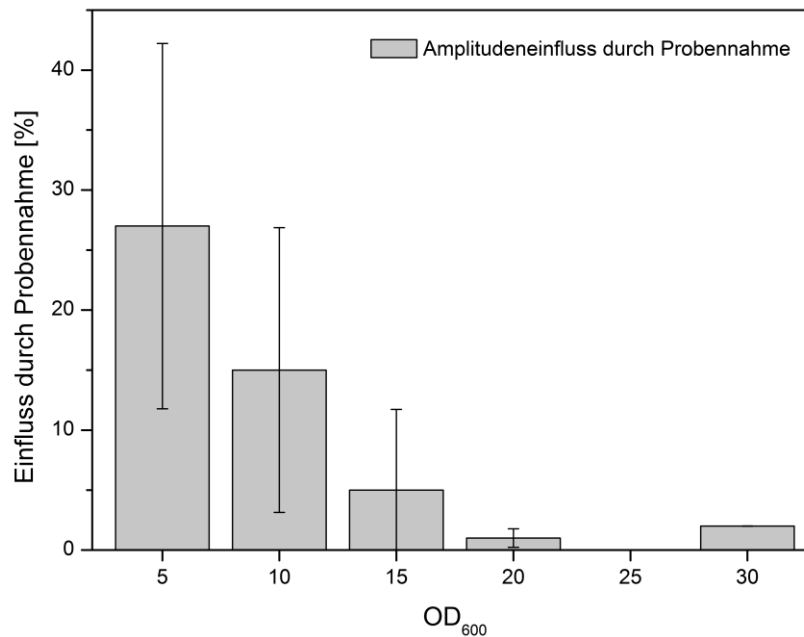
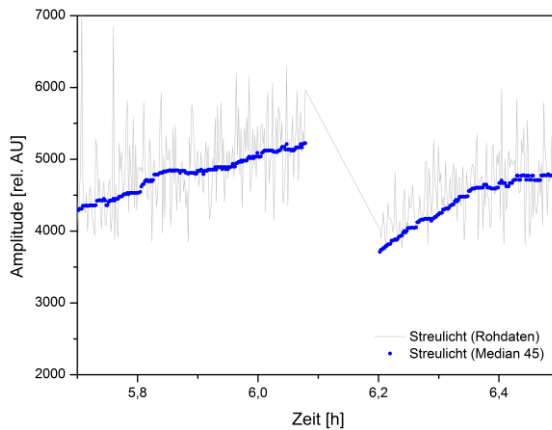


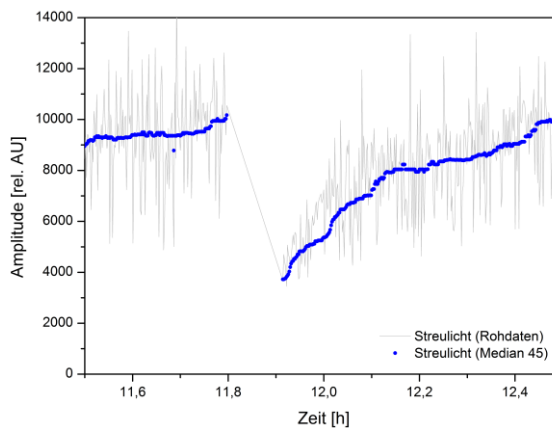
Abbildung 4.44: Veränderung des Amplitudensignals nach offline-Probennahme bei *E. coli* K12. Einfluss der OD₆₀₀. (Bereichseinteilung der x-Achse; „5“ entspricht OD₆₀₀ = 0 - 5).

Für diesen Störfaktor ist eine bestimmte Mindesteindringtiefe erforderlich. Er besitzt jedoch keine Abhängigkeit durch Reflexionen an der Phasengrenze. Eine Reduzierung des Einflusses ist ab einer OD₆₀₀ > 10 zu erkennen. Das ungleichmäßige Amplitudenschwanken ist ausschließlich in Nährmedien zu beobachten. Untersuchungen mit Formazin unterschiedlicher Trübungen zeigten keine derartigen Abhängigkeiten. Die Ausbildung des Sägezahnverhaltens ist in verschiedenen MO zu beobachten (vgl. Abbildung B.10 – B.13, S. 131 - 132).

Da das Sägezahnverhalten durch die Entnahme einer offline-Probe entsteht, wurde die Durchführung der Probennahme variiert. Es konnten sowohl die Temperaturänderung bei Probennahme ($\Delta T = \sim 1$ K/min) als auch eine mögliche Agglomeratbildung (durch Mikroskopaufnahmen) als Einflussfaktoren ausgeschlossen werden. Das Ausmaß ist jeweils sehr unterschiedlich und abhängig von der Schüttelfrequenz. Ein Vergleich von Kultivierungen mit unterschiedlichen Schüttelgeschwindigkeiten zeigt, dass eine Erhöhung der Frequenz zu einer Verstärkung des Signalgefälles führt (Abbildung 4.45).

**150 rpm (*E. coli* K12)**

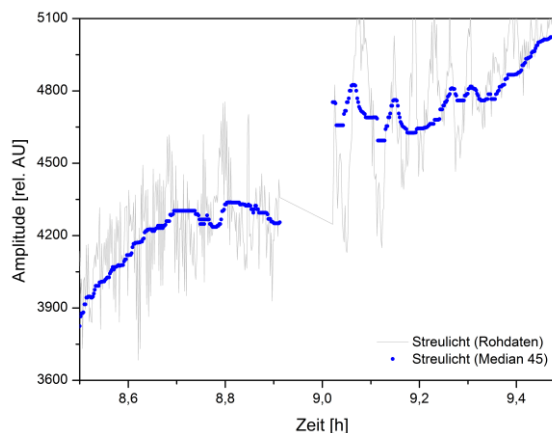
OD₆₀₀ bei PN: 3,84
 Signalverschiebung: 5.224 → 4.173
 Sägezahn (absolut): -1.051 rel. AU
 Sägezahn (in %): **-20%**

**200 rpm (*P. pastoris*)**

OD₆₀₀ bei PN: 4,75
 Signalverschiebung: 10.168 → 5.367
 Sägezahn (absolut): -4.801 rel. AU
 Sägezahn (in %): **-47%**

Abbildung 4.45: Sägezahnverhalten bei unterschiedlichen Schüttelfrequenzen. Die praktische Durchführung der PN ist identisch. Die Messlücken entsprechen der Probennahme.

Ist die Geschwindigkeit hingegen sehr gering, bildet sich während des kontinuierlichen Schüttelvorgangs kaum Schaum aus. Durch eine Probennahme wird Schaum in das System eingetragen, so dass das Sensorsignal nach erneutem Start der Messung zeitweise erhöht ist. Ein kurzfristiges Aufschütteln der Suspension während der Probennahme verhindert nicht das sukzessive Absetzen der Zellen auf dem Kolbenboden während der Messung (Abbildung 4.46).

**100 rpm (*L. zeae*)**

OD₆₀₀ bei PN: 3,86
 Signalverschiebung: 4.255 → 4.690
 Sägezahn (absolut): +435 rel. AU
 Sägezahn (in %): **+10%**

Abbildung 4.46: Sägezahnverhalten bei geringer Schüttelfrequenz. Nach der PN liegt ein erhöhtes Sensorsignal vor. Mit fortschreitender Kultivierung zerfällt der Schaum.

Die Abhängigkeit des Sägezahnverhaltens von der Schüttelgeschwindigkeit führt zu dem Schluss, dass sich durch die kontinuierliche Flüssigkeitsrotation innerhalb der Suspension submerser Schaum ausbildet, der während der real-time Überwachung des vorgestellten Multisensorsystems mitgemessen wird. Erfahrungsgemäß neigen (komplexe) Nährmedien aufgrund hoher Proteinkonzentration zu einer verstärkten Schaumbildung, da die Proteine einen amphiphilen Charakter besitzen (vgl. Tenside). Wird während der Probennahme die kontinuierliche Flüssigkeitsbewegung unterbrochen, zerfällt der während der Kultivierung aufgebaute Schaum. Die Ausbildung des Sägezahnverhaltens bei Probennahme ist somit vor allem auf die Bestandteile und Eigenschaften des Mediums zurückzuführen. Die Anwesenheit von Zellen in der Flüssigkeit ist nur von geringer Bedeutung. Der Nachweis für den Einfluss schäumender Medien auf das optische Signal des nephelometrischen Sensors wurde in einer Testreihe erbracht (Abbildung 4.47).

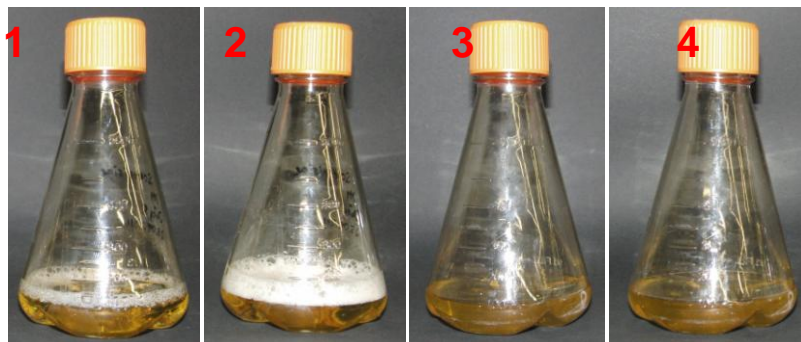
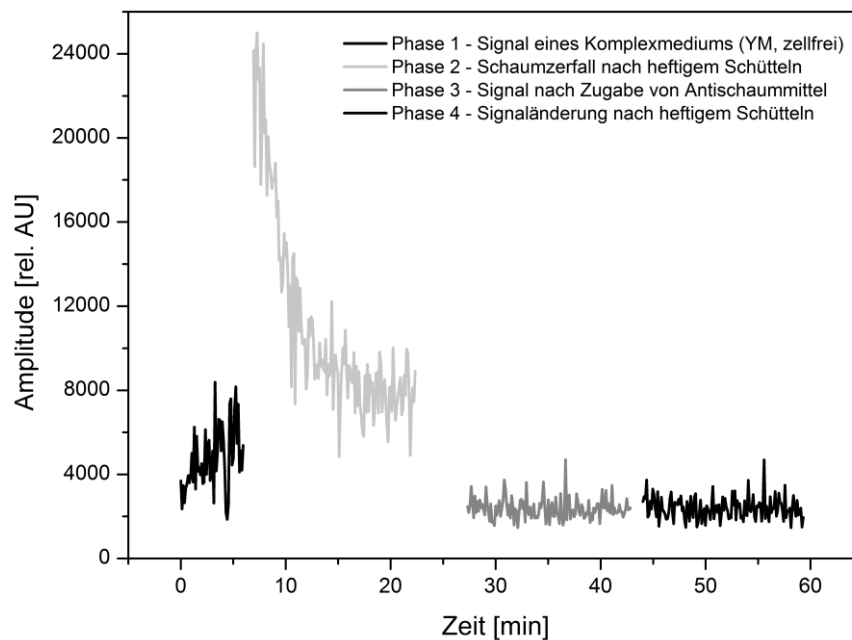


Abbildung 4.47: Signalveränderung durch Zugabe von Antischaummittel. Die Fotos wurden jeweils am Ende jeder Phase erstellt.

Hierbei wurden 100 mL eines YM-Mediums (zellfrei) auf dem Multisensor bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 rpm über einen Zeitraum von 5 min gemessen (Phase 1). Der durchschnittliche Messwert betrug 4.720 ± 1.563 rel. AU. Die Messung wurde kurz unterbrochen und das Medium bis zur Schaumbildung kräftig geschüttelt. Innerhalb der nächsten ca. 15 min wurde der Schaumzerfall während des Schüttelbetriebs beobachtet (Phase 2). Anschließend wurden dem Medium 200 $\mu\text{L/L}$ Antischaummittel hinzugefügt (Phase 3). Das Amplitudensignal sank schlagartig auf einen durchschnittlichen Wert von 2.380 ± 511 rel. AU. Durch die Zugabe von TEGO[®] AF KS 911 (Antischaummittel) wird die gesamte Schaumbildung im Schüttelkolben unterbunden. Eine Wiederholung des kräftigen Schüttelns führt zu keiner weiteren Amplitudenveränderung (Phase 4).

Anhand dieser Messreihe wurde gezeigt, dass sich während des kontinuierlichen Schüttelvorgangs Schaum bildet, der einen Teil des durchschnittlichen Signals darstellt. Unter den o.g. Messbedingungen werden bis zu 50% des durchschnittlichen Signals durch Reflexionen am Schaum erzeugt. Weitere Messdaten sind Tabelle 4.8 zu entnehmen.

Tabelle 4.8: Versuchsreihe zum Nachweis des Einflusses von Schaum auf die optischen Signale des Streulichtensors.

Phase	Mittelwert [rel. AU]	Signal <i>maximal</i> [rel. AU]	Signal <i>minimal</i> [rel. AU]	Signal <i>Differenz</i> [rel. AU]
1	4.720 ± 1.563	8.383	1.856	6.527
2	10.919 ± 4.627	25.003	4.844	20.159
3	2.380 ± 511	4.712	1.460	3.252
4	2.389 ± 533	4.696	1.464	3.230

Die Problematik bezüglich der Übertragung des Sensors auf den mikrobiologischen Bereich besteht im undefinierten Signalanteil durch Reflexionen am submersen Schaum im Medium. Der Sensor ist nicht in der Lage, zwischen Schaumreflexionen und Streulicht zu unterscheiden und addiert beide Anteile zu einem gemeinsamen Messwert. Die Verhinderung einer Signalüberlagerung ist nur möglich, wenn dem Medium Additive hinzugefügt werden, die eine Schaumbildung unterbinden. Im Laboralltag ist u.U. ein derartiger Eingriff in die Kultivierung jedoch nicht erwünscht, da Antischaummittel bei bestimmten MO einen negativen Effekt zeigen.

4.3.4 Schaumabhängige Kalibrationen

Wird bei den zu überwachenden Kultivierungsexperimenten, unter Einhaltung festgelegter Messbedingungen (Tabelle 4.9), näherungsweise die gleiche Menge an Schaum im Schüttelkolben gebildet, kann eine Kalibration für schäumende Kulturen erstellt werden. Diese ist aus o.g. Gründen jedoch mit Vorsicht zu betrachten.

Tabelle 4.9: Kultivierungsbedingungen der untersuchten Mikroorganismen (Schäumende Kulturen).

Spezies	Medium	Kolbenart [mL]	Füllvolumen [mL]	Drehzahl [rpm]	Temperatur [°C]
<i>E. coli</i> K12	TB	500/WB	100	150	37
<i>K. marxianus</i>	YM	500/WB	100	150	30
<i>L. zeae</i>	MRS	500/NB	300	100	37
<i>P. pastoris</i>	YM	500/WB	100	200	30
<i>S. cerevisiae</i>	YM	500/WB	100	150	30

Ein Vergleich der drei möglichen online-Werte bei Probennahme (Abschnitt 4.3.2, S. 68f.) für die Wertepaarerstellung zeigt, dass eine Kalibration mit dem verbesserten Wert nach Probennahme durch den o.g. Schaumzerfall zu fehlerhaften Amplitudensignalen führt. Abhängig von Kultivierungsbedingungen und der praktischen Handhabung bei jeder Probennahme entstehen oben beschriebene Sägezähne in nicht vorhersehbarem Ausmaß.

Kann die Schaumbildung während einer Kultivierung nicht verhindert werden, muss für die Wertepaarerstellung der letzte online-Wert vor der Probennahme verwendet werden. Die Kalibrationserstellung wird dann noch nicht vom unvorhersehbaren Signalgefälle (Sägezähne) beeinflusst. In den meisten untersuchten MO konnte die Basisgröße OD_{600} durch das Sensorsignal im untersuchten Messbereich mit einer BELEHRADEK-Funktion beschrieben werden. Bis zu einer $OD_{600} \leq 15$ besitzt die logarithmische Anpassung eine höhere Genauigkeit. Im Falle stark schäumender Kulturen (z.B. *P. pastoris*) zeigt eine logistische Funktion die besten Ergebnisse. Nähere Informationen zu den verwendeten Kalibrationsgleichungen sind Abschnitt C6.4 (S. 145) zu entnehmen. In Abbildung 4.48 werden die Ergebnisse der untersuchten MO vorgestellt.

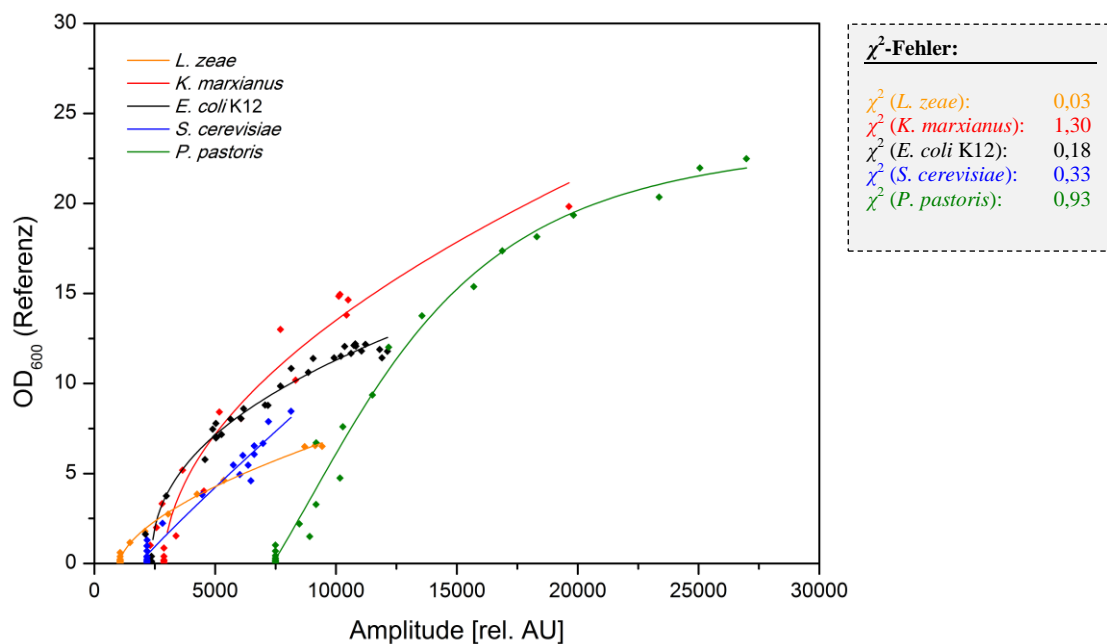


Abbildung 4.48: Kalibration des Sensorsignals verschiedener MO gegenüber der Basisgröße OD_{600} . Die Güte der jeweiligen Regression entspricht der Minimierung des χ^2 -Fehlers (erstellt durch *OriginLab*).

Zur Bewertung der Güte der nicht linearen Regressionen wurde der χ^2 -Fehler ermittelt. Hierbei handelt es sich um einen relativen Wert, der Ähnlichkeiten zu dem linearen Bestimmtheitsmaß R^2 aufweist. Die Software OriginLab[®] verwendet die Minimierung dieses Fehlers zur Anpassung der Funktionsparameter. Ein niedriger Wert deutet auf eine genaue Lösung hin [69].

Werden die Kalibrationskurven miteinander verglichen, wird deutlich, dass das Grundsignal überwiegend durch die Schüttelfrequenz beeinflusst wird. Höhere Geschwindigkeiten führen zu einer verstärkten Schaumbildung. Während Kultivierungen von *L. zea* (100 rpm, 60%) bei einer Amplitude von 1.068 rel. AU beginnen, zeigen Kultivierungen höherer Schüttlerfrequenz (150 rpm, 20%) im Mittel ein Grundsignal von 2.471 rel. AU. Wird die Kultur bei einer Geschwindigkeit von 200 rpm geschüttelt (z.B. *P. pastoris*), wird ein erhöhtes Grundsignal von > 7.000 rel. AU beobachtet. Die LOD werden ebenfalls durch die Schüttelfrequenz beeinflusst, da das interne Messrauschen mit der Produktion submersen Schaums zunimmt ($\sigma_{150} = 724$ rel. AU, $\sigma_{200} = 1.914$ rel. AU). Kalibrationen bei $OD_{600} \geq 1,5$ sind zwar möglich, statistisch gesicherte Angaben können jedoch im Mittel erst ab $OD_{600} \geq 5,3$ (spezifisch für jeden MO; LOD siehe Tabelle 4.10) erstellt werden. Wie in Abbildung 4.48 (oben) deutlich zu erkennen ist, verhalten sich die untersuchten MO sehr unterschiedlich. Selbst bei Verwendung des gleichen Nährmediums sind die Amplitudensignale bei identischer Trübung nicht vergleichbar. Dies wurde am Beispiel der untersuchten Hefen (*S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *P. pastoris*) deutlich. Hierbei unterscheidet sich die Ausbildung des Signalverhaltens von der Produktion des Schaums, das tendenziell eher eine Abhängigkeit vom Medium zeigt. Allen Funktionen ist gemein, dass sie zu höheren Amplituden hin in eine Sättigung laufen.

Tabelle 4.10: Minimal- und Nachweisgrenzen von Basisgröße OD_{600} bei schaumabhängigen Kalibrationen. Die Minimalgrenze besitzt keine statistische Relevanz. Sie gibt ausschließlich die durch die Kalibration mögliche minimale Umrechnung an.

Spezies	Minimalgrenze <i>Sensorsignal</i> [rel. AU]	Minimalgrenze <i>OD₆₀₀</i>	LOD <i>Sensorsignal</i> [rel. AU]	LOD <i>OD₆₀₀</i>
<i>E. coli</i> K12	2.512 ± 592	1,9 ± 2,2	5.016 ± 975	7,1 ± 1,2
<i>K. marxianus</i>	2.710 ± 235	0,2 ± 0,1	4.555 ± 495	6,3 ± 1,0
<i>L. zea</i>	1.063 ± 7	0,2 ± 0,1	1.122 ± 28	0,4 ± 0,1
<i>P. pastoris</i>	7.394 ± 146	0,2 ± 0,1	13.135 ± 169	11,4 ± 0,2
<i>S. cerevisiae</i>	2.114 ± 233	0,4 ± 0,3	4.116 ± 501	3,1 ± 0,7

Die ungleichmäßige Ausbildung submersen Schaums in Kultivierungen innerhalb eines MO führt dazu, dass die Validierungen der Kalibrationen nicht immer eindeutig sind. Werden die absoluten Fehler (RMSEP) der untersuchten MO miteinander verglichen, sind absolute Fehler zwischen 0,82 für $RMSEP_{E. coli K12}$ und 3,97 für $RMSEP_{S. cerevisiae}$ zu beobachten (Tabelle 4.11, unten). Aus der Praxis ist bekannt, dass Hefekultivierungen zu stärkerer Schaumbildung neigen. Der hohe absolute Fehler bei *S. cerevisiae* zeigt,

dass die Schaumentwicklung und der daraus resultierende Einfluss auf das Sensorsignal innerhalb eines MO durchaus unterschiedlich sind.

Tabelle 4.11: Ergebnisse schaumabhängiger Kalibrationsmodelle. Die Modelle beruhen auf mind. drei Kultivierungen. Zwei Kultivierungen dienten der Kalibrationserstellung, eine hiervon unabhängige wurde zur Validierung des Modells verwendet.

Spezies	χ^2 OD_{600}	R^2 OD_{600}	RMSEP OD_{600}	Mittlerer Fehler OD_{600}
<i>E. coli</i> K12	0,34	0,98	0,82	10,91
<i>P. pastoris</i>	0,93	0,99	1,25	24,35
<i>S. cerevisiae</i>	0,33	0,96	3,97	16,48

} $\emptyset = 17,25\%$

Zusammenfassend gilt, dass die Validierung erstellter Modelle in schaumabhängigen Kalibrationen sehr schwierig ist. Festgelegte Kultivierungsbedingungen bilden die Grundlage für die Umrechnung des Streulichtsignals in eine bekannte Basisgröße. Da der sich während der Kultivierung bildende Schaum das Sensorsignal jedoch nicht reproduzierbar erhöht, können durch eine Validierung auch keine reproduzierbaren Kalibrationen in ausreichender Form erstellt werden. In den validierten Kalibrationen des vorgestellten Sensormoduls sind durchschnittliche Messabweichungen von 17,25% unvermeidbar. Um mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Multisensorsystem eine Alternative zu herkömmlicher offline-Analytik der Biomasse bieten zu können, ist eine Verbesserung der Messgenauigkeit bezüglich der Kalibrationen zwingend erforderlich.

4.3.5 Schaununabhängige Kalibrationen

Wird dem Kulturgut ein Antischaummittel hinzugefügt (z.B. TEGO[®] AF KS 911), kann ein wesentlich genauerer Wachstumsverlauf während der Kultivierungsphase durch das Streulichtsignal dargestellt werden. Anhand der Beispielkultivierung von *E. coli* K12 in TB-Medium wird gezeigt, dass das Rauschverhalten gegenüber Kultivierungen ohne Schaumhemmer stark abgenommen hat (Abbildung 4.49, unten). Weiterhin ist ein sägezahnartiges Verhalten durch Probennahme nicht mehr zu beobachten. Mit dieser Signalverbesserung wird eine höhere Präzision in der Kalibrationsbildung erreicht. Es wurden für jeden MO Kalibrationen zu den Basisgrößen OD_{600} , BTM und ZZ erstellt, in denen der verbesserte online-Messwert nach der Probennahme (Abschnitt 4.3.2, S. 68f.) als Streulichtwert verwendet wurde. Einzelne Kultivierungsexperimente dieses Abschnitts entstanden in Zusammenarbeit mit C. UDE und sind ebenfalls Bestandteil einer durch den Autor betreuten Abschlussarbeit [67].

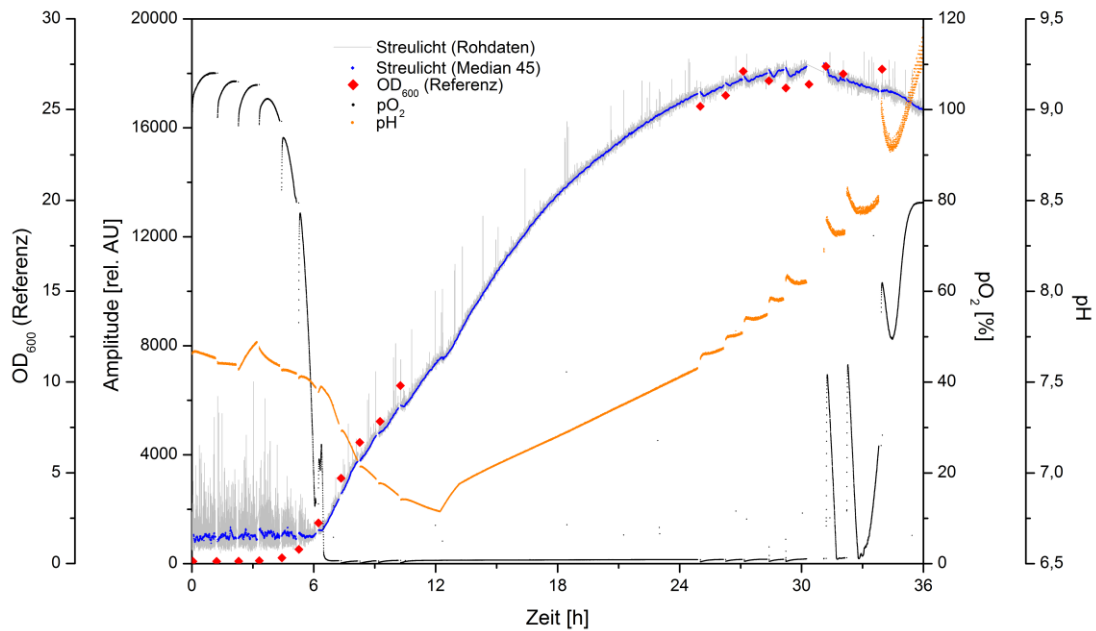


Abbildung 4.49: Kultivierung von *E. coli* K12 in TB-Medium unter Zugabe eines Antischaummittels.

Aus den Datensätzen von jeweils zwei Kultivierungen wurden Wertepaare unterschiedlicher MO erstellt. Im Gegensatz zu schaumabhängigen Kultivierungen beginnen unter Verwendung konstanter Messbedingungen (Tabelle 4.12, unten) alle Kultivierungen im Mittel bei einem verringerten Grundsignal von 1.452 rel. AU (Reduzierung der Amplitude um 41,2%). Werden hiervon abweichende Bedingungen verwendet, verändert sich auch das Grundsignal des Sensors. Am Beispiel von *L. zeae* wird eine erhöhte Amplitude bei Verringerung der Schüttelfrequenz (100 rpm) und Verwendung eines NB-Kolbens auf 2.301 rel. AU registriert. Die Erhöhung des Grundsignals ist durch verstärkte Reflexionseigenschaften aufgrund einer weniger stark geneigten Grenzfläche zum Detektor hin zu erklären. Für jeden MO wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen getestet. Allen Kalibrationen ist gemein, dass auch in schaumfreien Kultivierungen kein linearer Zusammenhang besteht. Die Basisgrößen OD_{600} und BTM verhalten sich zum Sensorsignal in allen untersuchten Kultivierungen sehr ähnlich. Im vorliegenden Messbereich (spezifisch; teilweise bis $OD_{600} = 30,3$ bzw. $BTM = 7,2$ g/L) zeigen Bakterien ein Verhalten nach BELEHRADEK. Für Hefezellen konnte eine vereinfachte Form der BLEASDALE-NELDER-Funktion gefunden werden. Bis ca. $OD_{600} \leq 15$ zeigen die Kalibrationen beider Arten für OD_{600} und BTM ebenfalls sehr gute Ergebnisse mit einer logarithmischen Funktion. Kalibrationen des Amplitudensignals mit Basisgröße ZZ folgen hingegen im gesamten untersuchten Messbereich in fast allen Fällen einer logarithmischen Anpassung. Eine Ausnahme bildet *P. pastoris*, das durch morphologische Änderungen während der Kultivierung in ein anderes Verhalten übergeht (siehe unten, Abbildung 4.53, S. 83).

Tabelle 4.12: Kultivierungsbedingungen der untersuchten Mikroorganismen (schaumunabhängig).

Spezies	Medium	Kolbenart [mL]	Füllvolumen [mL]	Drehzahl [rpm]	Temperatur [°C]
<i>B. megaterium</i>	LB	500/WB	100	150	37
<i>E. coli</i> K12	TB/LB/MM	500/WB	100	150	37
<i>K. marxianus</i>	YM	500/WB	100	150	30
<i>L. zeae</i>	MRS	500/NB	100	100	37
<i>P. pastoris</i>	YM	500/WB	100	150	30
<i>S. cerevisiae</i>	YM	500/WB	100	150	30

In Abbildung 4.50 sind die Kalibrationen der untersuchten MO mit Basisgröße OD₆₀₀ dargestellt.

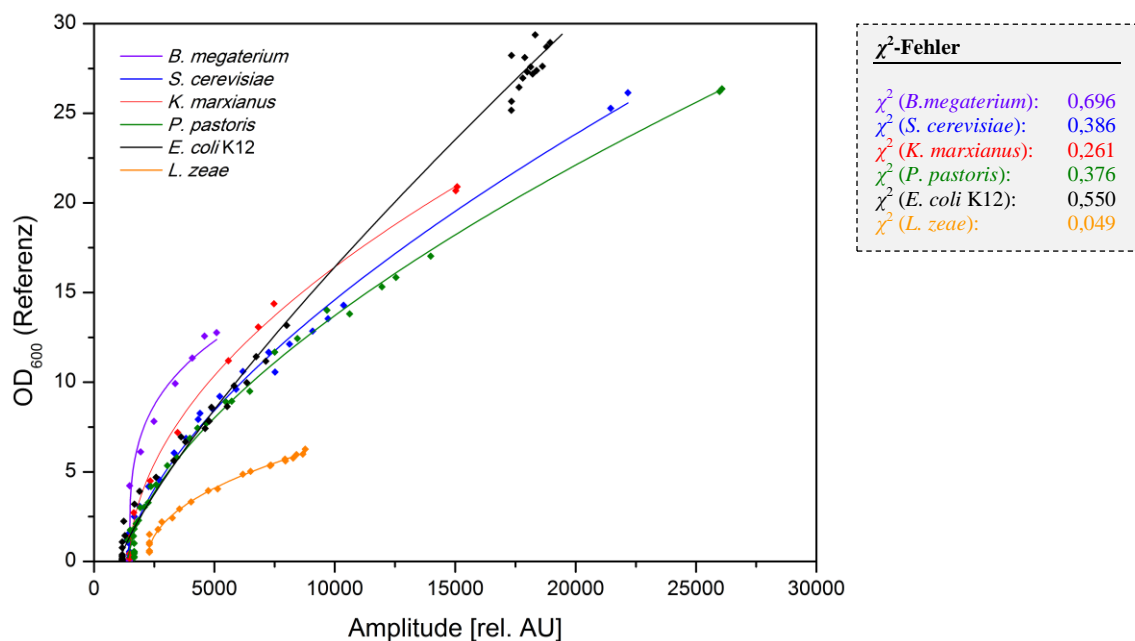


Abbildung 4.50: Kalibrationen des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße OD₆₀₀. Die Güte der jeweiligen Regressionen entspricht der Minimierung des χ^2 -Fehlers.

Es ist festzustellen, dass die Funktionsparameter der verwendeten Formeln spezifisch für jeden MO sind. Innerhalb einer Domäne (Prokaryoten, Eukaryoten) und selbst bei Verwendung des gleichen Nährmediums (YM-Medium bei *S. cerevisiae*, *K. marxianus* und *P. pastoris*) werden die Koeffizienten der verwendeten Kalibrationen speziell für jeden MO ermittelt. Eine Übertragung der Funktionen für den gesamten Bereich ist in realen Systemen nicht möglich. Trotz spezifischer Kalibrationen zeigen unterschiedliche MO jedoch in einigen Teilbereichen sehr ähnliche Verhaltensweisen. So werden bei *E. coli* K12 und *S. cerevisiae* zwischen OD₆₀₀ = 1,5 – 10,7 Amplitudenwerte mit einer Abweichung von < 5% erhalten. Weiterhin sind ähnliche Kalibrationen bei *S. cerevisiae* und *P. pastoris* zu beobachten (OD₆₀₀ ≤ 6,7; Abweichung < 5%). Eine Tabelle hierzu befindet sich im Anhang (Tabelle B.6, S. 133). Kalibrationen zwischen dem Sensorsignal und der optischen Dichte zeigen bei einer OD₆₀₀ ≥ 1,5 im Allgemeinen eine ausreichende Genauigkeit. In Abhängigkeit vom

reduzierten Messrauschen durch Zugabe eines Antischaummittels wird ein Grundsignal von 1.467 ± 517 rel. AU (exklusive *L. zeaе*) erhalten, aus dem sich ein zuverlässiger Nachweis ergibt. Die Berechnung der LOD führt im Mittel zu einem Amplitudensignal von 1.885 ± 464 rel. AU (spezifische Werte, Übersicht in Tabelle 4.13, S. 84). Hieraus entsteht für die Basisgröße OD_{600} abhängig vom beobachteten MO ein statistisch gesicherter Kalibrationsbereich ab $OD_{600} = 1,2 - 6,1$. Im Vergleich zu schaumabhängigen Kalibrationen (Konfidenzintervall zwischen $OD_{600} = 3,1 - 11,4$) besitzen schaumunabhängige Kalibrationen eine deutlich niedrigere LOD. Außerhalb des Kalibrationsbereichs gilt, dass mittlere relative Abweichungen $> 70\%$ für *E. coli* K12 und *S. cerevisiae* bzw. $> 40\%$ für *L. zeaе* festzustellen sind. Umrechnungen des Sensorsignals in OD_{600} sind im diesem Bereich nicht möglich. Innerhalb der Kalibration sind deutlich niedrigere mittlere relative Fehler zu registrieren (2,13% für *L. zeaе*, 11,93% für *S. cerevisiae*). Unter Einhaltung definierter Bedingungen werden durch die Kalibrationen im betrachteten Messbereich reproduzierbare Prozessdaten für *E. coli* K12, *L. zeaе*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* erhalten. Die RMSEP lagen in allen validierten MO unter einem absoluten Fehler von 0,5 rel. AU, so dass schaumfreie Kultivierungen erheblich genauer überwacht werden können (Tabelle 4.11, S. 78). Auch bei Betrachtung der Basisgröße BTM (Abbildung 4.51) zeigt sich, dass eine Übertragung der Kalibrationen untereinander über den gesamten Kalibrationsbereich nicht möglich ist.

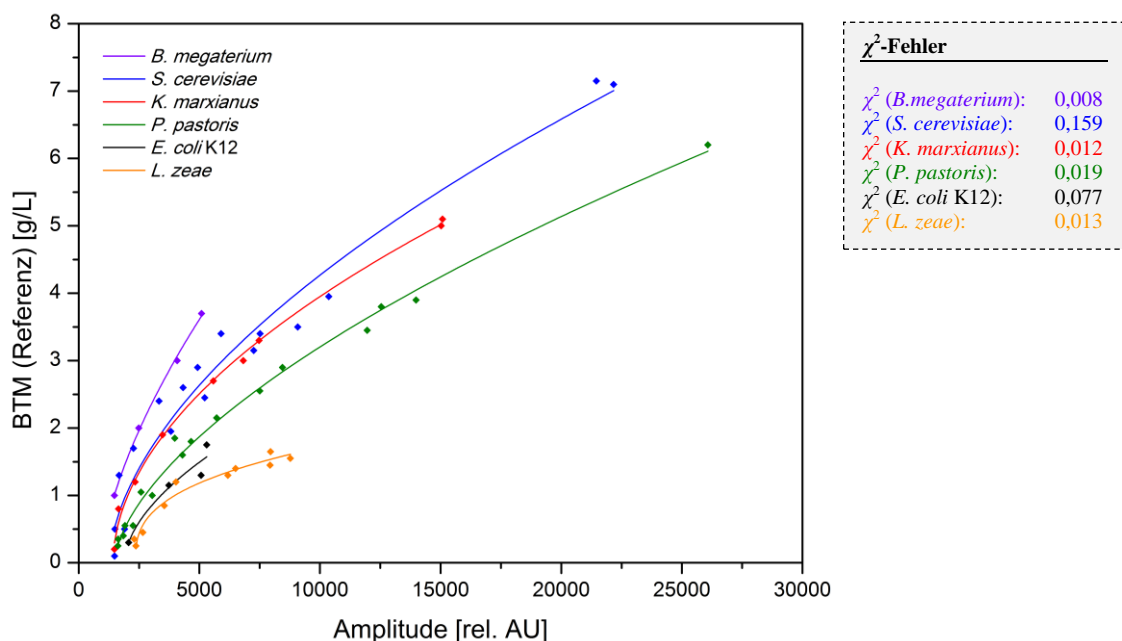


Abbildung 4.51: Kalibrationen des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße BTM. Die Güte der jeweiligen Regressionen entspricht der Minimierung des χ^2 -Fehlers.

Die Startamplituden der Regressionen sind zwar auch hier annähernd gleich, entwickeln sich mit zunehmender Amplitude jedoch sehr unterschiedlich. Im Bereich zwischen

0,3 – 2,5 g/L gleichen sich *S. cerevisiae* und *K. marxianus* mit einer Abweichung von < 10% (vgl. Tabelle B.7, S. 133). Die Möglichkeit zur Bestimmung der BTM aus dem online-Signal des Streulichtsenors ist für *P. pastoris* ab 0,16 g/L, für *B. megaterium* ab einem Mindestwert von 0,99 g/L zu beobachten. Eine statistische Aussagekraft besitzen die Kalibrationen jedoch erst ab der jeweiligen LOD (Übersicht in Tabelle 4.13, S. 84). Validierte Prozessdaten konnten für *E. coli* K12, *L. zaeae*, *P. pastoris* und *S. cerevisiae* ermittelt werden. Die mittleren relativen Fehler schwankten zwischen 5,01% (*S. cerevisiae*) und 14,76% (*L. zaeae*) und sind mit den Prozessdaten für OD₆₀₀ vergleichbar. In allen Kalibrationen steigt die Güte der Regression mit zunehmender Größe des kalibrierenden Wertes. So ist am Beispiel von *P. pastoris* bei einer BTM von 0,95 g/L eine relative Abweichung von 12,76% zu beobachten, bei 6,0 g/L zeigt die Regression deutlich bessere Resultate (2,68%). Es kann daher festgehalten werden, dass die Güte der Kalibrationen eine Abhängigkeit zum betrachteten Messbereich besitzt. Die mittleren absoluten Fehler (RMSEP) führten zu Werten zwischen 0,10 – 0,18 g/L und deuten somit auf eine sehr hohe Reproduzierbarkeit bei der Kalibration der BTM hin (Tabelle 4.14, S. 84).

Als dritte Basisgröße wurde die Zellzahl (ZZ) für eine Kalibration mit dem Sensorsignal kalibriert. Anhand von Abbildung 4.52 ist zu erkennen, dass das Signalverhalten unterschiedlicher MO stark von der Zellmorphologie abhängt.

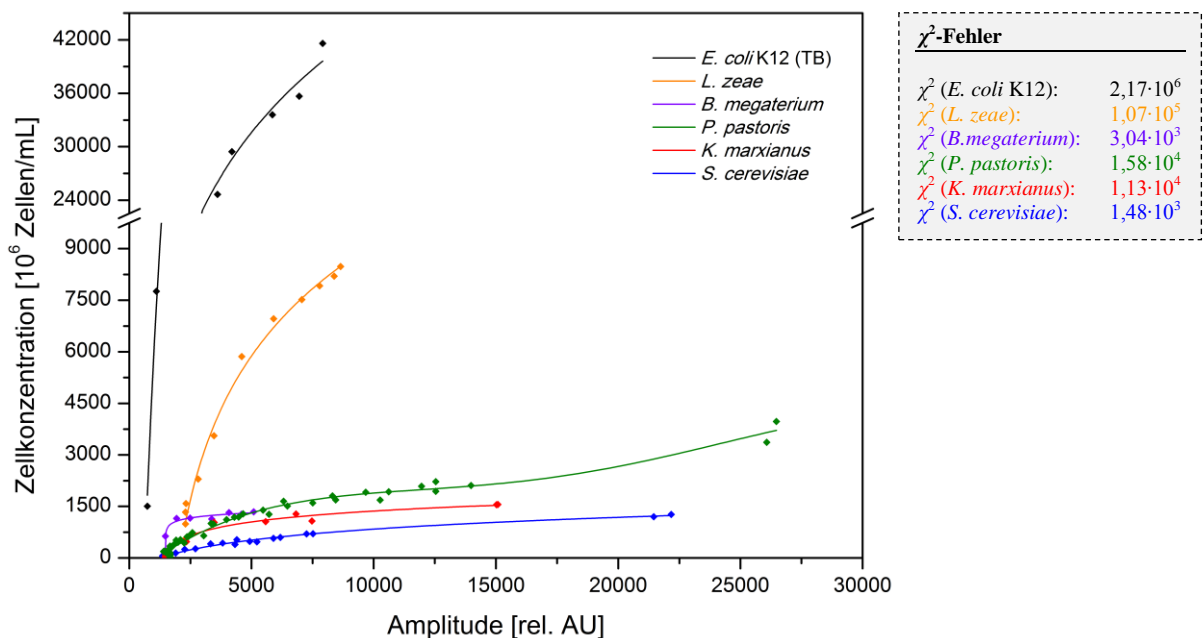


Abbildung 4.52: Kalibrationen des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße ZZ. Die Güte der jeweiligen Regressionen entspricht der Minimierung des χ^2 -Fehlers.

Größere Zellen (Hefen) streuen pro Zelle mehr Licht als kleinere (Bakterien). Die Signalentwicklung ist somit hauptsächlich von der Größe der suspendierten Zellen im Nährmedium abhängig. Es ist eine Zunahme der Streuintensität mit Vergrößerung der

Zelle in der Reihe von *E. coli* K12 über *P. pastoris* bis hin zu *S. cerevisiae* zu beobachten.

Am Beispiel von *P. pastoris* wird weiterhin deutlich, wie wichtig eine während der Prozessüberwachung gleichbleibende Zellmorphologie für die Systemkalibration ist. Abbildung 4.53 zeigt, dass sich mit zunehmender Kultivierungsdauer die durchschnittliche Zellgröße um ca. 18% reduzierte. Es ist anzunehmen, dass das Fehlen des Substrats nach ca. 13 h zu dieser Zellgrößenverkleinerung geführt hat. Durch Reduzierung der Zellgröße veränderte sich das Streulichtverhalten bezüglich der logarithmischen Anpassung, so dass eine polynomische Regression gewählt werden musste.

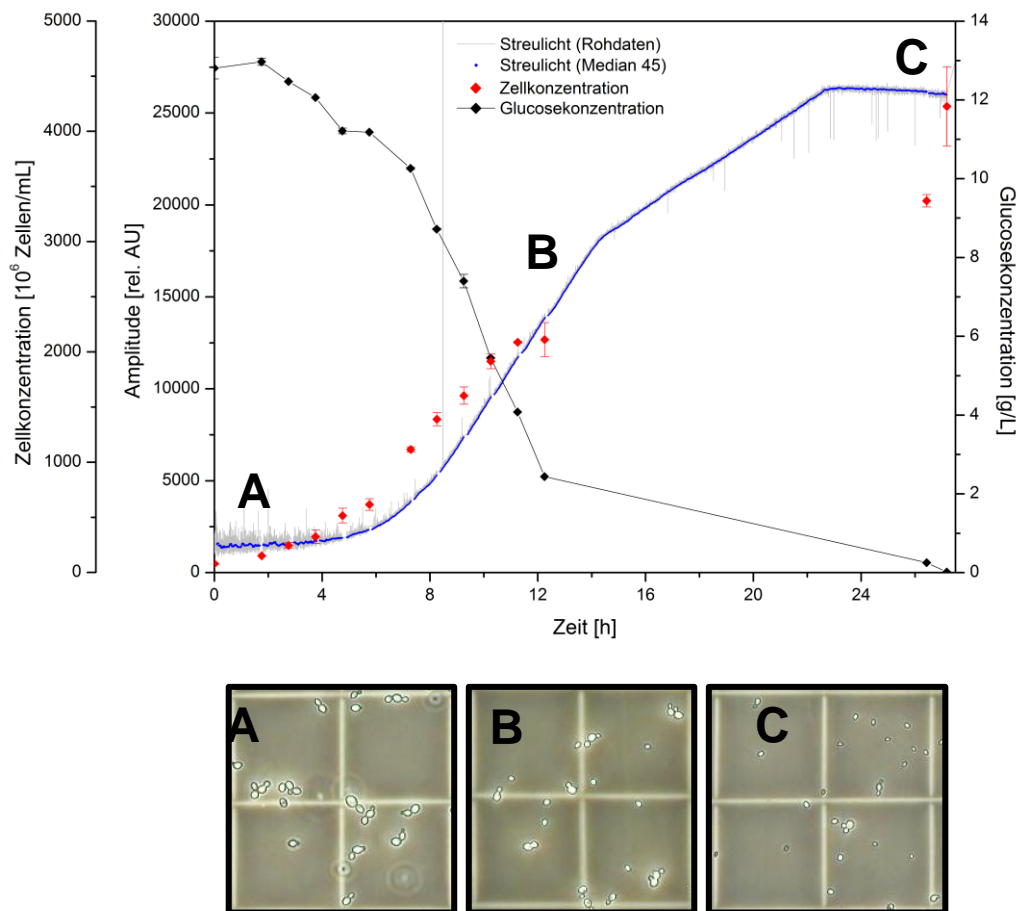


Abbildung 4.53: Einfluss der Substratlimitierung auf die Zellgröße am Beispiel von *P. pastoris*. Mittlere Zellgröße bei Kultivierungsbeginn (A) $14,71 \pm 0,49 \mu\text{m}^2$, nach ca. 12 h (B) $14,32 \pm 0,12 \mu\text{m}^2$, bei Kultivierungsende (C) $12,07 \pm 0,53 \mu\text{m}^2$.

Vorstehendes Beispiel zeigt die hohe Empfindlichkeit des Sensors, der derartige Veränderungen der Zellmorphologie durch Abweichung von der Kalibration erkennen kann. Valide Prozessdaten konnten für *P. pastoris* und *S. cerevisiae* erhalten werden. Für *S. cerevisiae* ergab sich eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit, sowohl im mittleren relativen (7,63%) als auch im mittleren absoluten Fehler ($3,2 \cdot 10^7$ Zellen/mL).

Der erhöhte mittlere relative Fehler bei *P. pastoris* von 15,96% könnte durch ungleichmäßige Zellgrößenveränderung innerhalb der Kultivierungen zu erklären sein. In den Tabelle 4.13 und Tabelle 4.14 sind die Kalibrierungsergebnisse der Basisgrößen OD₆₀₀, BTM und ZZ zusammengefasst.

Tabelle 4.13: Nachweisgrenzen der Basisgrößen OD₆₀₀, BTM und ZZ schaumunabhängiger Kalibrationen.

Spezies	LOD	LOD	LOD	LOD
	Sensorsignal [rel. AU]	OD ₆₀₀	BTM [g/L]	ZZ [10 ⁶ Zellen/mL]
<i>B. megaterium</i>	1.758	6,2	1,31	1.012
<i>E. coli</i> K12	1.402 ± 020	1,2 ± 0,1	0,96 ± 0,01	12.209 ± 2.329
<i>K. marxianus</i>	1.829	3,2	0,80	371
<i>L. zeae</i>	2.733 ± 056	1,9 ± 0,1	0,60 ± 0,03	2.342 ± 143
<i>P. pastoris</i>	1.632 ± 076	1,7 ± 0,3	0,70 ± 0,09	85 ± 15
<i>S. cerevisiae</i>	1.793 ± 135	2,1 ± 0,4	0,43 ± 0,11	297 ± 59

Tabelle 4.14: Ergebnisse schaumunabhängiger Kalibrationsmodelle für Basisgröße OD₆₀₀, BTM und ZZ. Zur Erstellung der Kalibrationen wurden Datensätze aus mind. zwei Kultivierungen herangezogen. Zur Validierung (RSMEP, mittlerer Fehler) wurde jeweils eine hiervon unabhängige Kultivierung verwendet. Einheiten für BTM (in g/L) und ZZ (in 10⁶ · Zellen/mL) gelten für alle dargestellten Werte.

Spezies	χ^2			R^2			RMSEP			Mittlerer Fehler [%]		
	OD ₆₀₀	BTM	ZZ	OD ₆₀₀	BTM	ZZ	OD ₆₀₀	BTM	ZZ	OD ₆₀₀	BTM	ZZ
<i>B. megaterium</i>	0,696	0,008	0,003	0,974	0,994	0,992	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> K12	0,550	0,077	2,167	0,996	0,789	0,989	0,42	0,18	-	7,63	10,09	-
<i>K. marxianus</i>	0,260	0,012	0,011	0,996	0,996	0,968	-	-	-	-	-	-
<i>L. zeae</i>	0,049	0,013	0,107	0,989	0,948	0,989	0,09	0,10	-	2,13	14,76	-
<i>P. pastoris</i>	0,392	0,019	0,016	0,992	0,992	0,980	0,36	0,14	226	6,71	11,21	15,96
<i>S. cerevisiae</i>	0,386	0,159	0,002	0,992	0,959	0,988	0,41	0,15	32	11,93	5,01	7,36

Zusammenfassend gilt, dass die Verwendung eines Antischaummittels für die automatisierte Prozessüberwachung im vorgestellten Multisensorsystem zu einer deutlichen Verbesserung der Präzision der Kalibrationen führt. Es konnte ein reduzierter mittlerer Fehler von 8,76% der validierten MO erreicht werden. Weiterhin wurde die LOD gegenüber schaubildenden Kulturen gesenkt. Durch die Betrachtung der Zellkonzentration gegen das Amplitudensignal des Streulichtsensoren konnte als größter Einfluss auf die Erstellung von Kalibrationen die Zellgröße ermittelt werden. So ist eine korrekte Prozessüberwachung der Zellzahl als Referenzgröße zur Biomasse durch den hier vorgestellten Sensor nur möglich, wenn während der Kultivierungsphasen eine Änderung der Zellmorphologie ausgeschlossen werden kann.

4.3.6 Schlussfolgerung zum Einsatz des Streulichtensors im Bioprozess

Der in dieser Arbeit vorgestellte Multisensorprototyp wurde in zahlreichen Kultivierungen unterschiedlicher MO auf Robustheit und Reproduzierbarkeit der Messwerte getestet. Für die Kalibrationserstellung ist ein digitaler Medianfilter mit einer Fensterbreite 45 sinnvoll, um den Wachstumsverlauf der Zellen präziser verfolgen zu können. Hierdurch muss eine verzögerte Ausgabe der fortlaufenden real-time Messdaten jedoch toleriert werden. Für die Kalibrationserstellung ist die Ansammlung von online-/offline-Wertepaaren notwendig. Im Rahmen der praktischen Arbeiten konnte über einen veränderten Medianfilter das Sensorsignal nach Probennahme weiter verbessert werden. Es zeigte sich, dass die Prozessüberwachung stark durch submersen Schaum im Medium während einer Kultivierung beeinträchtigt wird. Ein undefinierter Signalanteil entsteht durch Schaumreflexionen, so dass innerhalb der Kalibrationen mit Messfehlern von 17,25% zu rechnen ist. Die Messgenauigkeit innerhalb einer Kalibration lässt sich durch Zugabe eines Antischaummittels deutlich verbessern. Im direkten Vergleich (OD_{600}) konnte eine Reduzierung des mittleren relativen Fehlers von 17,25% auf 8,76% der validierten MO erreicht werden. Die fehlende Schaumproduktion führt im Bioprozess zudem zu einer niedrigeren LOD, so dass die Kalibrationen bereits für geringere Trübungswerte reproduzierbar verwendet werden können.

4.4 Potential der neuen Sensortechnologie

In den vorangegangenen Abschnitten wurden eingehend die Entwicklung, Charakterisierung und Funktionsweise des Streulichtensors als Teil eines Multisensorsystems besprochen. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Übertragung des Sensorsignals in eine für den Anwender bekannte Prozessgröße. In diesem Abschnitt sollen die Vorteile vorgestellt werden, die sich aus der hohen Datendichtekombiniert mit der hohen Sensitivität dieser optischen Messmethode, ergeben. Aus der automatisierten Prozessüberwachung können wichtige Informationen für das Verständnis einer Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab gewonnen werden. Das kurze Messintervall von bis zu 7 s führt dazu, dass innerhalb von 24 h über 12.000 Messwerte erhalten werden, die durch die digitale Datenaufbereitung mit einer geringen zeitlichen Verzögerung ausgegeben werden.

Zunächst werden diauxische Wachstumsverhalten in Schüttelkolben betrachtet, die selbst bei schnellem Substratwechsel durch den hier vorgestellten Streulichtsensor identifiziert werden können. Fortführend wird der Fokus auf die Wachstumsbeobachtung provozierten Biomassezunahme im fed-batch-Betrieb gelegt. Es soll gezeigt werden, wie der Sensor auf plötzliche Substratzugaben reagiert. Im

letzten Teil wird das Applikationsspektrum dieser neuen Sensortechnologie erweitert. Eine hohe Datendichte führt dazu, dass selbst in teilweise heterogenen Kulturen, u.a. Pilzkulturen, nicht invasive, optische Prozessüberwachungen der Biomasse im Schüttelkolbenmaßstab möglich werden. Am Beispiel von zwei mycelbildenden Suspensionspilzen (*A. niger*, *F. velutipes*) wird diese neue Applikation vorgestellt.

4.4.1 Überwachung von Wachstumskurven mit zwei Kohlenstoffquellen

Der in dieser Arbeit vorgestellte Streulichtsensor besitzt die Möglichkeit, während des Fermentationsprozesses ein diauxisches Wachstum zu detektieren. Im Allgemeinen entsteht bei einem Substratwechsel im Laufe einer Kultivierung eine temporäre Wachstumshemmung. Abhängig von äußeren Faktoren (u.a. Adaptation des MO an die neue Kohlenstoffquelle) kann die Umgewöhnungsphase jedoch sehr kurz sein. Zur Demonstration der hohen Sensitivität der Streulichtsensorik wurde am Beispiel von *E. coli* K12 ein diauxisches Wachstumsverhalten mit Glucose und Lactose provoziert. Die praktische Durchführung der Arbeiten entstand in einer vom Autor betreuten Abschlussarbeit [67].

E. coli K12 wurde in Minimalmedium aus einer Vorkultur mit Glucosemonohydrat (10 g/L) angezchtet, anschließend die zu überwachende Kultur hiermit inokuliert ($OD_{600} = 0,27$). Diese Hauptkultur wurde mit einer Kombination aus Glucose ($c_0 = 2,92$ g/L) und Lactose ($c_0 = 2,18$ g/L) versetzt. *E. coli* K12 verwendet im Minimalmedium für das Zellwachstum zunächst die für sich besser zu verstoffwechselnde Glucose, anschließend erfolgt der Wechsel zur zweiten Kohlenstoffquelle Lactose. Während der gesamten Kultivierungszeit wurden Proben zur offline-Analytik entnommen, um hieraus einen Bezug zwischen Substratabnahmen und dem Streulicht herstellen zu können. In Abbildung 4.54 (unten) ist die Prozessüberwachung von *E. coli* K12 mit zwei Kohlenstoffquellen dargestellt.

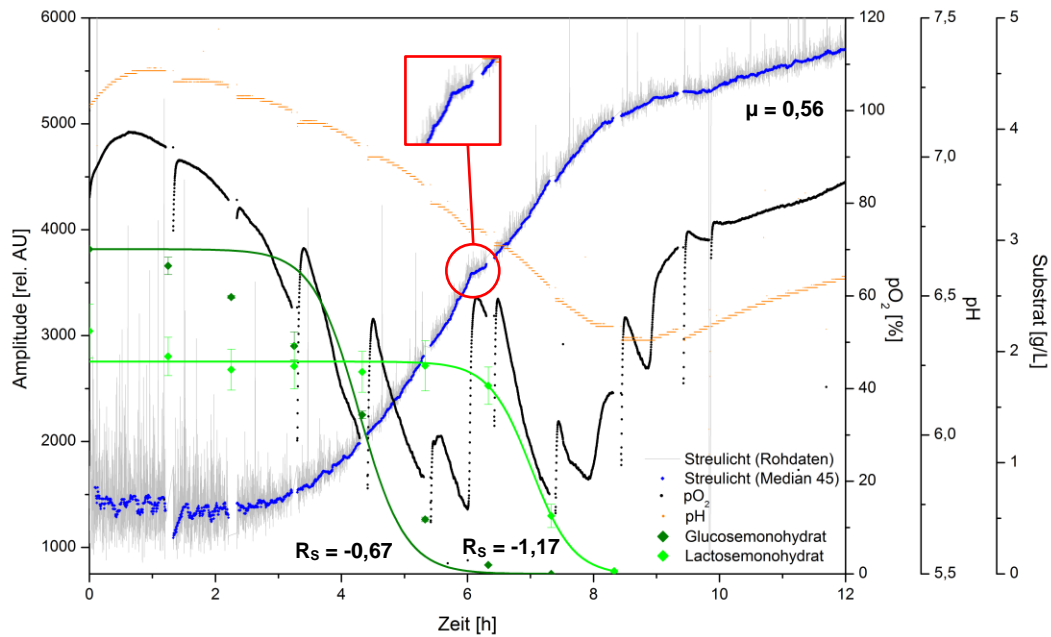


Abbildung 4.54: Prozessüberwachung einer Kultivierung mit zwei Kohlenstoffquellen am Beispiel von *E. coli* K12. Als Substrate wurden Glucose- und Lactosemonohydrat verwendet. Roter Kasten: Temporäre Wachstumshemmung durch Substratwechsel.

Durch das Streulichtsignal konnte ein metabolischer Wechsel nach ca. 6 h festgestellt werden (roter Kasten). Die Änderung der Kohlenstoffquelle ist eindeutig durch das kurzzeitige Abflachen des Amplitudensignals bei 3.600 rel. AU zu beobachten. Unterstützt wird diese Aussage durch den gleichzeitigen Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration um 45% innerhalb von 13 min im geschlossenen System (bei Berücksichtigung der Verschiebung des Medianfilters um 45 Messwerte). Zu Beginn des Wechsels betrug die Glucose nur noch 246,5 mg/L. Die Konzentration der Lactose hatte sich bis zu diesem Zeitpunkt nur geringfügig verändert ($c_{5,3\text{h}} = 1,87\text{ g/L}$). Die Metabolisierung von Lactose ($R_S(\text{Lactose}) = -1,17$) begann somit kurz bevor die Glucose ($R_S(\text{Glucose}) = -0,67$) vollständig verbraucht wurde.

Wird die Kultivierung ohne Probennahme durchgeführt, ist die Identifizierung des Substratwechsels zwischen Glucose und Lactose aufgrund der schlechteren Sauerstoffversorgung erschwert. Es wurden mehrere temporäre Sauerstoffanstiege festgestellt. Abbildung 4.55 (unten) zeigt die Prozessüberwachung von *E. coli* K12 mit zwei Kohlenstoffquellen ohne Eingriff ins System.

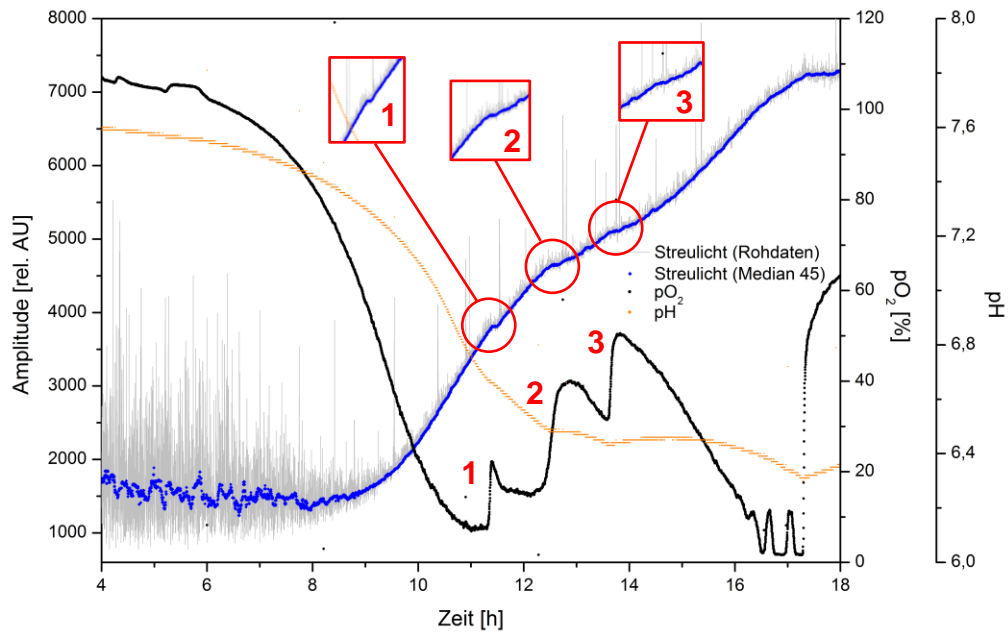


Abbildung 4.55: Prozessüberwachung einer Kultivierung mit zwei Kohlenstoffquellen am Beispiel von *E. coli* K12 ohne Probennahmen. Beobachtung des Metabolitenwechsels im geschlossenen System.

Bei jedem Sauerstoffanstieg wurde das Streulichtsignal temporär gehemmt. Der erste Wachstumsstopp (1) trat nach dem Erreichen der Sauerstofflimitierung ein, (2) und (3) folgten im Abstand von je 1 h. Aufgrund des starken Sauerstoffverbrauchs nach (3) ist zu vermuten, dass es sich hierbei um die Umstellung des Metabolismus auf Lactose handelt (Sauerstoffverbrauch sinkt innerhalb von 2 h um 50%). Der zweite unbekannte Einfluss im batch-Betrieb ist durch die Literatur beschrieben. In Kultivierungen von *E. coli* K12 ist nach hoher Glucoseaufnahme die Bildung und Metabolisierung von Acetat bei Sauerstoffmangel möglich. Bekräftigt wird dies ebenfalls durch den zeitlichen Verlauf des pH-Werts, der ab (2) annähernd konstant blieb. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass in Referenzkultivierungen mit einer Kohlenstoffquelle (Glucosemonohydrat) derartige Veränderungen im Streulichtsignal ausschließlich bei Verzicht von offline-Probennahmen entstanden. Wurden während der Kultivierung intervallartig Proben entnommen, entstanden keine derartigen Abweichungen innerhalb der Wachstumskurve (vgl. Abbildung B.14, S. 134).

Durch diese experimentelle Reihe konnte gezeigt werden, dass der vorgestellte Sensor aufgrund seiner hohen Sensitivität durchaus in der Lage ist, diauxische Verhaltensweisen im online-Signal zu detektieren. Wird auf eine Probennahme verzichtet, verkompliziert sich die Bestimmung des Substratwechsels aufgrund weiterer wachstumshemmender Faktoren (Acetatbildung bei *E. coli* K12). Die Informationen aus der Kombination aller optischen Sensoren im entwickelten Prototyp (Streulicht, pO_2 , pH) vereinfachen hierbei die exakte Bestimmung. Durch die Bestimmung der Biomassekonzentration mit konventionellen Analysemethoden wären derartige

Einflüsse auf das Zellwachstum nicht möglich gewesen, da hierfür die Wachstumspausen länger sein müssten, als das entsprechende Intervall zur Probennahme.

4.4.2 Kultivierungen im fed-batch-Betrieb

Um die Veränderung des Sensorsignals auf gezielte Zugabe eines neuen Substrats zu testen, wurde während einer Kultivierung von *P. pastoris* ab Beginn der stationären Phase ein fed-batch-Betrieb durchgeführt. Es sollte überprüft werden, wie das vorgestellte Sensorsystem auf intervallartige Substratzugabe einer neuen Kohlenstoffquelle und ein provoziertes Zellwachstum reagiert. Parallel hierzu erfolgte die Validierung der erstellten Kalibration mit dem Zellwachstum aus einem anderen Stoffwechselprodukt. Die praktische Durchführung erfolgte in Kooperation mit C. UDE. Für die experimentelle Reihe wurde der Deckel eines Plastikschüttelkolbens mit sterilen Zugängen versehen. Einer der Zugänge diente hierbei der Substratzufuhr, einer dem Druckausgleich (0,2 µm Sterilfilter). An einen dritten Zugang wurde ein Septum angeschlossen, über das während der gesamten Kultivierungsphase eine Probennahme möglich war. Die Substratzufuhr erfolgte über eine Peristaltikpumpe. Die Vorratsflasche enthielt als Stoffwechselprodukt 6% (w/v) Glycerol und wurde ebenfalls mit einem Sterilfilter für den Druckausgleich versehen. Abbildung 4.56 zeigt die schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für den fed-batch-Betrieb in Schüttelkolben.

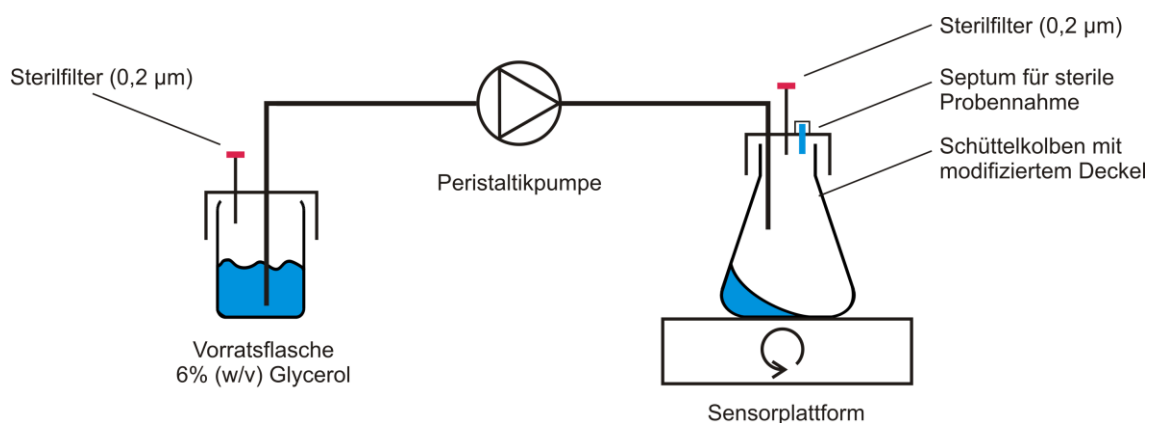


Abbildung 4.56: Schematischer Aufbau eines fed-batch-Betriebs für Schüttelkolben. Für die experimentelle Reihe wurde der Deckel eines zur Verfügung gestellten single-use Schüttelkolbens mit drei sterilen Zugängen modifiziert.

Zur Adaptation von *P. pastoris* an die zweite Kohlenstoffquelle wurden in der Vorkultur sowohl Glucosemonohydrat (10 g/L) als auch Glycerol (0,3% (w/v)) verwendet. Aus vorherigen Kultivierungen ist bekannt, dass *P. pastoris*

(crabtree-negativ) im Schüttelkolben problemlos eine hohe Zelldichte erreicht. Der fed-batch-Betrieb wurde ab dem Beginn der stationären Phase mit einer Fütterungsrate von 1 mL/2 h 6% (w/v) Glycerol begonnen. Die geringe Initialkonzentration von Glucose (ca. 2 g/L) sorgte für einen schnellen Übergang in die Kultivierungsphase. Abbildung 4.57 zeigt den stufenartigen Anstieg durch das provozierte Zellwachstum (Messbedingungen entsprechen Tabelle 4.12, S. 80).

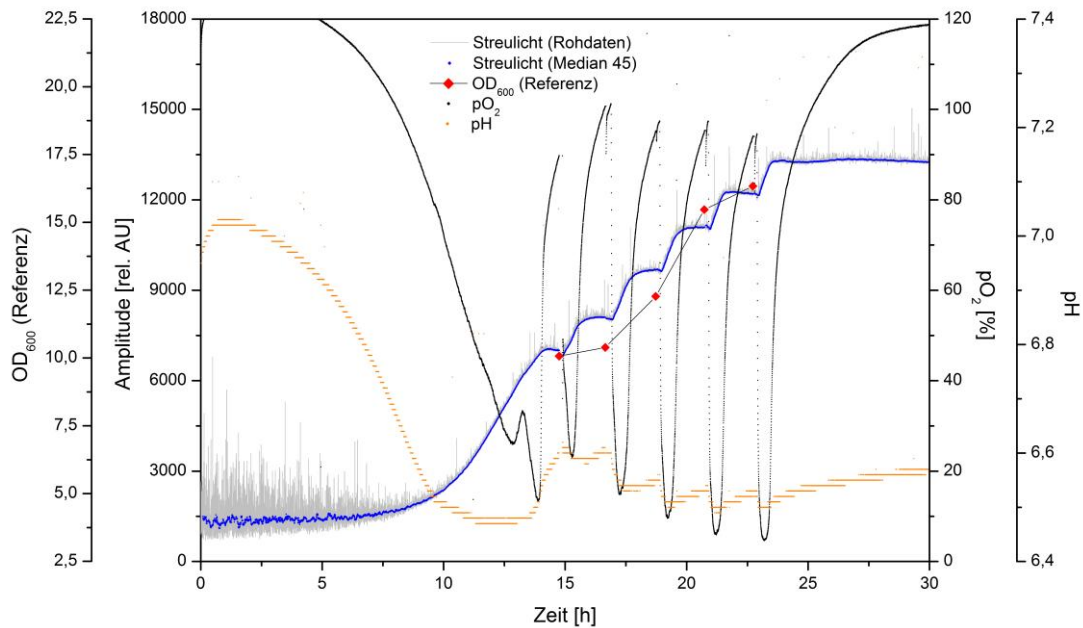


Abbildung 4.57: Prozessüberwachung einer fed-batch-Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab am Beispiel von *P. pastoris*. Provoziertes Wachstum einer Stufenfunktion im online-Signal.

Nach 14 h erreichte die Kultivierung ihre erste stationäre Phase (Sauerstoffanstieg um 75%). Das Sensorsignal wurde hierbei mit > 7.000 rel. AU gemessen, so dass in der Kalibration mit der Basisgröße OD_{600} nur ein geringer Fehler zu vermuten war. Die Amplitude lag zu Beginn des fed-batch-Betriebs deutlich über der LOD (1.632 ± 76 rel. AU). Mit einem Versatz von 1 h wurde der fed-batch begonnen. Es wurden insgesamt fünf Fütterungen durchgeführt. Die Probennahmen zur Validierung der bestehenden Kalibration erfolgten jeweils 10 – 20 min vor der nächsten Substratzugabe.

Nach jeder Zugabe konnte im Streulichtsignal eine Verdünnung des Mediums durch ein temporäres Absinken um 73 ± 74 rel. AU beobachtet werden. Die erste Verdünnung führte hierbei zum größten Signalabfall von > 200 rel. AU. Die höchsten Signalanstiege konnten bei der zweiten und dritten Fütterung (1.645 bzw. 1.470 rel. AU) festgestellt werden. Durchschnittlich stieg das Sensorsignal um 1.333 ± 218 rel. AU. Bei Vergleich von Glucose und Glycerol als Nährstoffquellen war zu erkennen, dass die Steigung des Streulichtsignals bei Glycerol im Mittel um Faktor 1,4 größer war. Die Validierung der bestehenden Kalibration von *P. pastoris* zeigt ein abweichendes Verhalten, besonders in

den Proben 2 und 3. Die Abweichung zum Modell aus Abschnitt 4.3.5 (S. 78f.) ist in Abbildung 4.58 verdeutlicht.

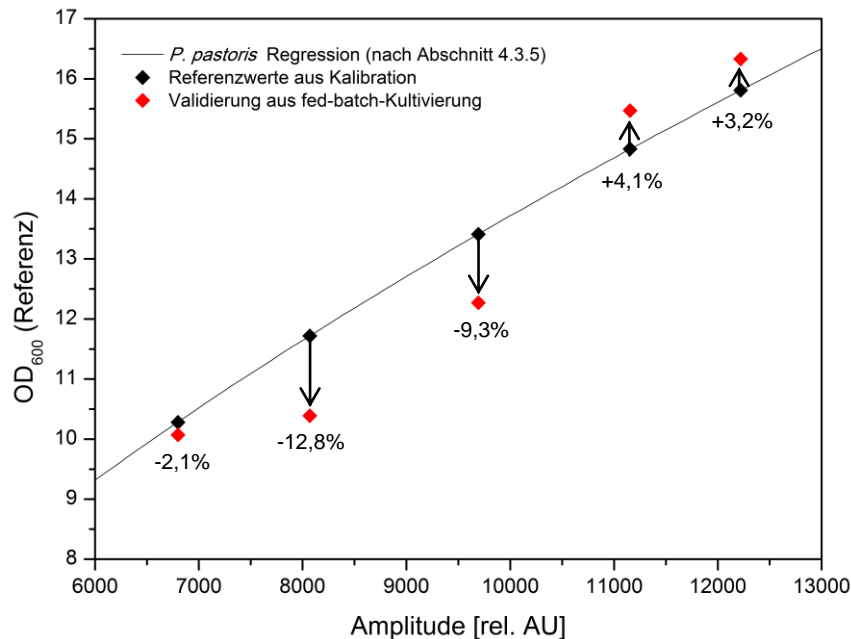


Abbildung 4.58: Validierung der vorhandenen Kalibration von *P. pastoris* mit Referenzwerten aus der fed-batch-Kultivierung mit Glycerol als Kohlenstoffquelle. Die Validierung ergab einen RMSEP von 0,87.

Der Anstieg der Referenzwerte entsprach einem typischen Wachstumsverlauf. Der erste offline-Wert und die beiden letzten wichen nur gering vom Vorhersagemodell ab (2 - 4%). Die starken Abweichungen von Probe 2 und 3 deuten auf eine verlängerte Umstellung von Glucose auf Glycerol als Kohlenstoffquelle hin, die mehrere Stunden andauerte (Probe 1 wurde vor der ersten Glycerolzugabe durchgeführt). Der erhöhte Amplitudenanstieg in diesen Phasen kann durch Veränderung der optischen Eigenschaften der Zellen und des Mediums durch die Glycerolzugabe ohne direkt anschließende Metabolisierung zu erklären sein. Aus Abschnitt 4.2.5 (S. 61f.) ist bekannt, dass selbst kleine Mengen von Glycerol das Signalverhalten des Sensors und damit den Brechungsindex stark beeinträchtigen können. Es ist zu erkennen, dass durch Veränderungen der optischen Eigenschaften ebenfalls die Kalibration beeinflusst wird. Die Annäherung der Referenzwerte aus der fed-batch-Kultivierung an das Vorhersagemodell ab Probe 4 deutet darauf hin, dass sich der Metabolismus an die neue Kohlenstoffquelle angepasst hat und die Zugabe neuen Glycerols direkt umgesetzt wird. Der in dieser Arbeit vorgestellte Sensor ist durch die hohe Datendichte in der Lage, temporäre Abweichungen vom typischen Wachstumsverhalten zu detektieren. Eine intervallartige Zugabe geringer Substratkonzentrationen führt zu mehreren stationären Phasen. Wird der zeitliche Verlauf einer Kultivierung betrachtet, entsteht hierdurch eine Stufenkultivierung, die durch herkömmliche Analyse nicht zu beobachten wäre. Die

Validierung dieses modellierten Wachstums von der Kalibration der Basisgröße OD_{600} zeigt eine gute Übereinstimmung (Abweichungen bis 4%), sobald die Kohlenstoffquelle als Substrat angenommen wird. Bei Verwendung von Glycerol als Kohlenstoffquelle ist eine Vergleichbarkeit mit der erstellten Kalibration nur gegeben, wenn die Substratmenge pro Intervall für das Zellwachstum bereits verbraucht ist. Bereits geringe Mengen an Glycerol haben einen starken Einfluss auf die optischen Eigenschaften der Zellen und des Mediums.

4.4.3 Detektion agglomerierter Zellen in Lösung

Die Detektion der Biomasse mycelbildender Kulturen ist im Allgemeinen sehr umständlich. Aufgrund von Agglomeration der Zellen ist die optische Bestimmung durch Transmissionsmessung ausgeschlossen. Im Gegensatz zu einzelligen MO bildet sich in Pilzkultivierungen ein Geflecht aus mehrzelligen Mycelkugeln. Diese nehmen sowohl in Anzahl als auch in Masse und Volumen zu. Die Kugelgröße wird durch die Messbedingungen beeinflusst (Abbildung 4.59, unten). Die Menge an Biomasse ist jedoch hauptsächlich abhängig von dem verwendeten Substrat. Es gibt eine Proportionalität zwischen gebildeter Biomasse und eingesetzter Kohlenstoffquelle.

Um eine Aussage über die Biomassezunahme zu erhalten, ist im Allgemeinen die Analyse von offline-Proben über die Bestimmung der BTM notwendig. Aufgrund der Heterogenität der Suspension ist die Entnahme einer reproduzierbaren Probe insbesondere bei kleinen Volumina sehr fehleranfällig.

Mit Hilfe des vorgestellten Multisensorsystems kann durch die Detektion des Streulichtsignals, nach einer geeigneten digitalen Aufarbeitung zur Reduzierung des Messrauschens, eine zeitnahe und statistisch relevante Aussage über die Biomassezunahme der Zellen im Schüttelkolben getroffen werden. Das Streulichtsignal nimmt mit fortschreitender Kultivierung aufgrund des Wachstums der vielzelligen Mycelkugeln zu. Dieses optische Signal kann indirekt über die Glucosekonzentration oder direkt mit der BTM kalibriert werden. Beide Kalibrationsmethoden sollen vorgestellt und miteinander verglichen werden.

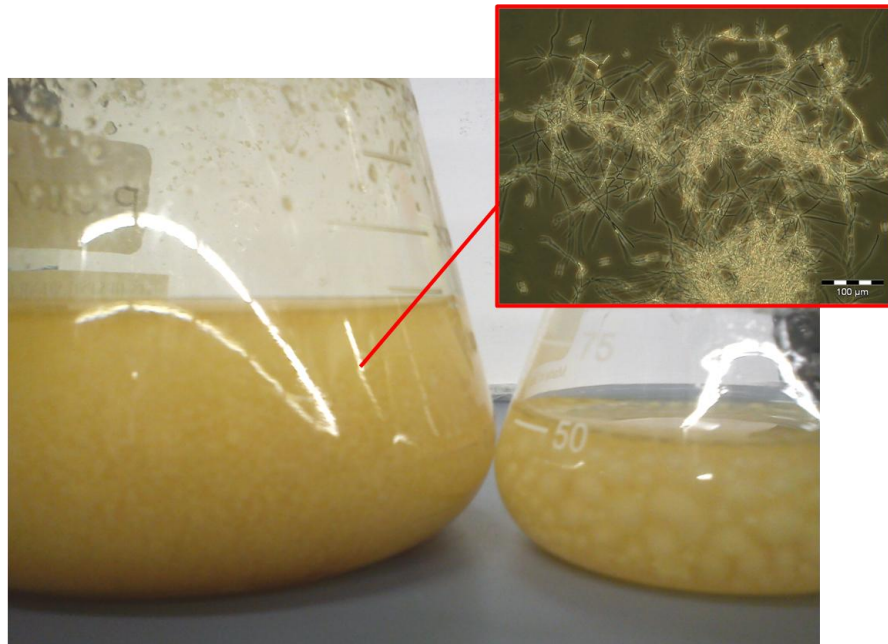


Abbildung 4.59: Darstellung von *F. velutipes* im Schüttelkolbenmaßstab. Durch Änderung der Parameter (hier: Kolbenart) wird die Größe der Mycelkugeln beeinflusst. Rechts (oben): Mikroskopaufnahme des Mycelgeflechts.

Folgende Messbedingungen wurden für die Erstellung der Kalibrationsdaten der mycelbildenden Pilze *A. niger* und *F. velutipes* verwendet (Tabelle 4.15).

Tabelle 4.15: Messbedingungen von Kulturen mycelbildender MO.

Spezies	Medium	Kolbenart [mL]	Füllvolumen [mL]	Drehzahl [rpm]	Temperatur [°C]
<i>F. velutipes</i>	SNL	500/NB	250	150	RT
<i>A. niger</i>	FM	500/NB	100/200	100	RT/30

Zunächst wurde der biotechnologisch wichtige Expressionsstamm *A. niger* getestet. Die Kalibration des Sensorsignals mit der BTM erfolgte unter direkter Messung der Biomasse aus dem Messkolben. Es wurde dem Medium ein Antischaummittel hinzugefügt. Zur Kalibrationserstellung wurden zwei offline-Proben je 24 h (2 mL Volumen) aus dem Messkolben entnommen und zur BTM-Bestimmung eingesetzt. Es wurden insgesamt drei Kultivierungen nacheinander im gleichen System durchgeführt, zwei zur Erstellung und eine dritte zur Validierung der Kalibration. Wie in Abbildung 4.60 (unten) deutlich zu erkennen ist, entsteht durch das inhomogene Geflecht aus Hyphen und Konidien im Gegensatz zu den bisher vorgestellten einzelligen MO selbst bei geringer Schüttelfrequenz und Verwendung von Antischaummittel ein stark verrauschtes Sensorsignal. Mit fortschreitender Kultivierung kann jedoch durch den Sensor der Anstieg der Biomasse statistisch erfasst werden, solange der Medianfilter mit erhöhter Fensterbreite arbeitet.

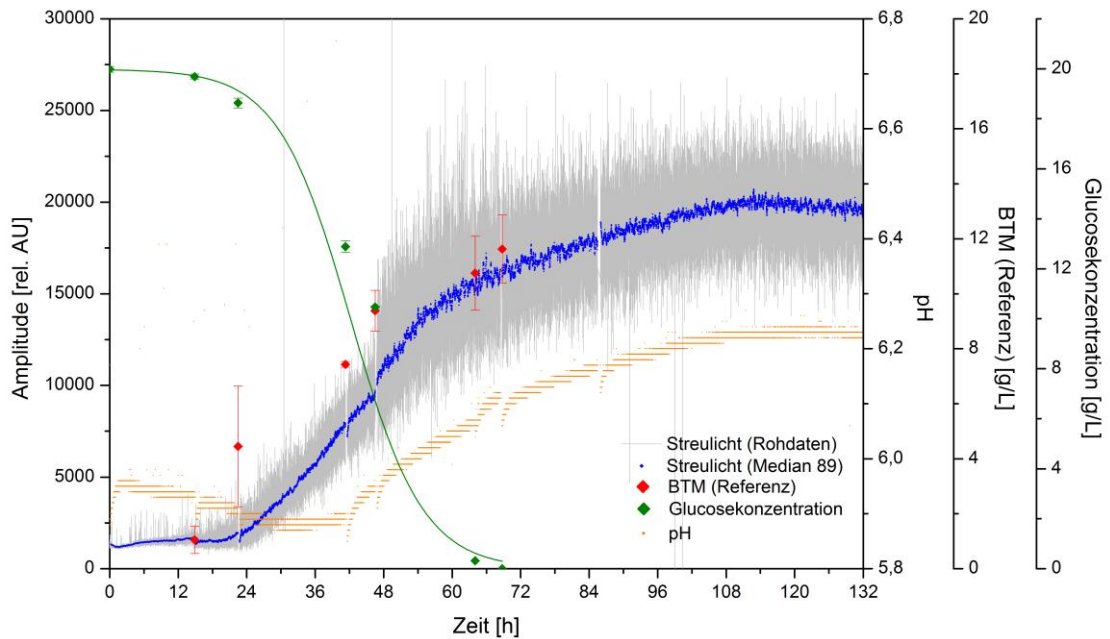


Abbildung 4.60: Prozessüberwachung von *A. niger* in FM-Medium. Aufgrund unterschiedlich großer Mycelkugeln ist die offline-Probennahme fehlerbehaftet. Während aller Kultivierungen überwuchsen die Sensorpatches, so dass die Messungen ausfielen.

Abbildung 4.61 (links) zu erkennen, war eine reproduzierbare Probennahme geringer Volumina aus dem Messkolben extrem schwierig. Die ermittelten offline-Werte zeigen stark schwankende Standardabweichungen. Eine zusätzliche Schwierigkeit bestand in der früheintretenden Substratlimitierung, die zu einem stärker verrauschten Sensorsignal führte. Durch erhöhte Initialkonzentration der Glucose kann dieser Einfluss reduziert werden (Abbildung 4.61, rechts).

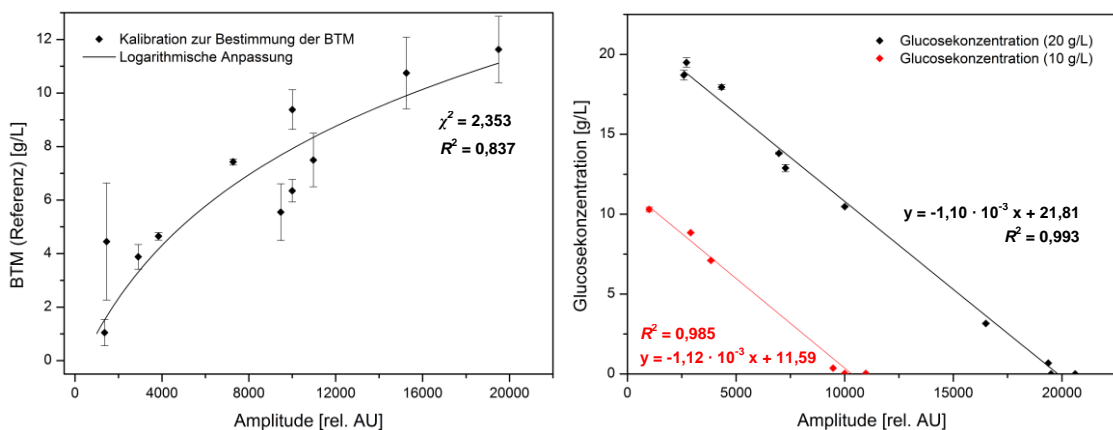


Abbildung 4.61: Kalibrierung zur Bestimmung der BTM von *A. niger* in FM-Medium (links). Verhalten der Glucosekonzentration als Funktion des Sensorsignals (rechts). Die eingesetzte Glucosekonzentration nimmt linear ab.

Aus der Gesamtheit lässt sich folgern, dass durch den vorgestellten Streulichtsensor zwar ein Wachstum zu beobachten ist, eine Kalibrierung aufgrund der Vielzahl an

unterschiedlichen Einflussfaktoren jedoch zu hohen Fehlern führt. Dies ist ebenfalls in den Validierungsergebnissen von *A. niger* zu beobachten (Tabelle 4.16, S. 97).

Um die Genauigkeit der Messung und Kalibration von Pilzkulturen zu erhöhen, wurde für *F. velutipes* eine alternative Methode verwendet, in der die Kalibration mit der BTM indirekt erfolgte. Die Anzahl der Kultivierungen für Kalibration und Validierung entsprachen denen von *A. niger*. Um einer Erhöhung des Messrauschens durch Substratlimitierung vorzubeugen, wurden die Kultivierungen mit einer Initialkonzentration von 26 g/L gestartet. Nach Inokulation der Hauptkultur wurde die Suspension mit einem Ultra-Turrax[®] Stab für 2-3 min homogenisiert. Der Messkolben wurde mit Hilfe des Streulichtensors mit einem kontinuierlichen Messintervall von 7 s überwacht. Zur Entnahme von offline-Proben dienten alle 24 h 1 – 2 Proben mit jeweils 500 µL, um möglichst wenig Flüssigkeit aus dem Messkolben einzubüßen. Als offline-Analyse erfolgte die Bestimmung der Glucoseabnahme. Anschließend wurde der ermittelten Glucosekonzentration das zeitlich passende Amplitudensignal zugewiesen. Wie bereits von *A. niger* bekannt, ist zwischen dem Amplitudensignal und der Glucosekonzentration bis zu einer Konzentration ≥ 1 g/L ein lineares Verhalten zu beobachten (vgl. Abbildung B.16, S. 135).

Unter der Annahme, dass die Umsetzung von Glucose in Biomasse reproduzierbar ist, kann über die Glucosekonzentration im Messkolben die Biomasseindirekt berechnet werden. Für diese Umrechnung wurden parallel zu jeder überwachten Kultivierung ca. 20 Schüttelkolben mit einem definierten Volumen (je 50 mL) unter identischen Bedingungen kultiviert. Innerhalb der Messdauer wurden die Parallelkolben zeitlich versetzt zur Bestimmung der Glucosekonzentration und BTM aus dem Inkubator entnommen. Durch das große Volumen bei der Bestimmung der Biomasse konnten reproduzierbare Messwerte aus den mycelbildende Kulturen erhalten werden. Es ist ein lineares Verhalten zu beobachten (Abbildung 4.62, links). Unter Zuhilfenahme dieser linearen Regression kann die BTM aus der Glucosekonzentration der jeweiligen offline-Proben im Messkolben berechnet werden, ohne die BTM selbst zu messen. Die zuvor erstellten online-/offline-Wertepaare von Sensorsignal und Glucosekonzentration sind somit direkt übertragbar auf die berechnete BTM, solange die Messung innerhalb der Kalibrationsgrenzen liegt (mind. 1 g/L Glucose). Außerhalb des Kalibrationsbereichs ergeben sich wegen des beginnenden Zerfalls der Geflechtstruktur keine reproduzierbaren Daten. In Abbildung 4.62 (rechts) ist die indirekte Kalibration zwischen Sensorsignal und BTM für den reproduzierbaren Messbereich dargestellt.

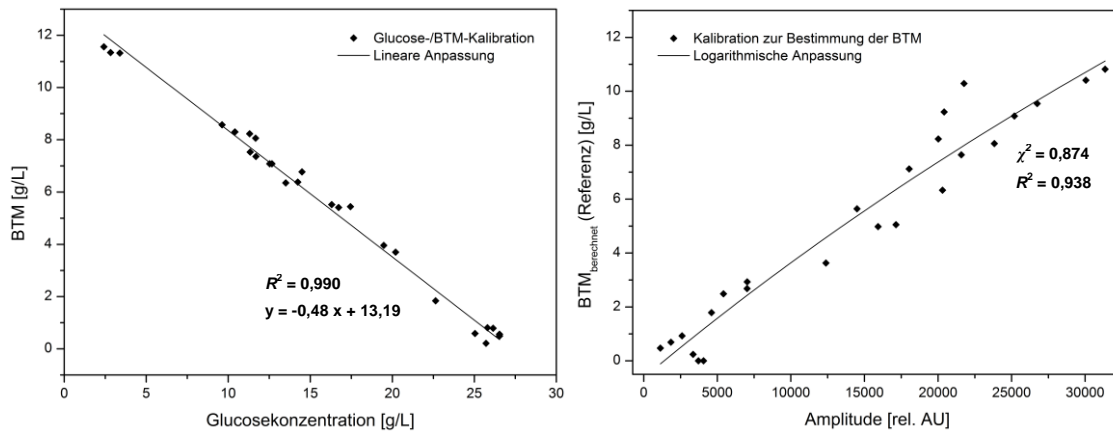


Abbildung 4.62: Kalibration zwischen Glucosekonzentration und BTM für *F. velutipes*. Als Datengrundlage dienen zwei Parallelkultivierungen mit je 20 Schüttelkolben. Zur Bestimmung der BTM wurden je 50 mL verwendet.

Das Verhalten zwischen Sensorsignal und BTM kann bei *F. velutipes* durch eine logarithmische Funktion beschrieben werden (Tabelle C.7, S. 146). Die Regression zeigt mit einem χ^2 -Fehler von 0,874 ein deutlich besseres Ergebnis als bei der direkten Kalibration mit der BTM bei *A. niger*. Bis zu einer Amplitude von 22.000 rel. AU (entspricht einer BTM von ca. 8,2 g/L) sind nur geringe Abweichungen vom logarithmischen Verhalten zu beobachten. Es kann festgehalten werden, dass die Güte der Anpassung mit zunehmender Biomasse innerhalb der Kalibration leicht sinkt. Wird der zeitliche Verlauf des Streulichtsignals betrachtet (Abbildung 4.63, unten), zeigt sich, dass durch die anfängliche Homogenisierung durch einen Ultra-Turrax® und Verwendung hoher Initialkonzentration der Kohlenstoffquelle eine deutlich definierte Wachstumskurve entsteht. Es gilt weiterhin, dass bei Pilzkultivierungen das gemessene Sensorsignal bei konstanter BTM wesentlich geringer ist als bei der Prozessüberwachung von einzelligen MO. Der Grund hierfür liegt vermutlich an der gegenseitigen Abschirmung des erzeugten Streulichts durch unterschiedlich große Mycelkugeln.

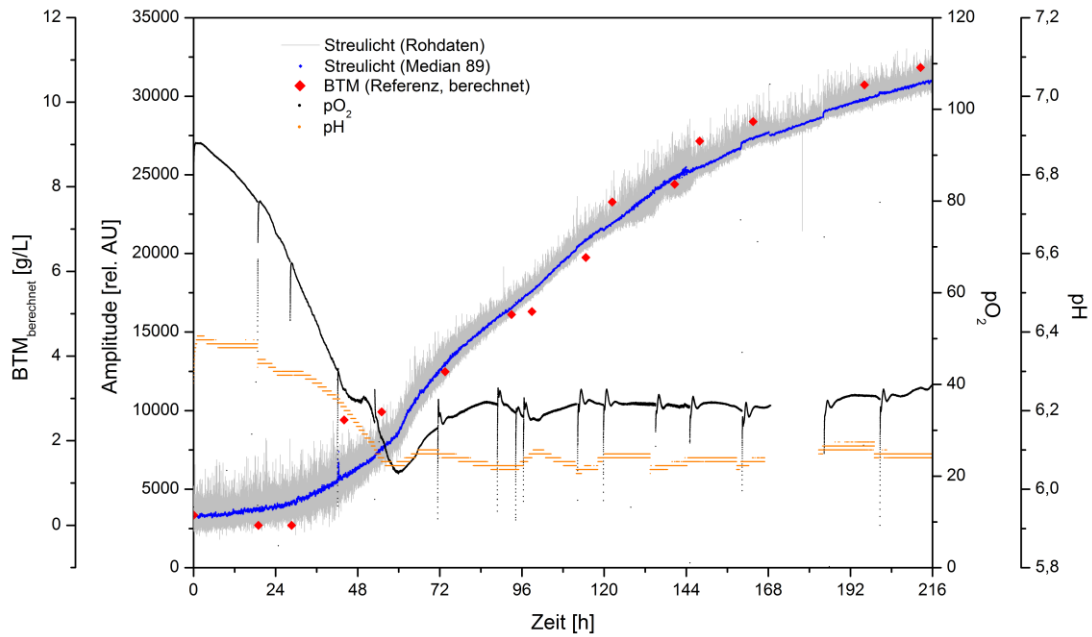


Abbildung 4.63: Prozessüberwachung von *F. velutipes* in SNL-Medium unter Verwendung eines Ultra-Turrax® zur Homogenisierung und Einsatz hoher Initialkonzentration an Glucose. Die BTM wurde aus der Glucoseabnahme berechnet.

Die Validierungen der untersuchten MO ergeben, dass die Kalibration der BTM von suspendierten Pilzkulturen nur mit einer indirekten Berechnung der Biomasse sinnvolle Ergebnisse liefert. Die herkömmliche Möglichkeit zur Bestimmung der online-/offline-Wertepaare ist aufgrund der Heterogenität mit sehr hohen Fehlern behaftet, die zu einem absoluten Fehler von 3,8 g/L führen und somit als nicht reproduzierbar angesehen werden können (Tabelle 4.16). Die Berechnung der BTM aus der Glucosekonzentration zeigt einen RMSEP von 0,8 g/L und eine höhere Präzision (Faktor 4,5), die vergleichbar mit einzelligen MO ist.

Tabelle 4.16: Validierungsergebnisse der Pilzkulturen *F. velutipes* und *A. niger*. Zur Kalibrierungserstellung wurden jeweils zwei Kultivierungen verwendet. Für die Validierung wurde jeweils eine hiervon unabhängige Kultivierung herangezogen.

Spezies	χ^2 BTM	R^2 BTM	RMSEP BTM [g/L]	Mittlerer Fehler BTM [%]
<i>F. velutipes</i>	0,874	0,938	0,84	11,76
<i>A. niger</i>	2,353	0,837	3,80	36,57

Zusammenfassend ergibt sich, dass durch die in dieser Arbeit vorgestellte Multisensorplattform bei Beachtung bestimmter Bedingungen eine kontinuierliche Prozessüberwachung des Zellwachstums auch bei heterogenen Suspensionen, wie z.B. mycelbildenden Pilzen, im Schüttelkolbenmaßstab möglich wird. Die hohe Datendichte des Systems wird benötigt, um das gegenüber einzelligen MO stärker verrauschte

optische Signal digital zu filtern (Medianfilter 89). Für eine definiertere Aufzeichnung des Sensorsignals ist eine kurzzeitige Homogenisierung (Ultra-Turrax[®]) zu Beginn der automatisierten Überwachung ratsam. Weiterhin führt die Vermeidung einer Substratlimitierung während der Messung zu besseren Ergebnissen. Das optische Sensorsignal kann über eine indirekte Kalibration die Biomassezunahme im Messkolben beobachten. Die Daten werden mit geringer Verzögerung (Fensterbreite des Medianfilters) ausgegeben.

4.4.4 Schlussfolgerung zum Applikationsspektrum des Sensors

Die Vorteile eines kurzen Messintervalls und einer hochsensitiven optischen Messmethode führen dazu, dass die Einsatzfähigkeit des in dieser Arbeit vorgestellten Multisensorsystems über normale Anwendungsmöglichkeiten hinaus geht. In unterschiedlichen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Substratwechseleine temporäre Wachstumshemmung entsteht, die durch das Streulichtsignal detektiert werden kann. Weiterhin zeigte die intervallartige Zugabe geringer Substratkonzentrationen, dass selbst die Umsetzung kleinster Mengen eines Nährstoffs im Sensorsignal sichtbar wird. Der entwickelte Prototyp unterstützt seine Vorhersagen durch den Vergleich der Informationen, die durch die drei integrierten Sensoren erhalten werden. Die Anwendung von erstellten Kalibrationen ist i.d.R. unabhängig von der eingesetzten Kohlenstoffquelle. Sobald das Substrat jedoch eine Veränderung der optischen Eigenschaften des Mediums hervorruft, muss eine Anpassung der Funktionsparameter erfolgen.

Der Einsatz von Streulicht im Bereich Pilzkulturen bietet gegenüber der alternativen Analysemethode der gravimetrischen Bestimmung der BTM eine deutliche Verbesserung. Bisher existierte keine Möglichkeit, über optische Methoden die Biomassekonzentration in mycelbildenden Pilzkulturen zu bestimmen. Wird der entwickelten Methode zur Kalibrationserstellung (indirekt über die Glucosekonzentration) gefolgt, kann mit Hilfe des vorgestellten Systems diese Lücke jedoch mit ausreichender Messgenauigkeit gefüllt werden.

4.5 Alternative Methode zur schnellen Kalibrationserstellung

Die Entwicklung von Kalibrationen von biotechnologisch relevanten Basisgrößen zeigte für ausgewählte MO, dass die Einsatzmöglichkeit des Sensormoduls sehr groß ist. Das Wachstum von Bakterien, Hefen und selbst mycelbildenden Pilzen kann mit dem vorgestellten System reproduzierbar überwacht werden. Die Messgenauigkeit ist i.d.R.

mit herkömmlichen Analysemethoden konkurrenzfähig, so dass die Vorteile des Multisensors (Früherkennung von Veränderungen im System durch schnelle Messung und hohe Datendichte) herausstechen.

Trotz dieser Vorteile ist die Anwendbarkeit der Sensortechnologie durch die zur Verfügung gestellten Kalibrationsmodelle limitiert. Zwar kann der Sensor auch ohne Berechnung einer Basisgröße verwendet werden. Hierdurch fällt jedoch die Vergleichbarkeit mit alternativen Methoden weg. Wird dem Protokoll zur Kalibrationserstellung (Abschnitt C5, S. 141f.) gefolgt, sind mehrere Kultivierungen unter Einhaltung gleicher Messbedingungen notwendig. Dieser Prozess ist sehr langwierig, so dass aufgrund der großen Menge an biotechnologisch relevanten MO nicht für jede Spezies eine Kalibration in der Software hinterlegt werden kann.

Im Folgenden wird deshalb eine alternative Kalibrationsmethode vorgestellt, die es dem Anwender des entwickelten Systems in Zukunft erlauben soll, mit weniger Zeitaufwand Kalibrationen für neue MO zu erstellen. Die praktischen Arbeiten wurden nach Vorgabe im Rahmen einer vom Autor betreuten Abschlussarbeit durchgeführt [67]. Durch einen Vergleich dieser und der konventionellen Kalibrationsmethode erfolgt eine Bewertung, ob durch die Änderung der Methodik eine alternative, schnellere Methode zur Verfügung gestellt werden kann.

4.5.1 Kalibration durch sequenzielle Verdünnung

In der konventionellen Kalibrationserstellung werden die online-/offline-Wertepaare parallel zu mindestens drei Kultivierungen des gleichen Typs erhalten. Das neue Kalibrationsprinzip beruht auf der Messung definierter Verdünnungen des betrachteten MO bei konstanter Zelldichte. Hierzu erfolgt zunächst eine Biomassegewinnung, bis genug Zellen für eine Resuspendierung zur Verfügung stehen. Die Zellen werden am Anfang der stationären Phase vom Medium getrennt, um das weitere Wachstum zu verhindern. In diesem Stadium ist die Teilungsfähigkeit der Zellen nahezu erschöpft, da die Nährstoffe im Medium verbraucht sind. Durch Waschvorgänge der Zellpellets und Resuspendierung in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung (Saline) werden Zellfragmente von intakten Zellen getrennt. Zur Schaumreduzierung wurde für die Messungen TEGO[®] AF KS 911 als Additiv hinzugefügt. Die Einstellung definierter Zelldichten erfolgte in o.g. Saline, da so aufgrund fehlender Nährstoffe ein Wachstum unterbunden wird. Weiterhin ist aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, dass Medienkomponenten einen Einfluss auf das Streulichtsignal haben (Abschnitt 4.2.5, S. 61f.). Durch Verwendung von Saline wird dieser Einfluss ausgeschaltet, so dass eine medienunabhängige Kalibration entsteht. Diese spiegelt allein das optische Verhalten der Zellen wider und kann als Datengrundlage für alle Kultivierungen des gleichen Typs verwendet werden. Zum besseren Vergleich mit Kalibrationen aus Abschnitt 4.3.5

(S. 78f.) kann als Verdünnungsmedium ebenfalls das entsprechende Nährmedium verwendet werden (vgl. Abbildung B.17, S. 136). In Abbildung 4.64 ist die Herangehensweise der alternativen Kalibration von MO schematisch dargestellt.

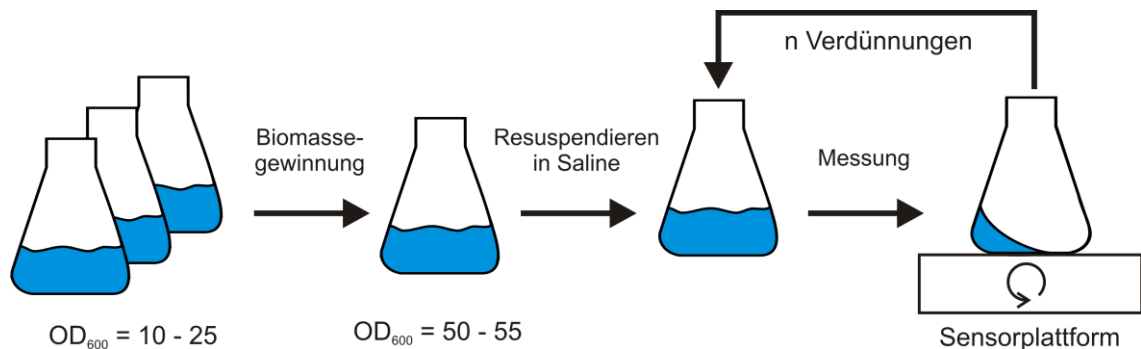


Abbildung 4.64: Schematische Darstellung der Kalibration mittels sequenzieller Verdünnung. Diese Kalibrationsmethode steht für jede Art von MO zur Verfügung.

Pro Verdünnungsschritt wurde der Mittelwert aus 50 Messwerten berechnet. In der Durchführung wurde darauf geachtet, dass die Abweichung hierbei möglichst gering ist. Die neue Kalibrationsmethode wurde an fünf ausgewählten MO durchgeführt, die bereits mit der konventionellen Methode untersucht wurden. Die Kalibrationen wurden unter Einhaltung der Messbedingungen aus Tabelle 4.12 (S. 80) erstellt. Als Referenzgrößen dienten OD_{600} und BTM. In Abbildung 4.65 sind die Ergebnisse der Kalibration durch sequenzielle Verdünnung für die Basisgröße OD_{600} festgehalten.

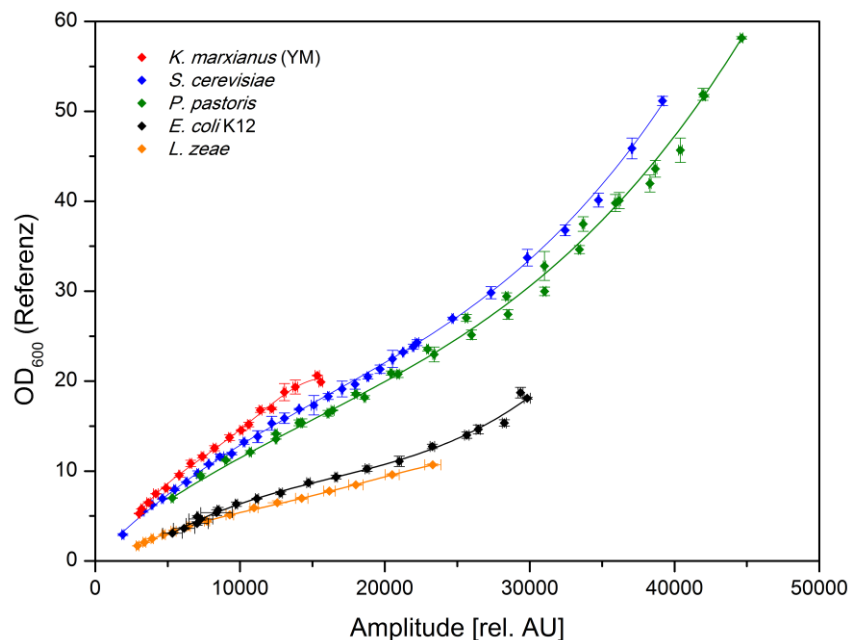


Abbildung 4.65: Kalibration des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße OD_{600} . Die Daten wurden mit Hilfe des Kalibrationsprinzips der sequenziellen Verdünnung erhalten. Als Regression wurden polynomische Funktionen 4. Grades verwendet.

Für den aus der konventionellen Kalibrationsmethode validierten Messbereich sind die in Abschnitt 4.3.5 (S. 78f.) verwendeten Funktionen anwendbar (Bakterien nach BELEHRADEK, Hefen nach BLEASDALE-NELDER). Anhand von Abbildung 4.65 (oben) ist über diesen Messbereich hinaus in allen untersuchten Zellsuspensionen eine Sättigung des Sensorsignals zu beobachten. Die maximale Signalgrenze ist nicht geräteabhängig, sondern spezifisch für jeden MO. Diese unterschiedlichen Signalverhalten können mit einer polynomischen Funktion 4. Grades beschrieben werden.

Es ist zu erkennen, dass ein deutlicher Unterschied zwischen Bakterien und Hefezellen vorliegt. Ohne Beeinflussung von Medienkomponenten kann eine Einteilung in Prokaryoten und Eukaryoten erfolgen. Bei konstanter Zelldichte streuen bakterielle Kulturen das Licht wesentlich stärker. Aufgrund ähnlichen Zellaufbaus sind innerhalb der Gruppenübertragungen der Kalibrationen durch Anwendung eines Korrekturfaktors für einen abgegrenzten Messbereich möglich (Transformation). Die Faktoren wurden mit der Solverfunktion mit *Excel* durch Minimierung der Fehlerquadratsumme über den jeweiligen Messbereich ermittelt. So kann am Beispiel von *L. zeaе* das optische Verhalten von *E. coli* K12 mit einem Korrekturfaktor von 1,18 für den Messbereich 7.500 - 26.500 rel. AU übertragen werden (Abweichung der $OD_{600} = 8,31\%$). Weitere Transformationen sind innerhalb der Hefezellen durchführbar (Tabelle 4.17).

Tabelle 4.17: Übertragbarkeit der Kalibrationen innerhalb einer Gruppe. Die Kalibration des zu transformierenden Signalverhaltens wird mit dem Korrekturfaktor multipliziert. Hierdurch nähern sich die Sensorsignale der MO einander an.

Gruppe	Transformation Richtung	Korrekturfaktor	Messbereich	max. Abweichung
			[rel. AU]	nach Transformation [%]
Bakterien	<i>L. zeaе</i> → <i>E. coli</i> K12	1,18	7.500 – 26.500	8,31
Hefen	<i>K. marxianus</i> → <i>S. cerevisiae</i>	0,88	3.000 – 16.500	7,49
Hefen	<i>P. pastoris</i> → <i>S. cerevisiae</i>	1,10	3.500 – 60.000	4,10

Bei Betrachtung der Kalibration mit Basisgröße BTM ist die Gruppierung der MO schwieriger. Wie in Abbildung 4.66(unten) dargestellt, ist das Sensorsignal von *L. zeaе*, *K. marxianus* und *S. cerevisiae* ähnlich dem der Kalibrationen mit OD_{600} . Die Kalibrationen der Hefen *S. cerevisiae* und *K. marxianus* zeigen auch hier große Ähnlichkeiten zwischen 3.000 – 17.000 rel. AU (Abweichung $\varnothing_{BTM} = 9,86\%$).

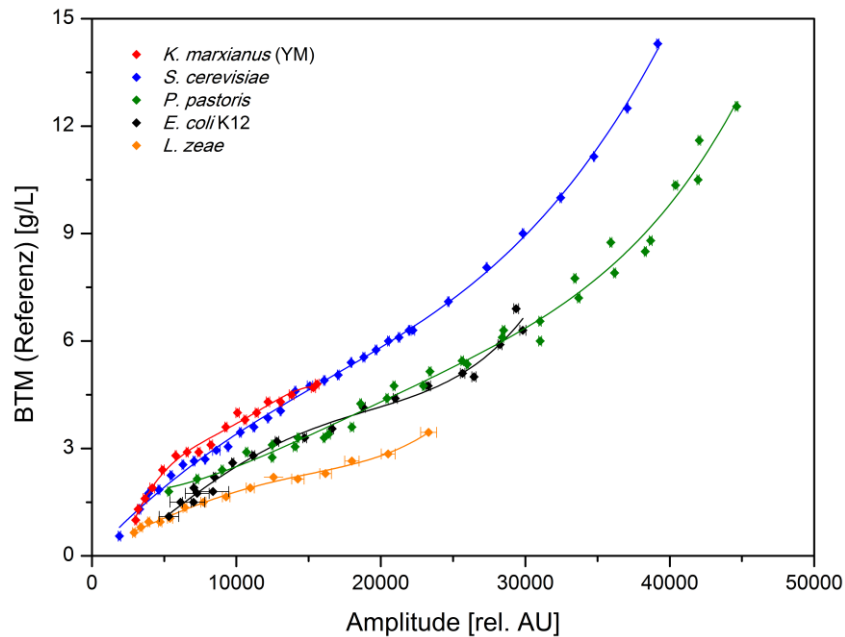


Abbildung 4.66: Kalibration des Streulichtsignals verschiedener MO mit Basisgröße BTM. Die Daten wurden mit Hilfe des Kalibrationsprinzips der sequenziellen Verdünnung erhalten. Als Regression wurden polynomische Funktionen 4. Grades verwendet

Einen Unterschied zu der Kalibration mit Basisgröße OD_{600} macht jedoch das Sensorsignal von *E. coli* K12. Bis zu einem Messwert von 28.400 rel. AU (ca. 6 g/L) sind die Kalibrationen von *P. pastoris* und *E. coli* K12 nahezu gleich. Die Regressionen schneiden sich in drei Punkten und bleiben innerhalb dieses Bereichs maximal 6,4% auseinander (ohne Transformation). Die Ähnlichkeit zwischen beiden Zelltypen ist ausschließlich in der BTM zu beobachten. Wie bereits in vorherigen Abschnitten beschrieben (Abschnitt 3.4.1, S. 15f.), ist die Streulichtintensität von Zellen u.a. abhängig von der Oberflächenreflexion an der Zellwand. *P. pastoris* besitzt aufgrund des größeren Volumens (elliptisch, ca. $4 \mu\text{m}^2$) eine größere Lichtstreuung pro Einheit. Die Ähnlichkeit in der Kalibration der BTM führt zu dem Schluss, dass mehrere Zellen des Typs *E. coli* K12 (stäbchenförmig, ca. $4 \cdot 1 \mu\text{m}^2$) bei vergleichbarer Masse statistisch das gleiche Streulicht produzieren. Die plötzliche Sättigung von *E. coli* K12 nach dem letzten Schnittpunkt ist mit der unterschiedlichen Geometrie der Zellen zu erklären. Bei hoher Zelldichte entstehen Lücken zwischen eng aneinander liegenden Ellipsoiden, durch die Licht in die Suspension eindringen kann. In der Ballung von stäbchenförmigen Zellen entwickeln sich diese Lücken nicht, so dass der Streuvorgang an Zellen innerhalb der Suspension gestört wird. Im Fall einer hohen Zelldichte erfolgt bei kleinen Zellen eine bessere Abschirmung (vgl. Abschnitt 4.2.4, S. 57f.). Mit sequenzieller Verdünnung kann somit unabhängig vom Medium die Bestimmung der absoluten Kalibrationsgrenze speziell für jeden MO erfolgen.

4.5.2 Exkurs: Einfluss von Kultivierungsmedien bei der Erstellung von Kalibrationsmodellen

Im Rahmen der Erstellung von Kalibrationsmodellen durch sequenzielle Verdünnung erfolgte ein Vergleich von *E. coli* K12-Zellen, die in unterschiedlichen Nährmedien kultiviert wurden. Es konnte beobachtet werden, dass Zellen aus einem TB-Medium heraus trotz mehrmaligem Waschvorgang mit Saline (gem. Abschnitt 4.5.1, S. 99f.) vor der Resuspendierung eine bräunliche Verfärbung aufwiesen. Wurden die Zellen in Minimalmedium kultiviert, wurde nach der Abtrennung des Mediums ein farbloses Zellpellet erhalten. Es sollte untersucht werden, ob der hohe Nährstoffgehalt des TB-Mediums die optischen Eigenschaften der Zellen verändert.

Bei Betrachtung der Basisgröße OD_{600} konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Kalibrationen festgestellt werden (Abbildung 4.67, links). Bei gleicher Trübung erzeugen Zellen, kultiviert in Minimalmedium, mehr Streulicht. Es ist zu vermuten, dass die absorptiven Effekte des TB-Mediums (Abschnitt 4.2.5, S. 61f.) durch Zelldiffusion auf die Zellen übertragen wurden. Kalibrationen mit der BTM zeigen hingegen keine Unterschiede (Abbildung 4.67, rechts). Alle online-/offline-Wertepaare können mit derselben Regression beschrieben werden.

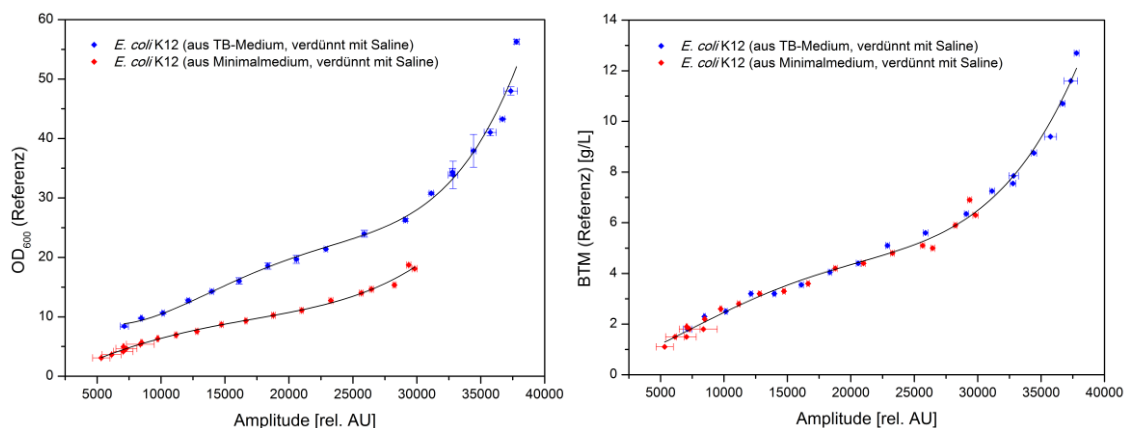


Abbildung 4.67: Vergleich des Sensorsignals mit OD_{600} (links) und BTM (rechts) von *E. coli* K12 aus unterschiedlichen Kultivierungsmedien (polynomische Regressionen, 4. Grades).

Durch diese Gegenüberstellung konnte gezeigt werden, dass die BTM eine höhere Universalität besitzt, da sie im Gegensatz zur Transmission keiner Beeinflussung durch den inneren Zellaufbau unterliegt.

4.5.3 Vergleich zwischen den Kalibrationsmethoden

Der Vergleich zwischen beiden Kalibrationsmethoden (Abschnitt 4.3.2, S. 68f., und Abschnitt 4.5.1, S. 99f.) zeigt, dass durch die Messung gleicher Zelldichten in Saline

stets höhere online-Signale erhalten werden. Durch einfache Parallelverschiebung einer Funktion ist es nicht möglich, beide Kalibrationen ineinander zu überführen. Sowohl bei OD_{600} als auch BTM ist die absolute Abweichung im Bereich geringer Zelldichte am niedrigsten. Nimmt das Sensorsignal zu, driften die Regressionen auseinander. So sind am Beispiel von *L. zea* und *S. cerevisiae* nahe dem Grundsignal (2.500 rel. AU) Abweichungen von 0,03 - 0,06 OD_{600} -Einheiten zu beobachten. Die Verdopplung des Sensorsignals führt zu einer absoluten Abweichung von ca. 1,0 - 1,1 OD_{600} -Einheiten. Bei sehr hohen Zelldichten kreuzen sich die Regressionen bei OD_{600} , da bei der konventionellen Kalibrationsmethode am Ende jeder Kultivierung weitere Streuzentren (durch Zellfragmente) entstehen, die zum Streulicht der intakten Zellen addiert werden. Im Fall der BTM sind im betrachteten Messbereich keine weiteren Überschneidungen festzustellen. Die Ursache liegt in der Vorgehensweise zur Bestimmung der offline-BTM (Abschnitt 3.1.1, S. 4f.), da hier ebenfalls Zelltrümmer von intakten Zellen getrennt werden.

Es gibt eine Reihe von möglichen Einflussfaktoren, die zu den Unterschieden in den Kalibrationsmethoden führen können. Aus Abschnitt 4.2.5 (S. 103f.) ist bekannt, dass die Wahl des Mediums das Streulichtsignal entscheidend verändert. Farbverändernde Stoffe (z.B. Hefeextrakt, Trypton) reduzieren die Gesamtmenge an gestreutem Licht durch Absorption bestimmter Wellenlängen. Weiterhin kann durch hohe Gelöststoffkonzentration das Brechungsverhalten der Suspension variieren. Wird als Verdünnungsmedium beispielsweise das Nährmedium der Zellen verwendet, ist zwischen den beiden Kalibrationsmethoden eine größere Ähnlichkeit zu beobachten (*E. coli* K12; vgl. Abbildung B.17, S. 136). Hierdurch werden wie bei einem fed-batch-Betrieb neue Nährstoffe für die Zellen zur Verfügung gestellt, wodurch die Zellproliferation erneut angeregt wird, wenn keine hemmenden Zusatzstoffe (Bakterien → Bakteriostatika, Hefezellen → Fungistatika) hinzugefügt werden. Weiterhin ist bekannt, dass einige Zellen während des batch-Prozesses ihre Zellmorphologie verändern (*P. pastoris*, Abschnitt 4.3.5, S. 78f.). Werden am Beispiel von *P. pastoris* beide Kalibrationsmethoden miteinander verglichen, lässt sich feststellen, dass durch die sequenzielle Verdünnung (mit Zellen aus früher stationärer Phase) tendenziell das Verhalten „gealterter“ Zellen widerspiegelt wird [67]. Die letzten online-/offline-Wertepaare der konventionellen Methode sind mit dem Sensorsignal des neuen Kalibrationsprinzips deckungsgleich (Abbildung 4.68, unten). Wird die sequenzielle Verdünnung mit „frischen“ Zellen aus der exponentiellen Phase durchgeführt, wird diese Hypothese noch weiter bekräftigt. In diesem speziellen Fall besteht eine größere Ähnlichkeit mit der konventionellen Kalibration im Bereich des exponentiellen Wachstums.

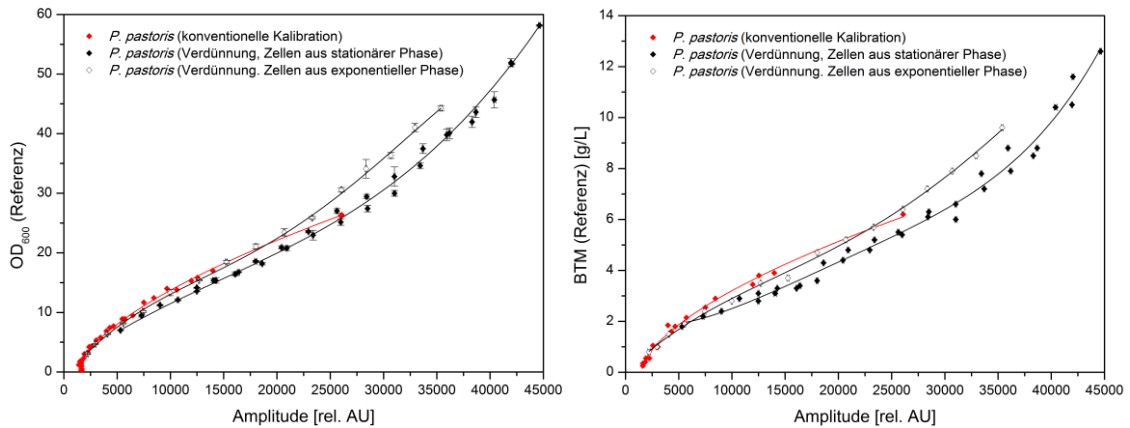


Abbildung 4.68: Gegenüberstellung und Vergleich unterschiedlicher Kalibrationsmethoden am Beispiel von *P. pastoris*. Links: Kalibration mit OD_{600} . Rechts: Kalibration mit BTM.

4.5.4 Schlussfolgerung zu alternativen Kalibrationsmethoden

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen konnten wichtige Informationen für eine zukünftige vereinfachte Form der Kalibrationserstellung mit Kultivierungsbasisgrößen erhalten werden. Bisher führt der Einsatz des konventionellen Kalibrationsprinzips unter Verwendung von Antischaummittel zu den besten Ergebnissen. Kalibrationen durch sequenzielle Verdünnung zeigen eine reduzierte Vorhersagegenauigkeit und sind mit der konventionellen Methode aus Abschnitt 4.3.2 (S. 68f.) nicht konkurrenzfähig. Eine Verschiebung um einen konstanten Faktor erwies sich als nicht ausreichend. Dennoch können Kalibrationen mit manuell verdünnten Suspensionen von Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen dazu dienen, die Funktionsparameter der jeweiligen Kalibrationsgleichungen aus Abschnitt C6.4 (S. 145) anzupassen.

Die Anfangswerte einer Kalibration sind unabhängig von Zellart und verwendeter Methode. Das tatsächliche Verhalten zwischen Sensorsignal und Basisgröße während eines Kultivierungsvorgangs ist bestimmt durch die Zellmorphologie zum Zeitpunkt der Messung. Sequenziell verdünnte Zellen aus der exponentiellen Phase entsprechen somit näherungsweise dem Verhalten während des exponentiellen Wachstums. Zellen aus der frühen stationären Phase zeigen hingegen ein Verhalten, dass dem Kultivierungsende entspricht. Werden durch das hier vorgestellte Prinzip mit Zellen aus den zwei o.g. Wachstumsstadien durchgeführt, entsteht ein Kalibrationsbereich, der das tatsächliche Signalverhalten bezogen auf die jeweilige Basisgröße eingrenzt. Eine Hinterlegung dieser Datensätze für die jeweiligen MO erweist sich als sinnvoll. Wird auf dieser Grundlage eine 2- bzw. 3-Punkt-Kalibration nach der konventionellen Methode durchgeführt, können die Funktionsparameter der Kalibrationsgleichungen angeglichen werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, dass die ursprüngliche Kalibrationsmethode durch die weniger aufwändige sequenzielle Verdünnung abgelöst wird.

5 Zusammenfassung

Die Reihe an experimentellen Arbeiten zeigte, dass über die Detektion von Streulicht in geschüttelten Kulturen reproduzierbar die Biomassekonzentration von Suspensionen verfolgt werden kann. Bei dem entwickelten Prototyp handelt es sich um ein präzises Analysesystem, das einen deutlichen Vorteil gegenüber alternativer offline-Analytik bietet. Bisher erforderte die Überwachung der Biomassekonzentration in Schüttelkolben einen Eingriff ins System. Optische Analysemethoden existieren für dieses Arbeitsvolumen bisher hauptsächlich für Gelöstsauerstoff und pH-Wert bei Verwendung spezieller Schüttelkolben mit Sensorspots, auf die ein Fluoreszenzfarbstoff immobilisiert ist.

Durch die Integration und optimierte Positionierung des Streulichtensors in die vorhandene Multisensorplattform wurde festgestellt, dass eine quasi-simultane Messung aller drei Prozessgrößen (pO_2 , pH und Biomassekonzentration) für Schüttelkolben realisiert werden kann. Die Datenmenge aller Sensoren kann in Kombination dazu genutzt werden, den Bioprozess im Schüttelkolben besser zu verstehen.

Das erweiterte Multisensorsystem verfügt über eine Messstation und ist in der Lage alle drei Sensoren nacheinander mit einem zeitlichen Abstand von ca. 1 s und einem Messintervall von bis zu 7 s kontinuierlich zu überwachen. Innerhalb von 24 h entstehen über 12.000 Messwerte pro Sensoreinheit. Der Streulichtsensor kann diese hohe Datendichte für eine sehr genaue Darstellung des Zellwachstums ausnutzen.

Zahlreiche Untersuchungen zu Messwertbildung und beeinflussenden Faktoren zeigten, dass eine kontinuierliche Messung mit einem konstanten Messintervall im geschüttelten System mit einem großen Messrauschen verbunden ist. Da der Streulichtsensor eine Momentaufnahme der Anzahl aller Streuzentren im Detektionsbereich darstellt (innerhalb einer Messzeit von 80 ms), führt eine stark schwankende Messzone über den Sensorkomponenten zu einem großen Messrauschen. Rotierende Suspensionen werden in ihrer Form von äußeren Bedingungen beeinflusst. Sie bilden eine Sichelform aus, die abhängig von den Messparametern ist. Die Auslenkung des Tischschüttlers, die Größe und Beschaffenheit eines Schüttelkolbens sowie das Volumen der zu untersuchenden Suspension haben in ihrer Gesamtheit Auswirkungen auf die schwankende Flüssigkeitshöhe. Oszilloskopmessungen und Beobachtungen der Fluidbewegung durch Highspeed-Videoaufnahmen lassen zu dem Schluss, dass nicht die Form der Flüssigkeit für ein robustes Messprinzip entscheidend ist, sondern eine konstante Messzone über dem Sensor während der Messung. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Flüssigkeit im Kolben sowie mit Verringerung der Schüttelfrequenz das Messrauschen reduziert werden kann. Diese Maßnahmen führen dazu, dass die schwankende Messzone über

dem Streulichtsensor weniger stark ausgebildet ist. Da im Bioprozess Veränderungen von Kultivierungsparametern nicht sinnvoll sind, weil sie einen direkten Einfluss auf die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen besitzen, musste der Messzyklus auf die jeweiligen Bedingungen angepasst werden.

Das Messrauschen kann minimiert werden, wenn die Messauslösung zum Zeitpunkt höchster Flüssigkeit über dem Sensor erfolgt. Die schwankende Messzone und das damit verbundene Messrauschen des Sensorsignals konnte durch eine Messzeitregulierung kompensiert werden. Hierdurch konnten selbst unter extremen Messbedingungen (Schüttelfrequenzen bis zu 300 rpm und reduziertes Füllvolumen bis zu 10%) reproduzierbare Messwerte im kontinuierlichen Schüttelbetrieb erreicht werden. Die Anpassung des Messzyklus erfolgte mit einem piezoelektronischen Beschleunigungssensor, der ebenfalls in den Prototypen integriert wurde. Durch die hierdurch zugänglichen Informationen über die exakte Rotationsgeschwindigkeit der Flüssigkeit, ist eine Verlängerung des Messintervalls durch eine offset-Funktion in der Software möglich. Die Fluidbewegung im Kolben kann mit der Sensorauslösung synchronisiert werden. Zwischen Drehzahl und Auslöseverzögerung besteht ein lineares Verhalten. Selbst bei höher viskosen Flüssigkeiten bleibt die Radialgeschwindigkeit konstant. Die Güte der Anpassungsfunktionen steigt mit zunehmendem Füllvolumen. Durch den optimierten Messzyklus wurde bei konstanten Suspensionen eine Reduzierung des Messrauschens um bis zu 50% erreicht.

Die Ausrichtung der Sensorkomponenten im 180°-Setup ermöglicht die Detektion hochdichter Zellsuspensionen. Aufgrund der vorstehenden Orientierung ist die Effektivität von Streulichtmessungen im Bereich geringer Trübung jedoch eingeschränkt. Für Streulichtmessungen ist eine Mindestanzahl an Partikeln in der Messzone zum Zeitpunkt der Messung notwendig ist. Ab einer $OD_{600} > 0,8$ ist Streulicht messbar (Beispiel: Formazin). Dieses Signal wird bis zu einem definierten Grenzwert durch einen zweiten physikalischen Vorgang überlagert (Reflexion an der Phasengrenze). Es ist nicht möglich, eine allgemeingültige Aussage über ein exaktes Sensorsignal zu machen, ab dem die Grenzfläche keinen Einfluss auf das optische Signal mehr besitzt. Hierfür ist die Kenntnis der genauen Eindringtiefe des Lichts notwendig. Sie ergibt sich aus dem Trübungsgrad und der Art und Beschaffenheit der betrachteten Partikel bzw. Zellen. Es zeigte sich, dass stark streuende Suspensionen eine geringe Eindringtiefe besitzen.

Gelöste Medienbestandteile können ebenfalls das optische Verhalten der Suspension beeinflussen. Durch die optimierte Position des Streulichtsensors relativ zum Schüttelkolben ist eine bestimmte Winkelbreite festgelegt, die abhängig vom Raumwinkel der LED und der Entfernung der Sensorkomponenten zueinander ist. Große Mengen an Hefeextrakt und bereits geringe Mengen Glycerol bewirken eine deutliche Veränderung des optischen Verhaltens (Veränderung des Brechungsindex), das Einfluss auf die Kalibrationsbildung mit Kultivierungsbasisgrößen haben kann.

Mit dem optimierten Messzyklus kann das Multisensorsystem eine kontinuierliche, automatisierte Prozessüberwachung von Bakterien und Hefen realisieren. Erstmals konnte zudem eine nicht-invasive Prozessüberwachung der Biomassekonzentration mycelbildender Pilze für den Schüttelkolbenmaßstab erreicht werden. Für alle MO können mit Hilfe der schnellen Messmethode und hohen Datendichte nach Verwendung eines digitalen Rückwärtsfilters (Median) geglättete Amplitudensignale erhalten werden. Die Ausgabe der real-time Messdaten erfolgt so mit einer zeitlichen Verzögerung, die der Fensterbreite des Filterprozesses entspricht. Es besteht eine Proportionalität zwischen Sensorsignal und Zellwachstum. Streulicht besitzt die Möglichkeit, in bekannte Basisgrößen (OD_{600} , BTM, ZZ) durch Kalibration umgewandelt zu werden. Die Anpassungsfunktionen sind abhängig von der Zellmorphologie. Eine Veränderung der Zellgröße während einer Kultivierung erschwert hierbei die Kalibrationsbildung. Welche Funktion für die Kalibrationserstellung verwendet wird, ergibt sich aus der Kategorie, in die die MO eingeteilt wurden. Erst wenn die Grenzflächenreflexion keinen Einfluss auf das Sensorsignal mehr besitzt, sind präzise Kalibrationen möglich. Dieser Wert muss individuell für jede Kultivierung bestimmt werden.

Bei Kultivierungen unterschiedlicher MO zeigte sich, dass die Ausbildung submersen Schaums problematisch ist. Der Sensor ist nicht in der Lage, zwischen Schaumreflexionen und Streulicht zu unterscheiden. Beide Effekte addieren sich zu einem gemeinsamen Messwert. Im Bereich der Kalibrationserstellung führt dies zu weiteren Schwierigkeiten. Der während der Flüssigkeitsrotation gebildete Schaum zerfällt ungleichmäßig, wodurch das Sensorsignal bei der Probennahme nicht reproduzierbar sinkt. Validierungsergebnisse zeigen für den kalibrierten Messbereich einen durchschnittlichen relativen Fehler von 17,25%, bezogen auf die alternative offline-Analytik.

Die Verwendung eines Antischaummittels führt zu einer deutlichen Verbesserung der Präzision von Kalibrationen, da der unbekannte Anteil an Reflexionsflächen im geschüttelten System wegfällt. Das Amplitudensignal wird um bis zu 50% bei gleichbleibender Trübung verringert. Bei Verwendung von Antischaummittel wird ein durchschnittlicher mittlerer Fehler von 8,76% erreicht, wodurch das hier vorgestellte Multisensorsystem zur Überwachung der Biomassekonzentration in direkter Konkurrenz zur alternativen offline-Analytik steht.

Die hohe Sensitivität und Messempfindlichkeit dieses optischen Sensors führt dazu, dass durch den Prototyp zusätzlich die Möglichkeit besteht, selbst geringe Veränderungen im Wachstum zu beobachten. Dies konnte in Kultivierungen mit zwei Kohlenstoffquellen verifiziert werden. Zudem kann durch die kontinuierliche Messung und augenblickliche Datenausgabe mit einer gezielten Substratzugabe die Zelldichte erhöht werden.

6 Ausblick

Im Rahmen der vorgestellten Arbeiten konnte die quasi-simultane Messung mehrerer Kultivierungsparameter speziell für Schüttelkolbenkulturen realisiert werden. Ein Übertragung der vorgestellten Streulichtsensorik auf andere Reaktortypen (z.B. wave reactor) ist denkbar, um das Applikationsspektrum zu erweitern. Für eine Serienfertigung der Multisensorplattform müssen die entwickelten Algorithmen für den G-Sensor und die Kalibrationen der untersuchten MO in der Software integriert sein. Weiterhin ist das Applikationsspektrum auf den Bereich der Zellkultur und der Kultivierung von Mikroalgen zu erweitern. Erste Vorversuche zeigten hier großes Potential. Für den Bereich Mikroalgen muss zuvor der Austausch der LED verfügbar gemacht werden. Beide Zellarten sind für geringe Zellkonzentrationen in Kultivierungen bekannt, so dass Grenzflächenreaktionen hier zu großen Problemen führen könnten. Eine Modifizierung der Kolben, die den Grenzflächeneinfluss eliminiert, ist sinnvoll. Aus Abbildung 4.33 (S. 56) ist bekannt, dass matte Kunststoffblenden einen derartigen Effekt hervorrufen können. Allgemein gilt, dass die Kalibrationsmethode optimiert werden muss, um dem potentiellen Endverbraucher ein möglichst einfaches Verfahren zu bieten. Erste Ansätze wurden in Abschnitt 4.5 (S. 98f.) vorgestellt. Die Schwierigkeit hierbei lag in der Anpassung der Funktionsparameter, da eine Parallelverschiebung zu keinem positiven Ergebnis führte. Für eine automatisierte Berechnung der Kalibrationen muss ein Algorithmus entwickelt werden, der auf der Grundlage der großen Datenmenge eine Anpassung erstellen kann. Mit der optimierten Sensorik wird die Reaktionsfähigkeit auf Veränderungen eines prognostizierten Wachstumsverlaufs deutlich erhöht. Die logische Konsequenz hieraus ist, die große Datenmenge an Informationen für eine Prozesskontrolle zu nutzen. Hierzu müssen die Daten chemometrisch aufgearbeitet sein und für Schüttelkolben ein steuerbares Dosagemodul entwickelt werden, das z.B. einen fed-batch auf der Grundlage berechneter Wachstumsraten steuern kann.

7 Literatur

- [1] HARMS, P.; KOSTOV, Y.; RAO, G. (2002). Bioprocess Monitoring. In: *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2) S. 124-127.
- [2] FDA (2004). Guidance for Industry. PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance.
- [3] READ, E. K.; PARK, J. T.; SHAH, R. B.; RILEY, B. S.; BRORSON, K. A.; RATHORE, A. S. (2010). Process Analytical Technology (PAT) for Biopharmaceutical Products - Part I. Concepts and Applications. In: *Biotechnology & Bioengineering*, 105(2), S. 276-284.
- [4] READ, E. K.; SHAH, R. B.; RILEY, B. S.; PARK, J. T.; BRORSON, K. A.; RATHORE, A. S. (2010). Process Analytical Technology (PAT) for Biopharmaceutical Products - Part II. Concepts and Applications. In: *Biotechnology & Bioengineering*, 105(2), S. 285-295.
- [5] REHBOCK, C.; BEUTEL, S.; BRÜCKERHOFF, T.; HITZMANN, B.; RIECHERS, D.; RUDOLPH, G.; STAHL, F.; SCHEPER, T.; FRIEHS, K. (2008). Bioprozessanalytik. In: *Chemie Ingenieur Technik*, 80(3), S. 267-286.
- [6] BITTNER, C.; WEHNERT, G.; SCHEPER, T. (1998). In-Situ Microscopy for On-Line Determination of Biomass. In: *Biotechnology & Bioengineering*, 60(1), S. 24-35.
- [7] KIVIHARJU, K.; SALONEN, K.; MOILANEN, U.; MESKANEN, E.; LEISOLA, M.; EERIKÄINEN, T. (2007). On-Line Biomass Measurements in Bioreactor Cultivations: Comparison Study of Two On-Line Probes. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(8), S. 561-566.
- [8] HARRIS, C. M.; KELL, D. B. (1985). The Estimation of Microbial Biomass. In: *Biosensors*, 1(1), S. 17-84.
- [9] KONSTANTINOV, K.; CHUPPA, S.; SAJAN, E.; TSAI, Y.; YOON, S.; GOLINI, F. (1994). Real-Time Biomass-Concentration Monitoring in Animal-Cell Cultures. In: *Trends in Biotechnology*, 12(8), S. 324-33.
- [10] SONNLEITNER, B.; LOCHER, G.; FIECHTER, A. (1992). Biomass Determination. In: *High-Tech Analyses in Modern Biotechnology*, 25(1-2), S. 5-22.
- [11] SINGH, A.; KUHAD, R. C.; SAHAI, V.; GHOSH, P. (1994). Evaluation of Biomass. In: *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 51, S. 47-70.
- [12] POWELL, E. O. (1963). Photometric Methods in Bacteriology. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14(1), S. 1-8.
- [13] FRY, J. C. (1990). Direct Methods and Biomass Estimation. In: R. Grigorova and J. R. Norris (Hrsg.): *Methods in Microbiology: Techniques in Microbial Ecology*.

- [14] HERBERT, R. A. (1990). Methods for Enumerating Microorganisms and Determining Biomass in Natural Environments. In: R. Grigorova and J. R. Norris (Hrsg.): *Methods in Microbiology: Techniques in Microbial Ecology*.
- [15] AROBAS (2006). Die neue Generation des Partikelcounters. Arobas Business Solution.
http://www.arobas-bs.com/fileadmin/technologie/Korngr%C3%B6%C3%9Fe_Kg.pdf; 02.04.2013.
- [16] FUCHS, G.; SCHLEGEL, H. G. (2006). Allgemeine Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart, 8. Auflage, S. 169-170.
- [17] BLUMA, A.; HÖPFNER, T.; LINDNER, P.; REHBOCK, C.; BEUTEL, S.; RIECHERS, D.; HITZMANN, B.; SCHEPER, T. (2010). In-Situ Imaging Sensors for Bioprocess Monitoring: State of the Art. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, S. 2429–2438.
- [18] PONS, M. N.; VIVIER, H.; RÉMY, J. F.; DODDS, J. A. (1993). Morphological characterization of Yeast by Image Analysis. In: *Biotechnology & Bioengineering*, 42(11), S. 1352–1359.
- [19] VICENTE, A.; MEINDERS, J. M.; TEIXEIRA, J. A. (1996). Sizing and Counting of *Saccharomyces cerevisiae* Floc Populations by Image Analysis, Using an Automatically Calculated Threshold. In: *Biotechnology & Bioengineering*, 51(6), S. 673-680.
- [20] MADRID, R. E.; FELICE, C. J. (2005). Microbial Biomass Estimation. In: *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), S. 97-112.
- [21] PREDIGER, A.; BLUMA, A.; HÖPFNER, T.; LINDNER, P.; BEUTEL, S.; MÜLLER, J.; HILTERHAUS, L.; LIESE, A.; SCHEPER, T. (2011). In-Situ Microscopy for Online Monitoring of Enzymatic Processes. In: *Chemical Engineering & Technology*, 34(5), S. 837-840.
- [22] MEIRELES, L. A.; AZEVEDO, J. L.; CUNHA, J. P.; MALCATA, F. X. (2002). On-Line Determination of Biomass in a Microalga Bioreactor Using a Novel Computerized Flow Injection Analysis System. In: *Biotechnology Progress*, 18(6), S. 1387-1391.
- [23] WTW (2003). Bestimmung der Trübung. WTW GmbH.
http://old.omnilab.de/hpb/export/1/TURB_D.PDF; 11.03.2013.
- [24] RUDOLPH, G. (2007). Entwicklung und Einsatz inline-mikroskopischer Verfahren zur Beobachtung biotechnologischer Prozesse, Dissertation. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie.
- [25] MAROSE, S.; LINDEMANN, C.; ULBER, R.; SCHEPER, T. (1999). Optical Sensor Systems for Bioprocess Monitoring. In: *Trends in Biotechnology*, 17(1), S. 30-34.
- [26] ULBER, R.; FRERICHS, J.-G.; BEUTEL, S. (2003). Optical Sensor Systems for Bioprocess Monitoring. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(3), S. 342-348.

- [27] CLARKE, D. J.; BLAKE-COLEMAN, B. C.; CARR, R. J. G.; CALDER, M. R.; ATKINSON, T. (1986). Monitoring Reactor Biomass. In: *Trends in Biotechnology*, 4(7), S. 173-178.
- [28] ZABRISKIE, D. W.; HUMPHREY, A. E. (1978). Estimation of Fermentation Biomass Concentration by Measuring Culture Fluorescence. In: *Applied and environmental microbiology*, 35(2), S. 337-343.
- [29] BEUTEL, S.; HENKEL, S. (2011). In-Situ Sensor Techniques in Modern Bioprocess Monitoring. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), S. 1493-1505.
- [30] MAROSE, S.; LINDEMANN, C.; SCHEPER, T. (1998). Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring. In: *Biotechnology Progress*, 14(1), S. 63-74.
- [31] KIVIHARJU, K.; SALONEN, K.; MOILANEN, U.; EERIKÄINEN, T. (2008). Biomass Measurement Online: The Performance of In Situ Measurements and Software Sensors. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(7), S. 657-665.
- [32] KONDEPATI, V. R. (2008). The Potential of Mid- and Near-Infrared Spectroscopy.
- [33] FRERICHS, J.-G.; JOERIS, K.; KONSTANTINOV, K.; SCHEPER, T. (2002). Einsatz eines In-situ-Mikroskops zur Online-Beobachtung von Tierzellkultivierungen. In: *Chemie Ingenieur Technik*, 74(11) S. 1629-1633.
- [34] ANTON, F.; BURZLAFF, A.; KASPER, C.; BRÜCKERHOFF, T.; SCHEPER, T. (2007). Preliminary Study towards the Use of In-situ Microscopy for the Online Analysis of Microcarrier Cultivations. In: *Engineering in Life Sciences*, 7(1), S. 91-96.
- [35] RUDOLPH, G.; LINDNER, P.; GIERSE, A.; BLUMA, A.; MARTINEZ, G.; HITZMANN, B.; SCHEPER, T. (2008). Online Monitoring of Microcarrier Based Fibroblast Cultivations with In Situ Microscopy. In: *Biotechnology & Bioengineering*, 99(1), S. 136-145.
- [36] REHBOCK, C.; RIECHERS, D.; HÖPFNER, T.; BLUMA, A.; LINDNER, P.; HITZMANN, B.; BEUTEL, S.; SCHEPER, T. (2010). Development of a Flow-Through Microscopic Multitest System for Parallel Monitoring of Cell Samples in Biotechnological Cultivation Processes. In: *Journal of Biotechnology*, 150(1), S. 87-93.
- [37] ANTRANIKIAN, G.; FRIEHS, K.; HITZMANN, B.; SCHEPER, T. (2006). Prozessanalytik. *Angewandte Mikrobiologie*.
- [38] SCHMIDT-HAGER, J. (2009): Online-Monitoring der optischen Dichte an Schüttelkolbenkulturen, Diplomarbeit. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie.
- [39] JUNG Y. H.; LEE J. D.; CHANG Y. K. (1999). Development of a New Device for On-Line Measurement of High Cell Concentrations. In: *Biotechnology Techniques*, 13(7) S. 459-462.

- [40] YANO, T.; OKANO, K.; MASDUKI, A.; NISHIZAWA, Y. (1993). Measurement of Cell Density in Cultures of Aggregative Organisms by Continuous-Dilution-Photometric-Assay. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(2), S. 123-127.
- [41] GONZALES, C. (2011). BugLab LLc. http://www.buglab.com/docs/BugLab_ODScannerSpecSheet.pdf, 11.03.2013.
- [42] OPTEK-DANULAT GMBH (2013). Top Five Biotech Applications. <http://www.optek.com/pdf/top5/optek-brochure-TOP5-Biotech-US.pdf>, 11.03.2013.
- [43] WEDGEWOOD ANALYTICAL (2011). Application Note. <http://www.analysis-oem.com/ProductDetail.asp?ID=102>, 11.03.2013.
- [44] AQUASANT MESSTECHNIK AG (2013). Application Note. <http://www.aquasant-mt.com/Truebungsmesstechnik.62.0.html?&L=1%2Bclass%253DI>, 11.03.2013.
- [45] METTLER-TOLEDO GMBH (2013). Application Note. Gießen, Deutschland. http://de.mt.com/de/de/home/products/ProcessAnalytics/Turbidity_2011/Turbidity-High.html, 11.03.2013.
- [46] BÜCHS, J.; MAIER, U.; LOTTER, S.; PETER, C. P. (2007). Calculating Liquid Distribution in Shake Flasks on Rotary Shakers at Waterlike Viscosities. In: *Biochemical Engineering Journal*, 34(3), S. 200-208.
- [47] BÜCHS, J. (2001). Introduction to Advantages and Problems of Shaken Cultures. In: *Biochemical engineering journal*, 7(2), S. 91-98.
- [48] HWANG, Y. B.; LEE, G. B.; CHANG, H. N.; LEE, J. T. (1988). Simple Digital Control of Cell Mass in Turbidostat. In: *Biotechnology Techniques*, 2(1), S. 7-10.
- [49] PARK, B. G.; LEE, W. G.; CHANG, Y. K.; CHANG, H. N. (1999). Long-Term Operation of Continuous High Cell Density Culture of *Saccharomyces cerevisiae* with Membrane Filtration and On-Line Cell Concentration Monitoring. In: *Bioprocess Engineering*, 21(2), S. 97-100.
- [50] VASALA, A.; PANULA, J.; BOLLOK, M.; ILLMANN, L.; HALSIG, C.; NEUBAUER, P. (2006). A New Wireless System for Decentralised Measurement of Physiological Parameters from Shake Flasks. In: *Microbial Cell Factories*, 5, S. 8.
- [51] ATKINS, P. W. (2001): *Physikalische Chemie*. Wiley-VCH. Weinheim, 3. Auflage, S. 755-758.
- [52] MIE, G. (1908): Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metalllösungen. In: *Annalen der Physik*, 330(3), S. 377-445.
- [53] BRUNSTING, A.; MULLANEY, P. F. (1974): Differential Light Scattering from Spherical Mammalian Cells. In: *Biophysical journal*, 14(6), S. 439-453.
- [54] DREZEK R; DUNN A; RICHARDS-KORTUM R. (1999): Light Scattering from Cells: Finite-Difference Time-Domain Simulations and Goniometric Measurements. In: *Applied Opt*, 38(16), S. 3651-3661.

- [55] MOURANT, J. R.; CANPOLAT, M.; BROCKER, C.; ESPONDA-RAMOS, O.; JOHNSON, T. M.; MATANOCK, A.; STETTER, K.; FREYER, J. P. (2000). Light Scattering from Cells: The Contribution of the Nucleus and the Effects of Proliferative Status. In: *Journal of Biomedical Optics*, 5(2), S. 131-137.
- [56] WATSON, D.; HAGEN, N.; DIVER, J.; MARCHAND, P.; CHACHISVILIS, M. (2004). Elastic Light Scattering from Single Cells - Oriental Dynamics in Optical Trap.
- [57] MEYER, R. A. (1979). Light Scattering from Biological Cells: Dependence of Backscatter Radiation on Membrane Thickness and Refractive Index. *Applied Opt.*, 18, S. 585-590.
- [58] DUNN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. (1996). Three-Dimensional Computation of Light Scattering from Cells. In: Selected Topics in Quantum Electronics, *IEEE Journal*, 2(4), S. 898-905.
- [59] NICHIA (2010). Specification for Nichia Red Led Model: NSPR310S. Nichia Corporation. <http://www.leds.de/out/media/NSPR310S-E.pdf>, 11.03.2013.
- [60] CALFLEX C FILTER (2013). Datasheet.
- [61] OG590 FILTER (2013). Datasheet.
- [62] PRESENS GMBH (2010). SFS Shake Flasks with Integrated Sensors. http://www.presens.de/fileadmin/user_upload/downloads/manuals/IM_SFS_dv2.pdf, 11.03.2013.
- [63] VTI TECHNOLOGIES (2010): Application Note - G-Sensor CMA3000-D01
- [64] SCHÜGERL, K. (1997). Bioreaktionstechnik. Bioprozesse mit Mikroorganismen und Zellen: Prozessüberwachung. Basel, Boston.
- [65] CHENG, N.-S. (2008): Formula for the Viscosity of a Glycerol-Water Mixture. In: *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(9), S. 3285-3288.
- [66] GSI (2009). GSI10530 Series of Hybrid Detectors. General Semiconductor Industries Ltd., <http://www.gsi.uk.com/files/200.doc>, 11.03.2013.
- [67] UDE, C. (2013). Evaluation einer optischen Multisensorplattform zur online-Überwachung relevanter Kultivierungs-Basisgrößen. Masterarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie.
- [68] TÖPEL, A. (2004): Chemie und Physik der Milch. Naturstoff – Rohstoff - Lebensmittel, 1. Auflage, Hamburg.
- [69] ORIGINLAB (2011). The Fit Results How Origin Fits the Curve. OriginLab®. http://www.originlab.de/www/helponline/Origin/de/UserGuide/The_Fit_Results.html, 11.03.2013.

A Theoretischer Teil

A1.1 Informationen zu optoelektronischen und optischen Komponenten im Streulichtsensor (Zusatz zu Abschnitt 3.4.2, S. 18f.)

Optische Sensoren bestehen stets aus einer Kombination unterschiedlicher elektrischer Bauelemente: Aktoren und Detektoren. Beide Funktionstypen basieren auf dem Prinzip der Diode. Es handelt sich jeweils um ein Paar aus zwei dotierten Halbleiterschichten, zwischen denen sich ein p-n-Übergang ausbildet. Sie können nur in eine Richtung betrieben werden. In entgegengesetzter Richtung wirken sie als Isolator.

Leuchtdioden (LED) gehören zum Vertreter der Aktoren. Wird eine LED in Durchlassrichtung an einen elektrischen Stromkreis angeschlossen, emittiert sie Licht. Es werden hierfür sog. III-V-Halbleiter verwendet. Bei einem geschlossenen Stromkreis wandern die Elektronen von der n-dotierten Schicht (Kathode) auf die p-dotierte (Anode), wobei durch den direkten Übergang der Elektronen vom Leitungs- ins Valenzband die überschüssige Energie als Licht emittiert wird. Die freiwerdende Wellenlänge und somit die Farbe des ausgesandten Lichts wird durch die Energiedifferenz bestimmt, die für eine Rekombination angeregter Elektronen mit sog. Defektelektronen notwendig ist. Durch geschickte chemische Zusammensetzung der Halbleitermaterialien kann hierdurch eine Wellenlänge zwischen dem UV- und dem IR-Bereich erzeugt werden. Bei der Wahl der geeigneten LED für den entwickelten optischen Sensor wurden drei Kenngrößen bewertet: die emittierende Wellenlänge, die mittlere Lichtstärke und der Raumwinkel des Photostroms. Da LED im Gegensatz zu Lasern kein strikt monochromatisches Licht abgeben, sondern in einem geringen Wellenlängenbereich emittieren, wird meist nur die dominante (farbtongleiche) Wellenlänge als Kenngröße angegeben. Das emittierende quasi-monochromatische Licht einer LED besitzt eine spektrale Halbwertsbreite von $\pm 20 - 35$ nm. Weiterhin besteht bei der Emission eine leichte Temperaturabhängigkeit. In Abbildung A.1 (unten) ist das gaußkurvenähnliche Emissionsspektrum der im Sensor verwendeten LED gezeigt.

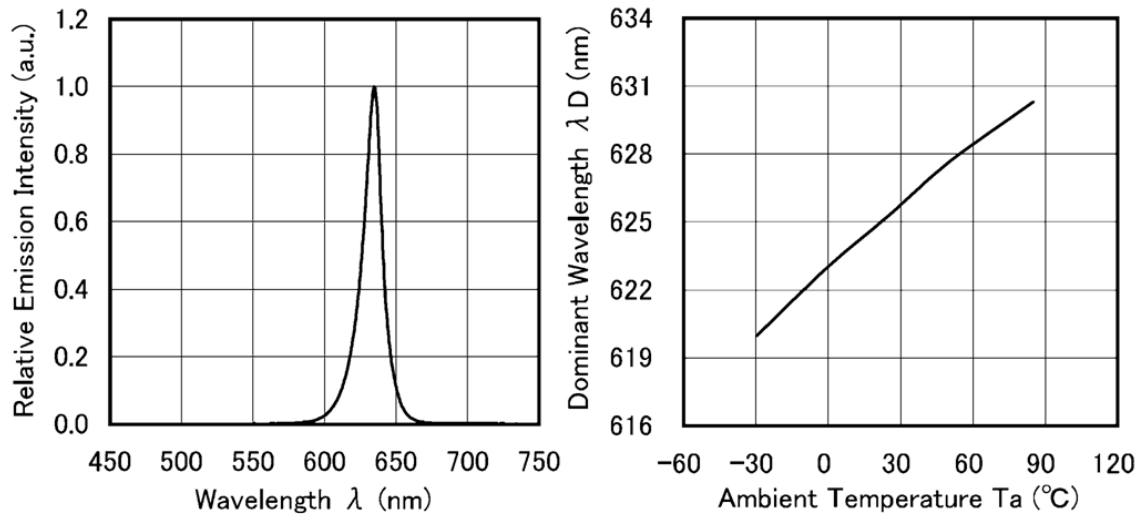


Abbildung A.1: Beispielhaftes Emissionsspektrum einer LED mit $\lambda = 630$ nm. Die hier vorgestellte LED wurde in der Streulichtsensorik verwendet [59].

Um die Anwendbarkeit des optischen Sensors im biotechnologischen Bereich zu gewährleisten, ist es notwendig, dass der emittierende Wellenlängenbereich nicht zu hochfrequent ist. Für die Wahl der optimalen LED wurden im Bereich $\lambda > 550$ nm unterschiedliche Hersteller getestet. Das Optimum bildet eine LED mit einer hohen Strahlungsleistung bei möglichst geringer Frequenz. Aufgrund der Vergleichbarkeit mit konventionellen offline-Analysen wurde eine Wellenlänge um 600 nm gewählt. Die Lichtemission einer LED erfolgt nicht als fokussierter Lichtstrom, sondern als richtungsorientierte Emission, die durch den Raumwinkel beschränkt ist. Die tatsächliche Lichtstärke I einer LED ist gegeben durch die Strahlungsleistung Φ pro Raumwinkel Ω :

$$I = \frac{d\Phi}{d\Omega} \quad \text{mit [I]: } \frac{1 \text{ lm}}{1 \text{ sr}} = 1 \text{ cd} \quad (\text{A.1})$$

Aufgrund der Orientierung zwischen den optoelektronischen Komponenten darf der Raumwinkel jedoch weder zu klein (Toshiba/TLOH50T(F), $\Omega = 9^\circ$), noch zu groß (Ledtech/LURR3000G3 $\Omega = 46^\circ$), gewählt werden. In Abbildung A.2 (unten) sind alle untersuchten Modelle gegenübergestellt. Das Modell NSPR310S von Nichia Corporation (Tokyo, Japan) [59] erfüllt die Anforderungen einer hohen Streulichtintensität im 180° -Setup in Kombination mit einer niederfrequenten Strahlungsleistung, so dass dieses Modell in dem in dieser Arbeit vorgestellten optischen Sensor verwendet wurde. Die Kenngrößen zu den unterschiedlichen LED sind Tabelle A.1 (unten) zu entnehmen.

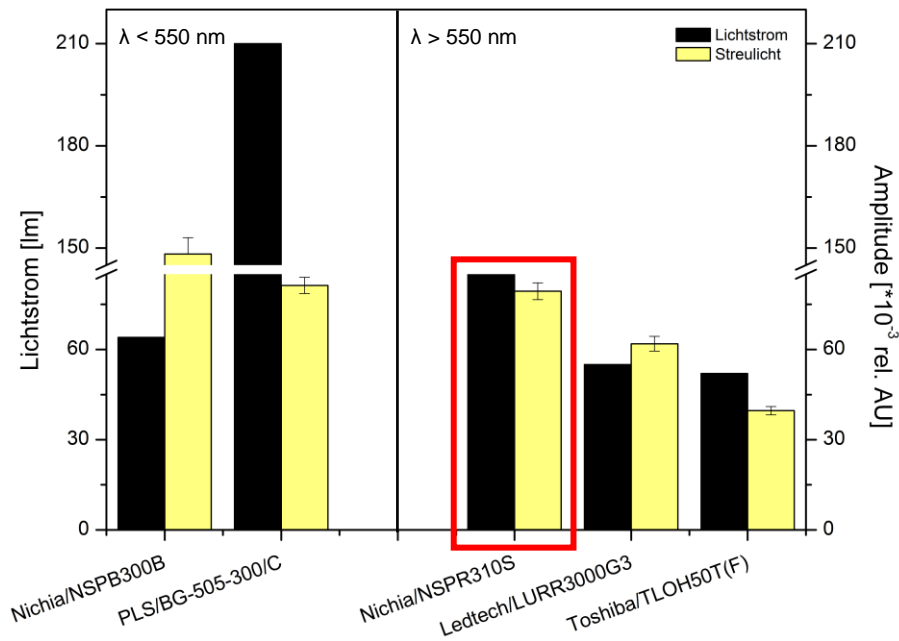


Abbildung A.2: Vergleich der Strahlungsleistung unterschiedlicher LED für den Betrieb in einem nephelometrischen Sensor. Die ausgewählte LED ist rot umrandet.

Tabelle A.1: Kenngrößen ausgewählter LED.

Hersteller	Modell	λ [nm]	I [mcd]	Ω [°]	Φ [lm]	Streulicht [rel. AU]	σ [rel. AU]
Nichia	NSPB300B	470	5.310	12	64	148.265	4.803
PLS	BG-505-30/C	505	7.000	30	210	81.268	2.696
Toshiba	TLOH50T(F)	605	5.800	9	52	39.669	1.390
Nichia	NSPR310S	630	4.267	20	85	79.346	2.780
Ledtech	LURR3000G3	660	1.200	46	55	61.898	2.471

Der detektierende Part des optischen Sensors wird dazu verwendet, das reflektierte Licht in elektrische Energie umzuwandeln. Die hierfür verwendete Photodiode besteht aus zwei dotierten Siliziumschichten, die von einer dritten undotierten Schicht getrennt sind. Es bildet sich ein sog. pin-Übergang aus. Ist ein geschlossener Stromkreis in Sperrichtung vorhanden, ergibt sich zwischen der p- und der i-Zone eine an Ladungsträgern verarmte Sperrzone. Einfallendes Licht bewirkt die Ausbildung eines Elektronen-Loch-Paares. Durch das elektrische Feld wandern die freiwerdenden Elektronen in Richtung der p-, die Defektelektronen in Richtung der n-dotierten Schicht. Besitzen die eingestrahlenen Photonen eine höhere Energie, als die des Bandabstands, wird eine Spannung erzeugt, die proportional zur Lichtintensität ist (innerer Photoeffekt). Die Energiedifferenz zwischen Valenz- und Leitungsband ist, wie bei der Leuchtdiode, materialabhängig. Die wichtigste Kenngröße einer Photodiode ist die Messempfindlichkeit im jeweiligen Wellenlängenbereich. Zur Detektion von Streulicht ist eine hohe Messempfindlichkeit essentiell. Aus diesem Grund ist einer Photodiode ein Photoverstärker vorzuziehen. Photoverstärker sind wesentlich empfindlicher als normale Photodioden und können das eingehende Signal 100-fach

verstärken. Die Funktionsweise ist identisch mit der des typischen Vertreters. Bei der Wahl des optimalen Detektors ist es besonders wichtig, dass dieser eine hohe Photosensitivität im emittierten Wellenlängenbereich besitzt. Für den Bereich des ausgewählten Aktors ($\lambda = 630 \text{ nm}$, [59]) wird Silizium als Grundmaterial verwendet. Als Detektor für den vorgestellten Sensor wurde der Photoverstärker GSI10530EAL von GSI Ltd. (Hampshire, England) [66] ausgewählt, da er für den Bereich niedriger Lichtniveaus entwickelt wurde und hier hohe Signalsensitivität zeigt (Abbildung A.3).

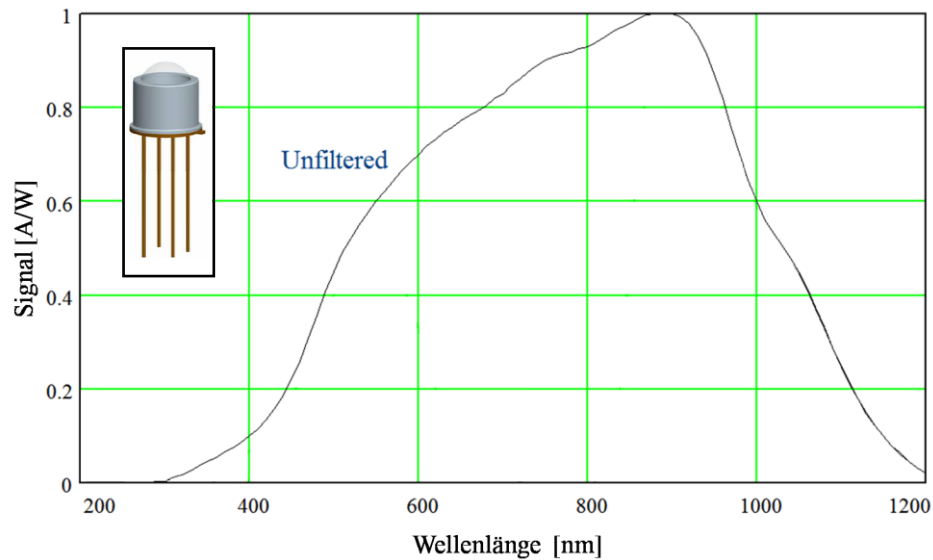


Abbildung A.3: Photosensitivität des integrierten Detektors [66].

Für eine Detektion des Streulichts ist es sinnvoll störende Signale durch eine Abschirmung zu eliminieren. Im vorgestellten Sensor wird eine Kombination aus optischen Filtern eingesetzt. Abbildung A.4 zeigt die Halbwertsbreite der LED.

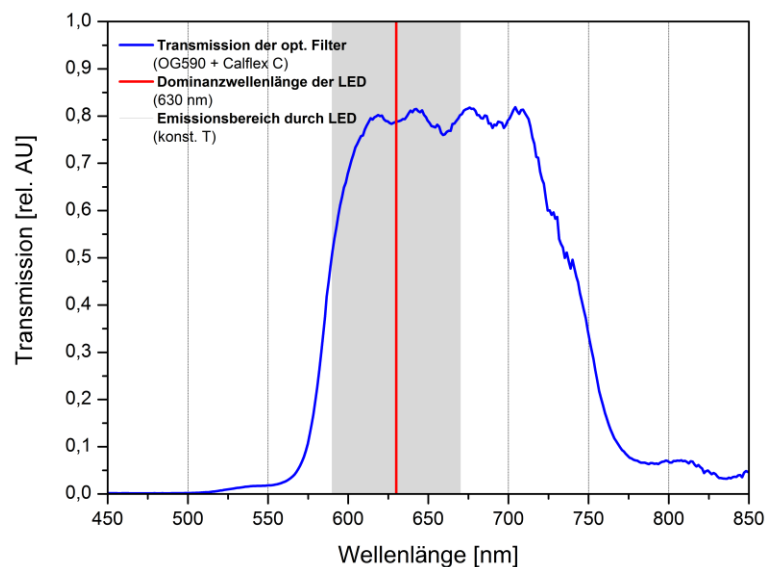


Abbildung A.4: Darstellung des Transmissionsspektrums der in den SFR integrierten Filterkombination [60, 61].

B Experimenteller Teil

B1.1 Rauschverhalten extremer Messbedingungen: Spezialfall

(Zusatz zu Abschnitt 4.1.3, S. 28f.)

Im Hinblick auf die ansteigende Höhendifferenz mit Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit ist in Abbildung B.1 die prozentuale Abweichung der experimentellen Reihe dargestellt.

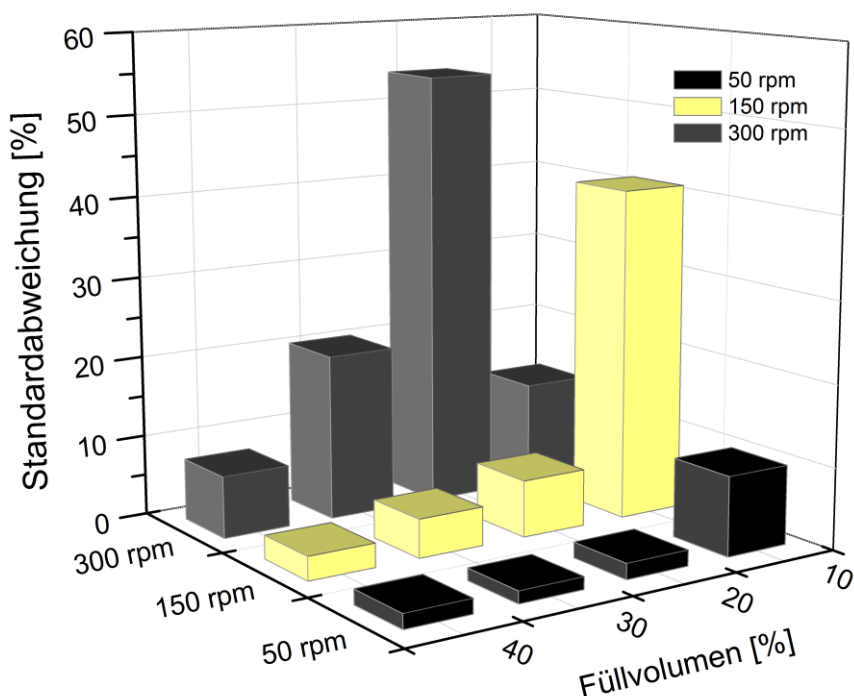


Abbildung B.1: Darstellung der prozentualen Abweichung in Intensitätsmessungen von Formazin mit unterschiedlichen Messbedingungen.

Wie zu vermuten ist, ist die prozentuale Standardabweichung bei viel Flüssigkeit und niedriger Schwingungsfrequenz sehr klein. Bei einer Erhöhung der Geschwindigkeit des Tischschüttlers steigt die Höhendifferenz und somit das Messrauschen während einer Streulichtmessung. Wird bei konstanter Geschwindigkeit die Füllmenge verringert, ist ebenfalls eine Erhöhung der Standardabweichung zu beobachten. Eine Erklärung ist die sich stärker ausbildende Sichelform (vgl. Abbildung 4.9, S. 29). Lediglich die Intensitätsmessung unter den Extrembedingungen 300 rpm und 10% Füllvolumen weicht von diesem Verhalten ab. Hier ist nur ein geringes Rauschverhalten von 12,87%

zu beobachten. Der Grund hierfür liegt im nicht ausgeschöpften Potential des eingestrahlt Lichts selbst im Maximum der Flüssigkeit.

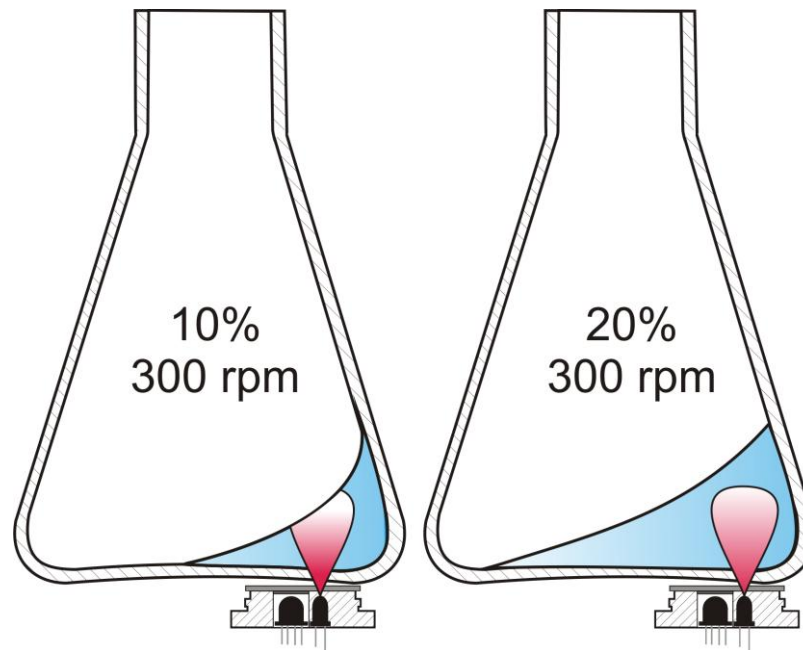


Abbildung B.2: Schematische Darstellung der Ausschöpfung des maximal möglichen Potentials an Streulicht bezogen auf extreme Messbedingungen.

Wie Abbildung B.2 schematisch darstellt wird, ist die Flüssigkeitshöhe bei einem Füllvolumen von 10% so gering, dass ein großer Teil des eingestrahlt Lichts selbst im Maximum an der Phasengrenze gebrochen wird. Dies wird durch den geringen maximal erhaltenen Streuwert von 24.523 rel. AU innerhalb der Messung bestätigt. Aufgrund des reduzierten potentiellen Streulichts wird die Differenz zwischen minimaler und maximaler Messamplitude geringer und hierdurch die Abweichung zum Mittelwert. Dieses Verhalten wurde bei unterschiedlichen OD_{600} -Werten beobachtet und ist somit unabhängig vom Trübungsgrad der Formazinlösung (Tabelle B.1 – B.3, S. 121 - 123).

Tabelle B.1: Einfluss des Streulichts von konstanten Messparametern (500 mL Kolbengröße).

Größe	OD ₆₀₀	Füllvolumen	Drehzahl	Streulicht <i>Mittelwert</i>	σ
[mL]		[%]	[rpm]	[rel. AU]	[rel. AU]
500/NB	6,8	10	50	49.706	4.842
			150	24.562	10.041
			300	19.210	2.473
	20	20	50	61.604	1.193
			150	57.019	3.979
			300	32.630	17.584
	30	30	50	65.439	976
			150	63.437	3.006
			300	53.813	10.987
	40	40	50	67.298	1.232
			150	67.028	1.951
			300	63.277	4.830
2,0	10	10	50	18.642	1.277
			150	26.085	8.341
			300	32.755	5.783
	20	20	50	22.708	667
			150	21.049	2.312
			300	32.526	13.311
	30	30	50	25.282	623
			150	24.908	1.425
			300	22.397	3.919
	40	40	50	31.325	694
			150	31.877	1.040
			300	31.007	1.749
1,1	10	10	50	11.234	1.465
			150	11.865	2.623
			300	7.698	1.608
	20	20	50	13.788	5.621
			150	13.312	2.073
			300	12.225	4.865
	30	30	50	15.603	373
			150	15.379	887
			300	14.152	2.773
	40	40	50	16.635	335
			150	16.567	914
			300	16.900	1.418
0,5	10	10	50	9.777	1.174
			150	13.794	4.388
			300	11.108	6.714
	20	20	50	10.788	1.051
			150	12.659	2.785
			300	11.320	2.351
	30	30	50	10.374	499
			150	9.388	950
			300	11.688	2.460
	40	40	50	10.359	255
			150	9.469	664
			300	10.648	1.008

Tabelle B.2: Einfluss des Streulichts von konstanten Messparametern (250 mL Kolbengröße).

Größe	OD ₆₀₀	Füllvolumen	Drehzahl	Streulicht <i>Mittelwert</i>	σ
[mL]		[%]	[rpm]	[rel. AU]	[rel. AU]
250/NB	5,9	10	50	49.651	3.222
			150	34.093	17.443
			300	20.142	17.332
		20	50	60.955	1.628
			150	55.513	8.424
			300	34.764	22.419
		30	50	65.224	1.417
			150	63.709	3.056
			300	52.080	12.861
		40	50	67.685	1.450
			150	67.255	1.793
			300	63.164	4.746
2,0	2,0	10	50	21.473	2.319
			150	13.899	8.591
			300	10.077	8.225
		20	50	27.613	968
			150	23.523	5.627
			300	17.823	12.347
		30	50	29.194	600
			150	28.414	2.741
			300	24.534	7.201
		40	50	30.886	637
			150	30.502	1.594
			300	28.707	3.969
1,1	1,1	10	50	10.165	1.403
			150	9.150	4.044
			300	7.836	4.621
		20	50	14.051	658
			150	13.553	3.387
			300	12.343	5.980
		30	50	16.180	497
			150	15.590	2.295
			300	14.140	4.222
		40	50	17.558	347
			150	16.908	1.621
			300	17.175	2.439
0,5	0,5	10	50	5.596	803
			150	7.849	3.405
			300	5.915	1.568
		20	50	7.901	809
			150	8.036	1.827
			300	10.857	2.940
		30	50	9.297	698
			150	8.657	1.190
			300	12.158	2.311
		40	50	9.870	446
			150	7.985	1.161
			300	9.174	2.111

Tabelle B.3: Einfluss des Streulichts von konstanten Messparametern (125 mL Kolbengröße).

Größe	OD ₆₀₀	Füllvolumen	Drehzahl	Streulicht Mittelwert	σ
[mL]		[%]	[rpm]	[rel. AU]	[rel. AU]
125/NB	5,9	10	50	12.509	2.095
			150	10.479	5.878
			300	9.408	5.528
		20	50	16.874	633
			150	15.294	4.406
			300	11.313	6.423
		30	50	18.383	451
			150	17.692	1.872
			300	13.198	5.645
		40	50	17.766	349
			150	17.389	1.265
			300	15.381	3.872
2,0	2,0	10	50	3.572	560
			150	4.192	1.551
			300	4.597	1.558
		20	50	5.159	307
			150	4.858	1.694
			300	5.157	1.560
		30	50	6.017	187
			150	5.870	942
			300	5.243	1.928
		40	50	6.435	130
			150	6.363	591
			300	5.765	1.395
1,1	1,1	10	50	1.880	75
			150	2.725	559
			300	3.637	597
		20	50	2.320	162
			150	2.543	640
			300	3.350	680
		30	50	2.858	133
			150	2.944	670
			300	3.281	877
		40	50	3.128	119
			150	3.044	635
			300	3.263	916
0,5	0,5	10	50	2.741	148
			150	2.003	852
			300	3.117	1.414
		20	50	1.770	56
			150	1.882	479
			300	2.422	713
		30	50	1.524	48
			150	1.450	184
			300	1.985	344
		40	50	1.416	73
			150	1.356	232
			300	1.755	247

B1.2 Unterschiedliche Schüttelgeschwindigkeiten bei Abstandsvariation zwischen LED und Photodiode (Zusatz zu Abschnitt 4.1.5, S. 33f.)

Tabelle B.4: Veränderung der Streulichtintensität bei Vergrößerung des Abstands zwischen den optoelektronischen Komponenten (unterschiedliche Geschwindigkeiten).

Abstand [mm]	Drehzahl [rpm]	Amplitude [rel. AU]	σ [rel. AU]
0	0	49.694	899
	50	49.858	814
	150	49.569	1.613
1	0	40.586	606
	50	40.535	687
	150	39.309	1.243
2	0	33.591	422
	50	33.362	629
	150	33.526	1.431
3	0	26.396	397
	50	26.426	377
	150	25.247	1.013
4	0	24.550	319
	50	24.521	364
	150	23.998	1.155
5	0	20.987	389
	50	20.954	368
	150	20.464	934
6	0	17.796	307
	50	17.889	243
	150	17.442	950
7	0	14.411	234
	50	14.416	213
	150	13.995	791
8	0	11.926	215
	50	11.941	179
	150	11.489	698
9	0	11.406	179
	50	11.385	171
	150	11.307	633
10	0	10.323	154
	50	10.263	213
	150	9.953	751
11	0	8.843	118
	50	8.800	148
	150	8.466	666
12	0	7.728	124
	50	7.713	129
	150	7.203	661

B1.3 Einfluss von Sensorpatches auf die Messwertbildung

(Zusatz zu Abschnitt 4.1.6, S. 35f.)

Das geringere mittlere Amplitudensignal eines NB-Kolbens bei 10% Füllvolumen im Vergleich zu einem Kolben mit Schikanen resultiert aus der Flüssigkeitsverteilung. In den Ausbuchtungen der Schikanen am Kolbenboden sammelt sich bei geringem Volumen mehr Flüssigkeit, wodurch mehr Partikel bzw. Zellen für gerichtete Reflexionen dem Streuprozess zur Verfügung stehen. Ab einem Füllvolumen von 100 mL bzw. 20% ist dieser Unterschied bei einer unverdünnten Formazinlösung nicht mehr zu beobachten. Ab diesem Grenzwert verhält sich die Streulichtmessung unabhängig von der Kolbenart. Selbst die mittleren Fehler sind vergleichbar, wie beispielhaft bei der Geschwindigkeit von 150 rpm zu sehen ist (Abbildung B.3).

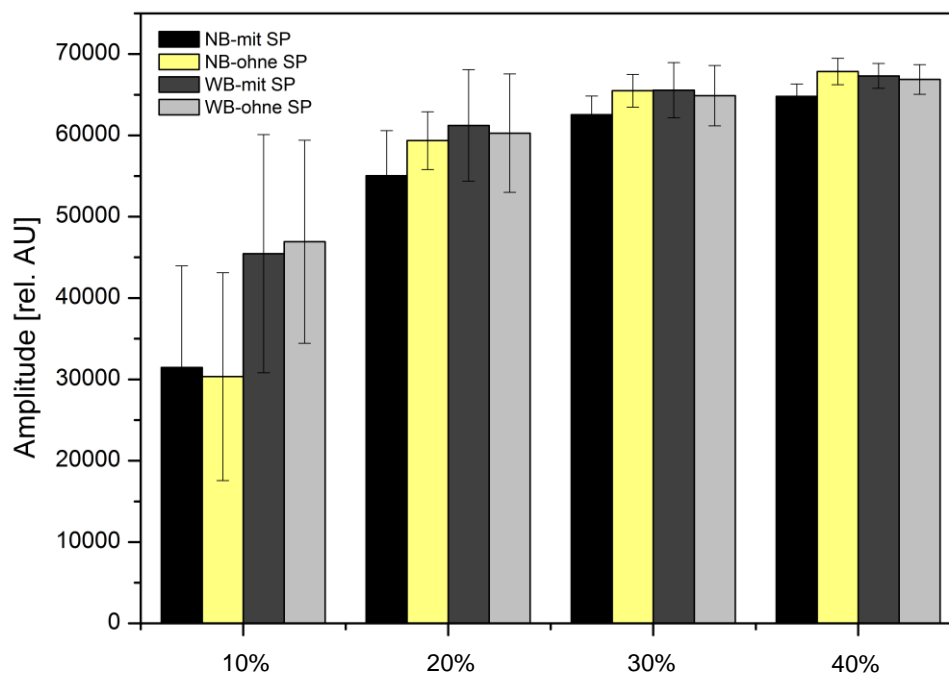


Abbildung B.3: Einfluss von im Schüttelkolben integrierten Sensorpatches und Schikanen auf Intensitätsmessungen nach Neupositionierung der Streulichtsensorik. Die Messreihe wurde bei einer Schüttelfrequenz von 150 rpm durchgeführt.

Weiterhin ist deutlich zu beobachten, dass bei der gewählten Position des Streulichtsenors die vorhandenen Fluoreszenzpatches zu keiner Signalverringernng des maximalen Mittelwerts und zu keiner Erhöhung des mittleren Fehlers führen. Der Unterschied beträgt bei Betrachtung der gesamten experimentellen Reihe für NB-Kolben weniger als 5%, für WB-Schüttelkolben weniger als 2%. Die Ursache dieser sehr geringen Abweichungen ist nicht auf die Sensorpatches zurückzuführen, sondern durch das natürliche Messrauschen zu erklären.

B1.4 Reproduzierbarkeit der Winkelabhängigkeit zum Streulichtwert (Zusatz zu Abschnitt 4.2.1, S. 41f.)

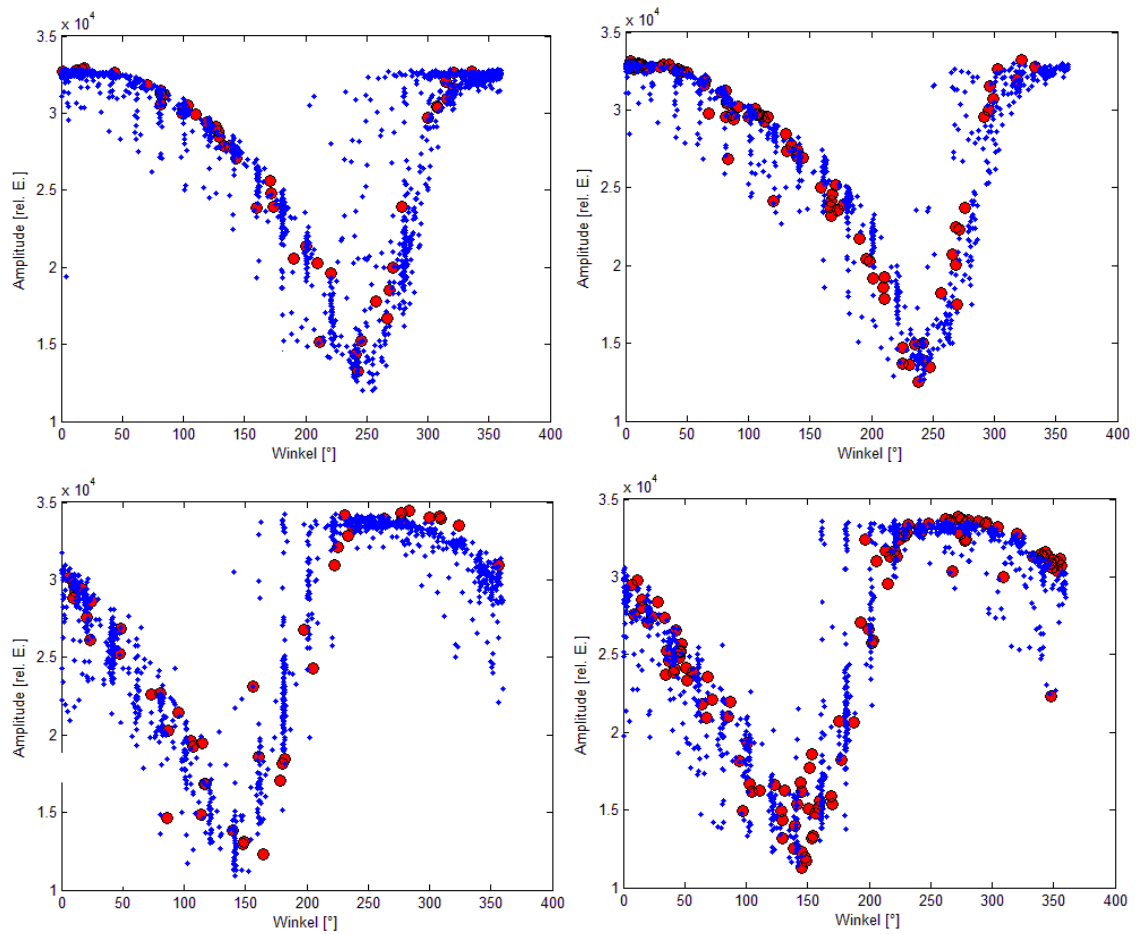


Abbildung B.4: Reproduzierbarkeit der experimentellen Reihe zur Findung des optimalen Triggerwinkels. Oben: Mehrfachmessung einer Formazinlösung bei 150 rpm 20% Füllvolumen. Unten: Mehrfachmessung einer Formazinlösung bei 175 rpm 20% Füllvolumen.

B1.5 Optimierte Einstellung des Beschleunigungssensors definierter Messparameter (Zusatz zu Abschnitt 4.2.1, S. 41f.)

Tabelle B.5: Anpassungsfunktionen der Triggerwinkel definierter Messparameter.

Messbedingungen			Lineare Regression	
Kolbengröße [mL]	Kolbenart	Füllvolumen [%]		
125	NB	10	$y = -4,38 \cdot x + 632,25;$	$R^2 = 0,998$
125	NB	20	$y = -4,34 \cdot x + 622,05;$	$R^2 = 0,992$
125	NB	30	$y = -4,25 \cdot x + 612,32;$	$R^2 = 0,997$
125	NB	40	$y = -4,25 \cdot x + 614,00;$	$R^2 = 0,998$
125	WB	10	$y = -3,91 \cdot x + 628,61;$	$R^2 = 0,992$
125	WB	20	$y = -4,11 \cdot x + 612,86;$	$R^2 = 0,996$
125	WB	30	$y = -4,16 \cdot x + 603,65;$	$R^2 = 0,987$
125	WB	40	$y = -4,02 \cdot x + 586,60;$	$R^2 = 0,995$
250	NB	10	$y = -4,44 \cdot x + 641,73;$	$R^2 = 0,999$
250	NB	20	$y = -4,29 \cdot x + 628,82;$	$R^2 = 0,993$
250	NB	30	$y = -4,23 \cdot x + 607,78;$	$R^2 = 0,995$
250	NB	40	$y = -4,23 \cdot x + 607,38;$	$R^2 = 0,999$
250	WB	10	$y = -3,54 \cdot x + 579,58;$	$R^2 = 0,996$
250	WB	20	$y = -3,89 \cdot x + 592,28;$	$R^2 = 0,986$
250	WB	30	$y = -3,84 \cdot x + 568,68;$	$R^2 = 0,998$
250	WB	40	$y = -4,19 \cdot x + 612,91;$	$R^2 = 0,985$
500	NB	10	$y = -4,52 \cdot x + 671,71;$	$R^2 = 0,998$
500	NB	20	$y = -4,08 \cdot x + 610,05;$	$R^2 = 0,984$
500	NB	30	$y = -4,21 \cdot x + 610,34;$	$R^2 = 0,990$
500	NB	40	$y = -4,13 \cdot x + 594,53;$	$R^2 = 0,989$
500	WB	10	$y = -3,66 \cdot x + 599,24;$	$R^2 = 0,999$
500	WB	20	$y = -3,73 \cdot x + 573,90;$	$R^2 = 0,995$
500	WB	30	$y = -3,83 \cdot x + 562,72;$	$R^2 = 0,982$
500	WB	40	$y = -3,98 \cdot x + 573,19;$	$R^2 = 0,970$

B1.6 Einfluss von Glycerinkonzentration auf das Streulichtsignal (Zusatz zu Abschnitt 4.2.2, S. 48f.)

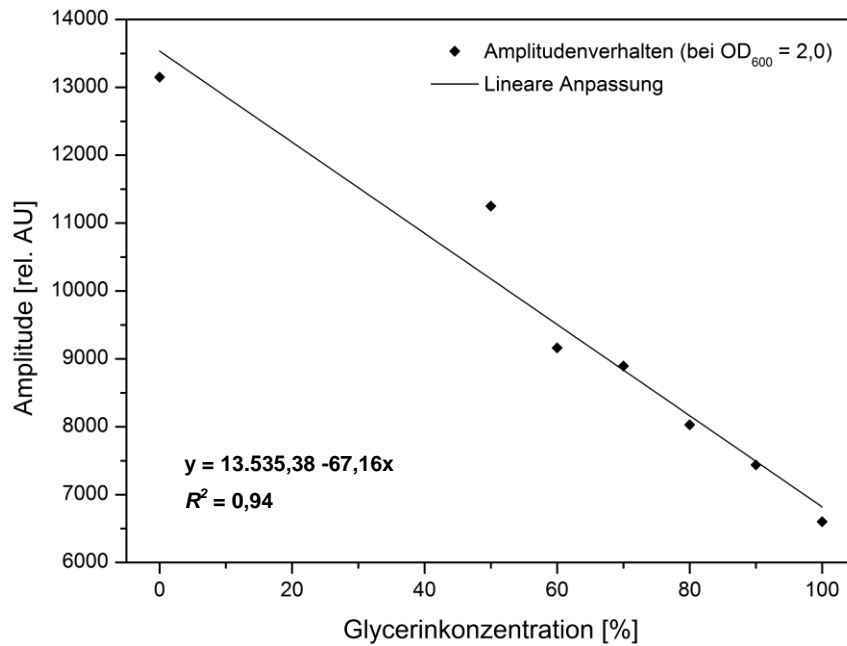


Abbildung B.5: Amplitudenverhalten bei zunehmender Glycerinkonzentration ($OD_{600} = 2,0$).

B1.7 Veränderung des Signalverhaltens bei Erhöhung des Volumens im Kolben (Zusatz zu Abschnitt 4.2.3, S. 51f.)

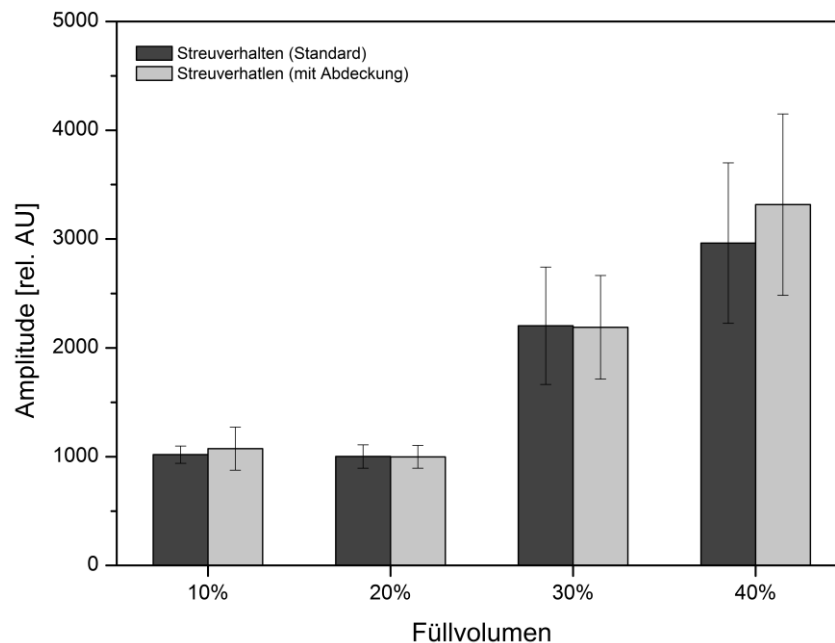


Abbildung B.6: Intensitätsmessung der Streulichtmessungen von Wasser. Dargestellt sind Mittelwerte definierter Füllvolumina, erhalten aus jeweils 30 Messwerten (250 mL, NB, 200 rpm).

B1.8 Veränderung des Signalverhaltens durch Erhöhung der Gelöststoffkonzentration (Zusatz zu Abschnitt 4.2.5, S. 61f.)

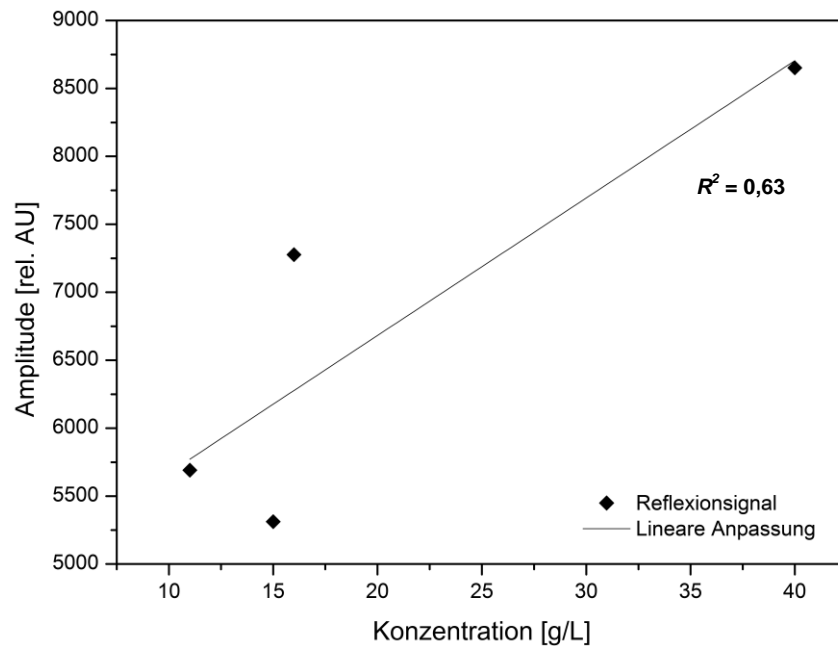


Abbildung B.7: Abhängigkeit zwischen Gelöststoffkonzentration und Amplitudensignal des Sensors.

B1.9 Einsatz des Beschleunigungssensors im mikrobiologischen Bereich (Zusatz zu Abschnitt 4.3, S. 65f.)

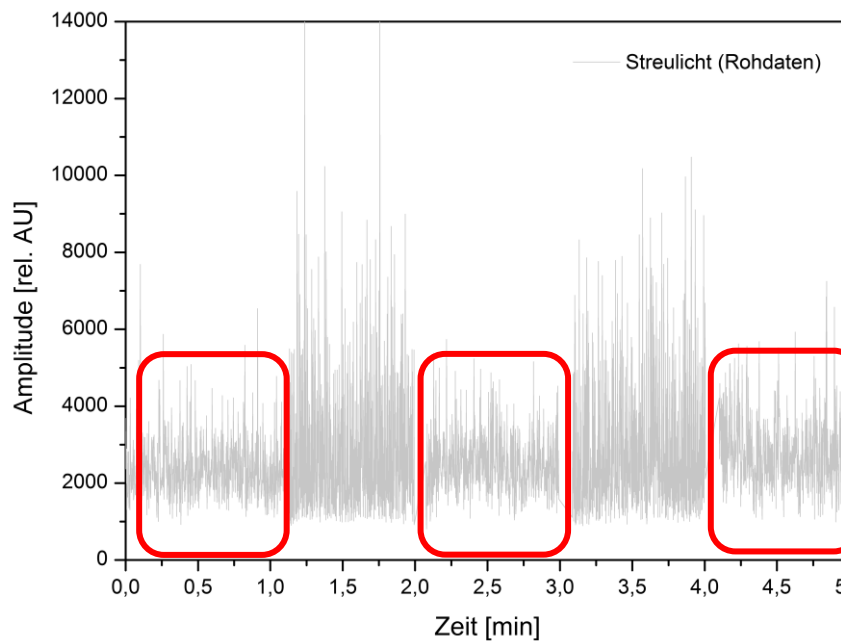


Abbildung B.8: Verbesserung des Amplitudensignals durch Verwendung des optimalen Triggerwinkels. Gezeigt sind die Rohdaten einer Kultivierung von *E. coli* K1 in LB-Medium. Die rot eingefärbten Bereiche stellen Messungen mit aktiviertem G-Sensor dar.

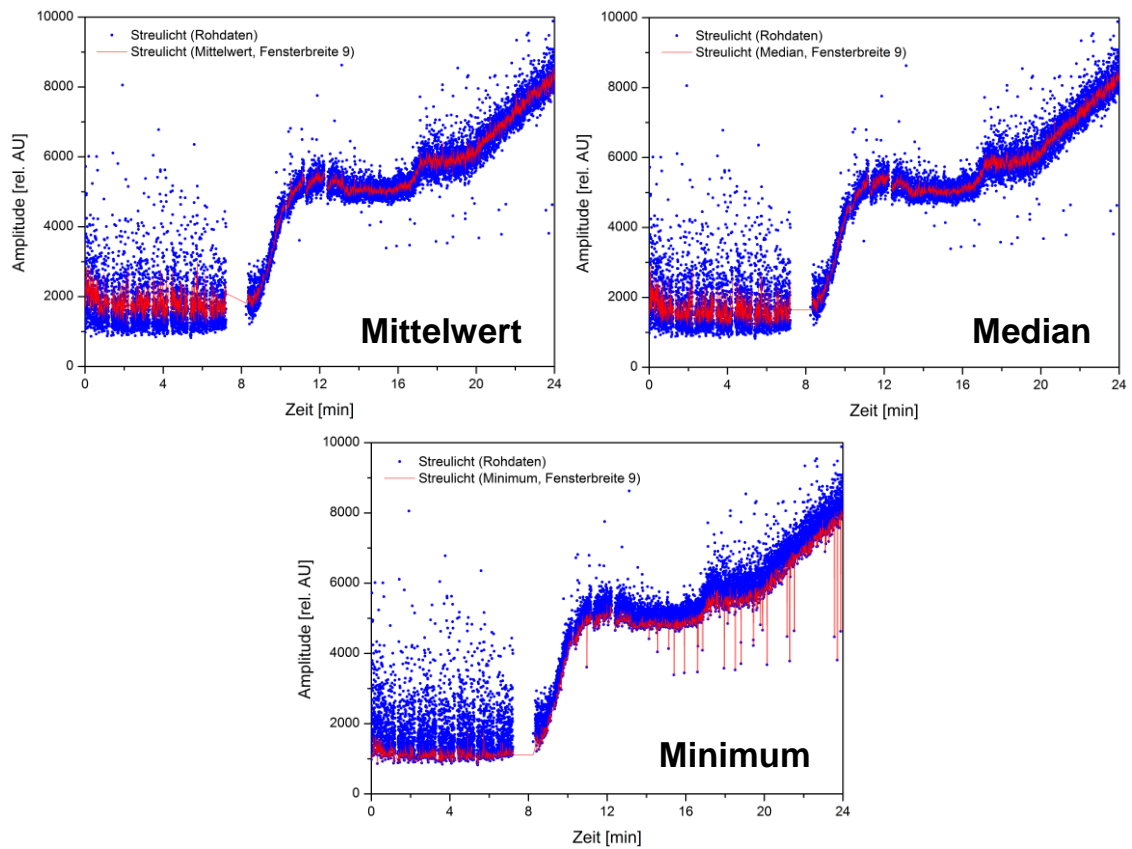
B1.10 Vergleich unterschiedlicher digitaler Filtermethoden**(Zusatz zu Abschnitt 4.3.1, S. 65f.)**

Abbildung B.9: Vergleich unterschiedlicher digitaler Filtermethoden am Beispiel einer Prozessüberwachung von *E. coli* K12 (exemplarisch mit Fensterbreite 9). Die Kultivierungsbedingungen entsprechen Tabelle 4.9 (S. 76).

B1.11 Sägezahnbildung in verschiedenen Mikroorganismen

(Zusatz zu Abschnitt 4.3.3, S. 71f.)

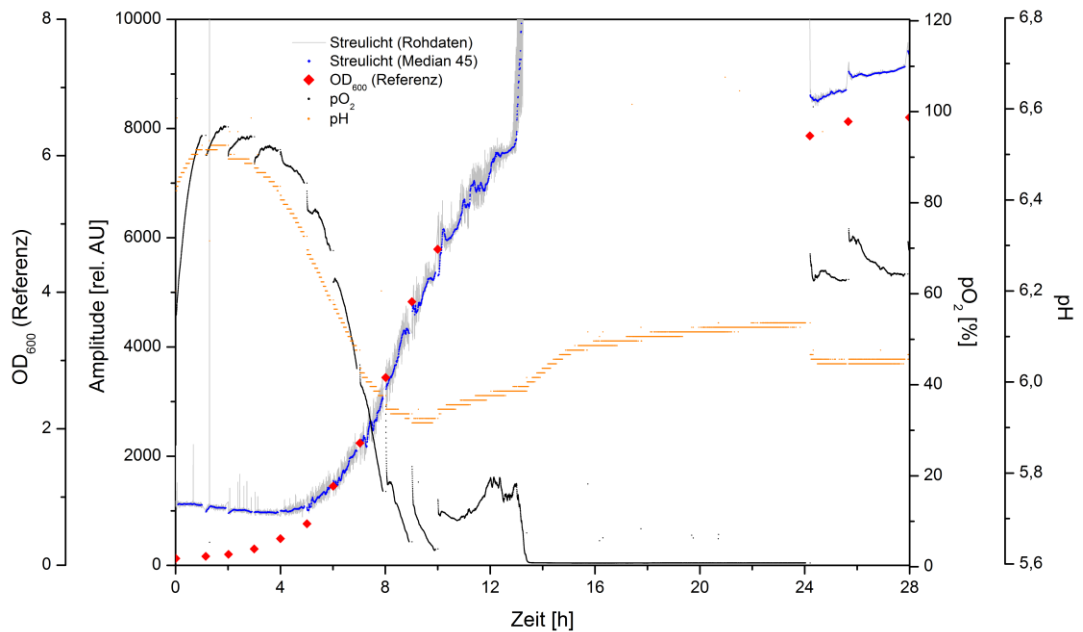


Abbildung B.10: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von *L. zeae*).

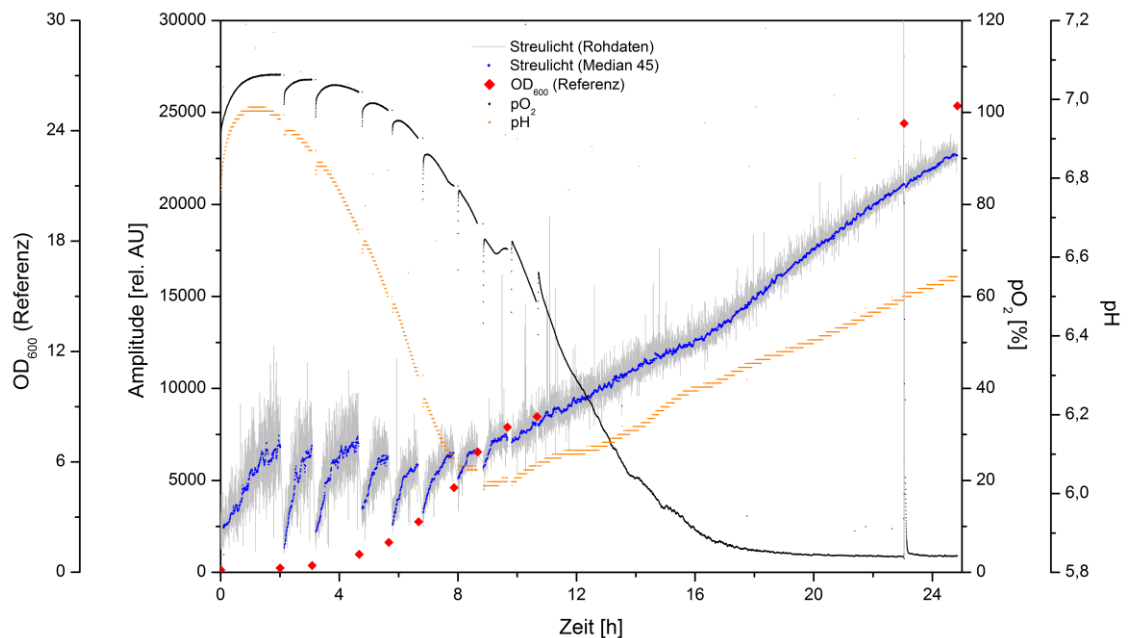


Abbildung B.11: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von *S. cerevisiae*).

B.1.11 Sägezahnbildung in verschiedenen Mikroorganismen (*Fortsetzung*, Zusatz zu Abschnitt 4.3.3, S. 71f.)

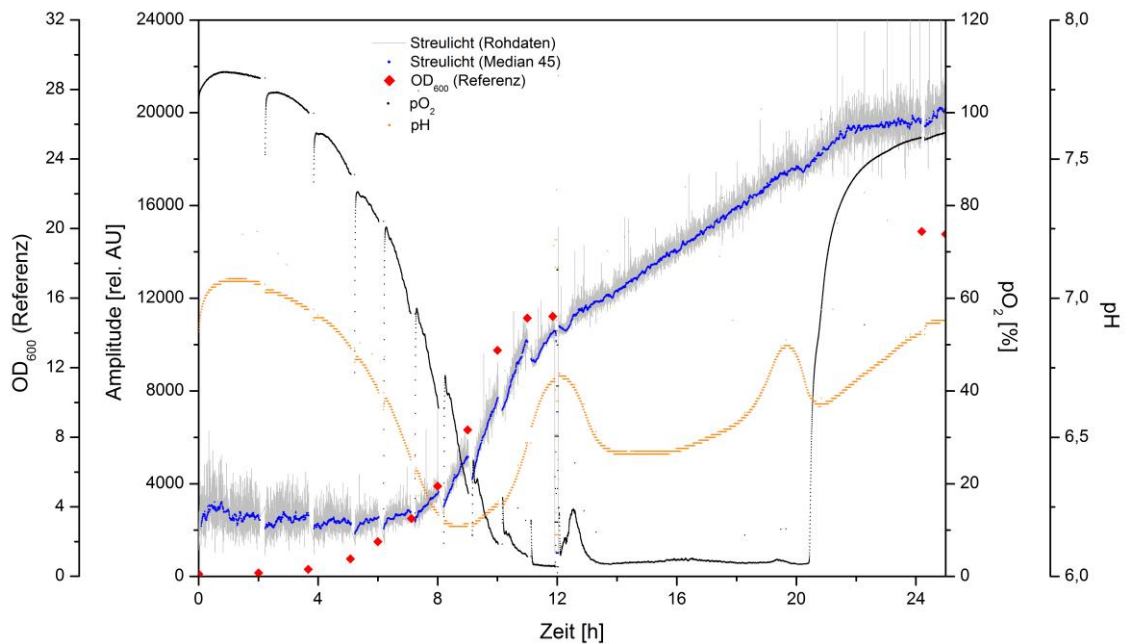


Abbildung B.12: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von *K. marxianus*).

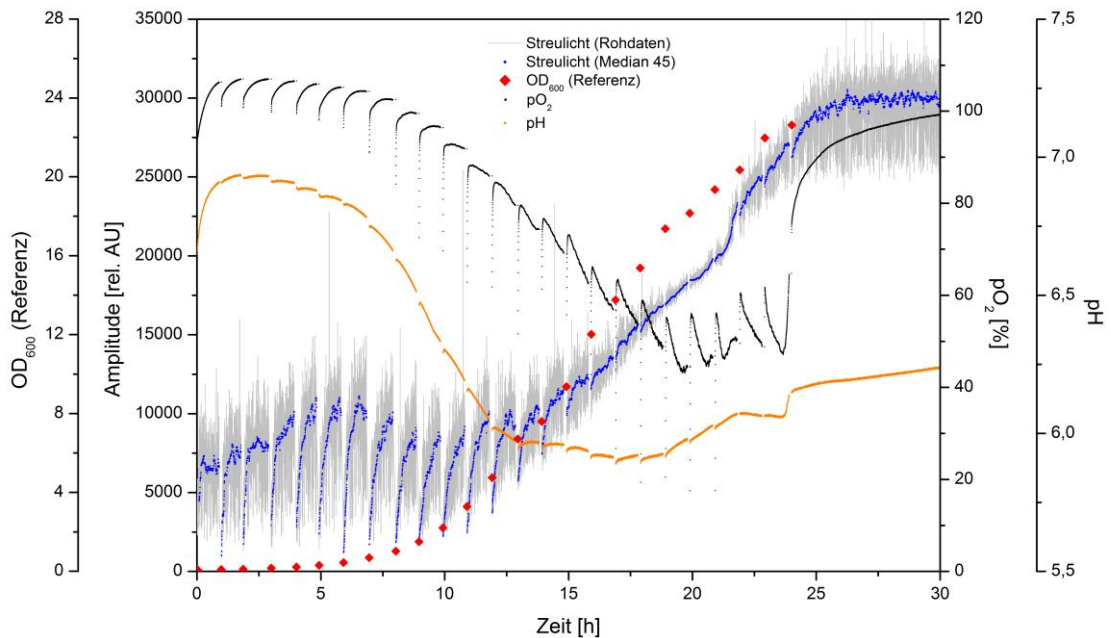


Abbildung B.13: Automatisierte Prozessüberwachung durch den SFR-Multitester ohne Antischaummittel (am Beispiel von *P. pastoris*).

B1.12 Verhaltensähnlichkeiten in Kalibrationen mit Basisgröße OD₆₀₀

(Zusatz zu Abbildung 4.50, S. 80)

Tabelle B.6: Vergleich schaumunabhängiger Kalibrationen für Basisgröße OD₆₀₀. Es ist die Abweichung von *E. coli* K12 und *P. pastoris* zu *S. cerevisiae* abgegeben. Es wurden Amplitudenwerte aus den jeweiligen Kalibrationen berechnet.

OD ₆₀₀	Amplitude <i>E. coli</i> K12 [rel. AU]	Abweichung [%]	Amplitude <i>S. cerevisiae</i> [rel. AU]	Abweichung [%]	Amplitude <i>P. pastoris</i> [rel. AU]
1	1.340	8,5	1.465	3,4	1.515
2	1.721	0,0	1.721	3,0	1.773
3	2.151	4,3	2.063	3,1	2.127
4	2.618	5,6	2.478	3,4	2.563
5	3.113	5,3	2.955	4,0	3.072
6	3.632	4,1	3.490	4,5	3.649
7	4.173	2,3	4.078	5,2	4.289
8	4.732	0,3	4.716	5,7	4.987
9	5.308	1,7	5.400	6,3	5.742
10	5.899	3,7	6.129	6,9	6.550
11	6.505	5,7	6.900	7,4	7.410
12	7.124	7,6	7.711	7,9	8.319
13	7.755	9,4	8.562	8,4	9.277
14	8.398	11,0	9.450	9,0	10.281
15	9.052	13,0	10.375	9,0	11.331

B1.13 Verhaltensähnlichkeiten in Kalibrationen mit Basisgröße BTM

(Zusatz zu Abbildung 4.51, S. 81)

Tabelle B.7: Vergleich schaumunabhängiger Kalibrationen für Basisgröße BTM. Es ist die Abweichung von *K. marxianus* zu *S. cerevisiae* abgegeben. Es wurden Amplitudenwerte aus den jeweiligen Kalibrationen berechnet.

BTM [g/L]	Amplitude <i>K. marxianus</i> [rel. AU]	Abweichung [%]	Amplitude <i>S. cerevisiae</i> [rel. AU]
0,3	1.487	9,3	1.626
0,5	1.589	2,2	1.623
0,7	1.736	1,5	1.710
0,9	1.928	3,6	1.859
1,1	2.163	4,9	2.057
1,3	2.442	5,9	2.299
1,5	2.764	6,6	2.581
1,7	3.128	7,3	2.899
1,9	3.533	7,9	3.253
2,1	3.980	8,5	3.641
2,3	4.468	9,1	4.061
2,5	4.997	9,7	4.512
2,7	5.566	10,3	4.994
2,9	6.175	10,8	5.506

B1.14 Referenzkultivierung von *E. coli* K12 mit einer Kohlenstoffquelle

(Zusatz zu Abschnitt 4.4.1, S. 86f.)

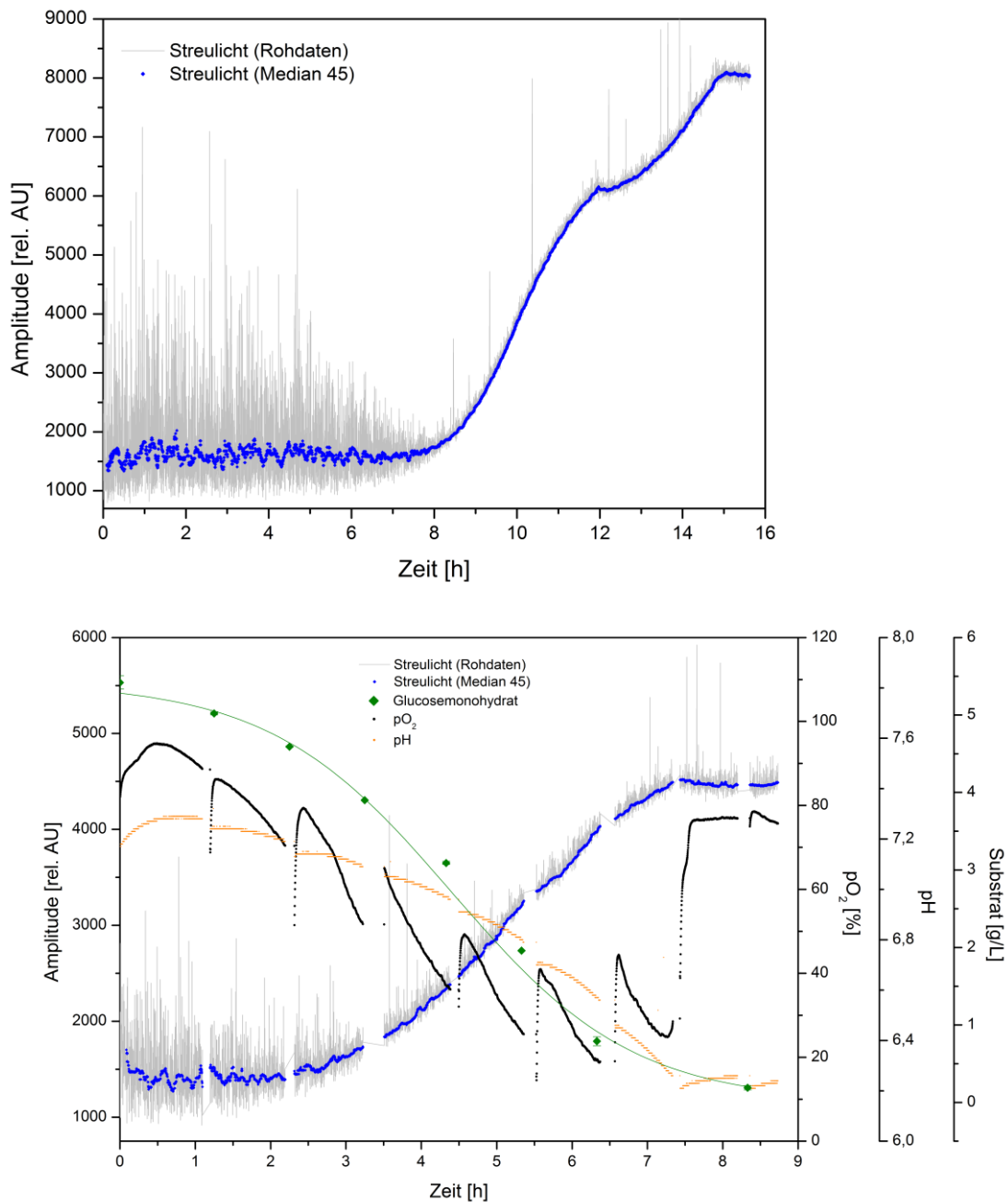


Abbildung B.14: Prozessüberwachung bei *E. coli* K12 in Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Referenzkultivierungen zu Prozessüberwachungen diauxischen Wachstums. Oben: Verzicht der Probennahme. Unten: Intervallartige Durchführung von offline-Probennahmen zur Analyse der Glucosekonzentration. Es können keine Anomalien im Streulichtsignal beobachtet werden.

B1.15 Prozessüberwachung von *F. velutipes* mit eintretendem Zerfall der Mycelkugeln und Lysis (zu Abschnitt 4.4.3, S. 92f.)

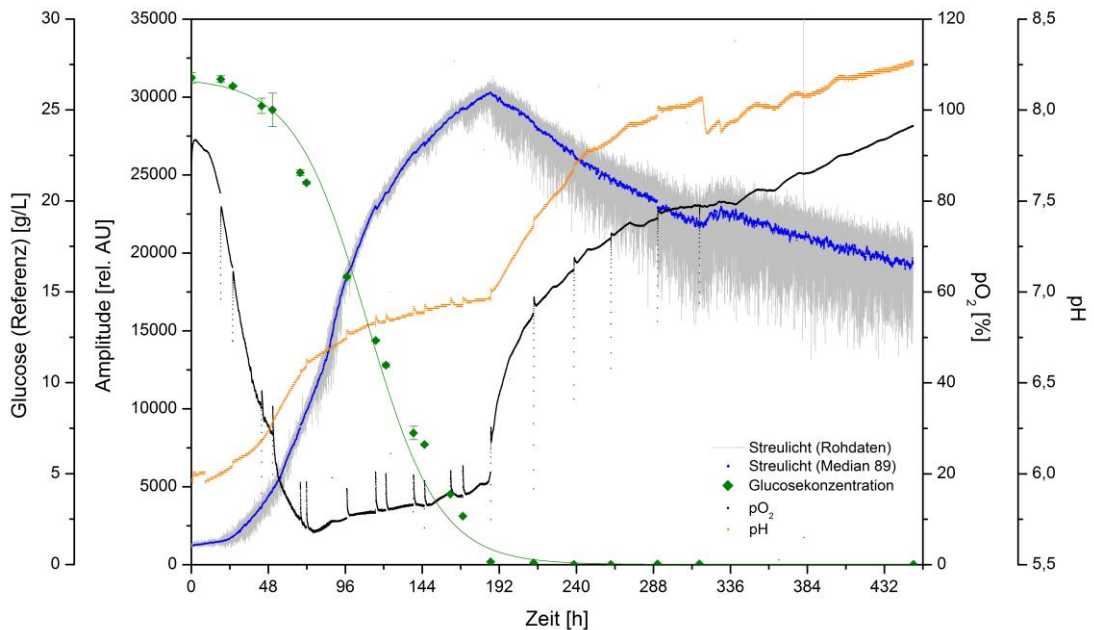


Abbildung B.15: Gesamtüberblick über Prozessüberwachung von mycelbildender Kulturen am Beispiel von *F. velutipes*. Ab dem Zeitpunkt einer Substratlimitierung zerfällt das Mycelgeflecht. Hierdurch entsteht ein erhöhtes Messrauschen.

B1.16 Abhängigkeit des Sensorsignals von der Glucosekonzentration

(Zusatz zu Abschnitt 4.4.3, S. 92f.)

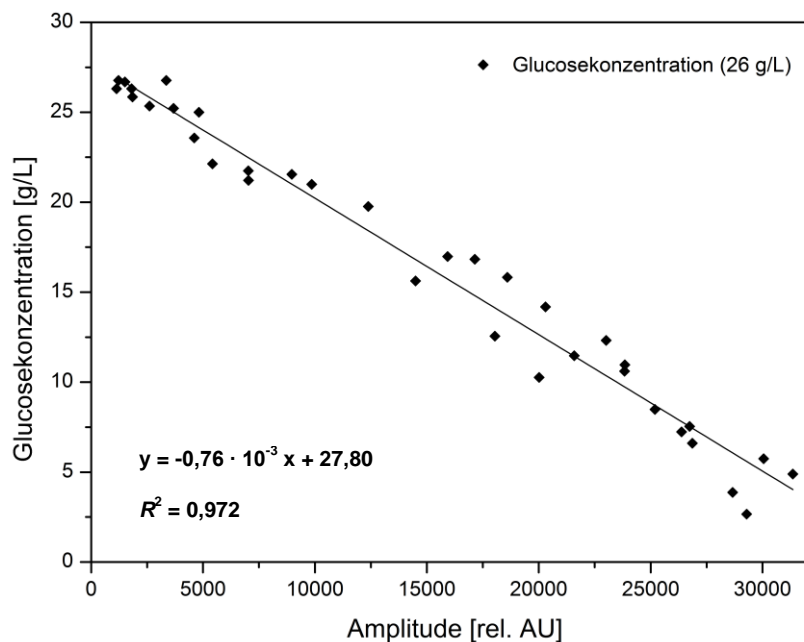


Abbildung B.16: Kalibration zwischen dem Streulichtsignal und der Glucosekonzentration am Beispiel von *F. velutipes* in SNL-Medium.

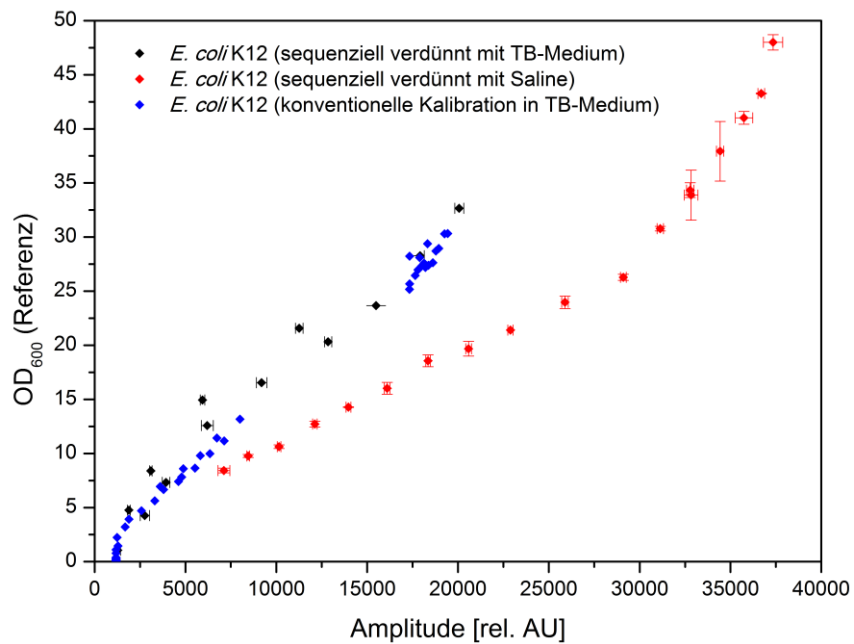
B1.17 Verhalten unterschiedlicher Verdünnungsreihen bei sequenzieller Verdünnung (Zusatz zu Abschnitt 4.5.1, S. 99f.)

Abbildung B.17: Verhalten unterschiedlicher Verdünnungsmedien bei der Kalibrationserstellung mittels sequenzieller Verdünnungen. Zum Vergleich zur konventionellen Methode wurde die schaumunabhängige Kalibration von *E. coli* K12 mit eingezeichnet. Er ist zu erkennen, dass die Ähnlichkeit bei gleichem Medium deutlicher ausgeprägt ist. Die Kalibration aus Abschnitt 4.3.5 (S. 78f.) besitzt offenbar eine Abhängigkeit zum verwendeten Medium.

C Methoden

C1 Messungen konstanter Suspensionen

C1.1 Messungen mit Kalibrationsstandard Formazin

Für Intensitätsmessungen konstanter Trübungen wurde der Kalibrationsstandard Formazin verwendet. Es handelt sich um eine polymere Verbindung, die aus Urotropin und Hydrazinsulfat hergestellt wird und bei Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln bis vier Wochen haltbar ist. Formazin ist eine standardisierte Suspension zur Kalibration von Spektrophotometern. Eine unverdünnte, frisch hergestellte Formazinlösung besitzt eine Trübung von 4.000 NTU (nephelometric turbidity unit). Die entspricht einer optischen Dichte von $OD_{600} = 6,9$. Verdünnungen auf bestimmte OD_{600} -Werte erfolgten unter Zugabe von deionisiertem Wasser (Herstellung siehe Abschnitt D1.1, S. 148).

Messungen von Formazin wurden bei einem Messintervall von 7 s (bzw. 10 s) im Schüttelbetrieb oder in Ruhelage durchgeführt. Die Sensorsignale wurden für die Ermittlung von Mittelwerten, Standardabweichungen sowie für weitere Interpretationen verarbeitet. Variierende Messparameter sind Tabelle C.1 zu entnehmen.

Tabelle C.1: Variierende Messparameter bei Messungen konstanter Trübungen. Alle Messungen wurden auf demselben Kreisschüttler durchgeführt (Schüttelradius: 25 mm).

Kolbengröße [mL]	Kolbenart	Füllvolumen [%]	Schüttelfrequenz [rpm]	Triggerwinkel
1.000	NB	10	75	+ / -
500	WB	20	100	(bei Verwendung: 0 - 360° Synchronisation mit Schüttelfrequenz)
250		30	125	
125		40	150	
			175	
			200	
			300	

C1.2 Messungen konstanter Zellsuspensionen

Messungen konstanter Zellsuspensionen erfolgten bei einem Messintervall von 7 s im Schüttelbetrieb oder in Ruhelage. Zum Einstellen sich nicht verändernder Trübung wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung (Saline) gewaschen und resuspendiert. Verdünnungen auf bestimmte OD_{600} -Werte erfolgten mit o.g. Saline. Die Sensorsignale wurden für die Ermittlung von

Mittelwerten, Standardabweichungen sowie für weitere Interpretationen verarbeitet. Variierende Messparameter entsprechen Tabelle C.1(oben).

C2 Ausgewählte Mikroorganismen

Folgende Mikroorganismen wurden im Rahmen der vorgestellten Arbeiten kultiviert.

Tabelle C.2: Zusammenfassung verwendeter Mikroorganismen.

Spezies	Stamm	Medium	Validierung	
			AS -	AS +
<i>A. niger</i>	D15 Xyn2	FM	-	nein
<i>B. megaterium</i>	pMM1525	LB	-	nein
<i>E. coli</i>	K12	LB, TB, MM	ja	ja
<i>F. velutipes</i>	DSM 1658	SNL	ja	-
<i>K. marxianus</i>	DSM 5422	YM	nein	-
<i>L. zeaе</i>	DSM 20178	MRS	ja	ja
<i>P. pastoris</i>	DSM 70382	YM	ja	ja
<i>S. cerevisiae</i>	H1024	YM	ja	ja

C3 Mikrobiologische Methoden

C3.1 Vorkulturen von Bakterien

Vor einer zu überwachenden Schüttelkolbenkultivierung wurde eine Vorkultur durchgeführt. Zum Animpfen dieser Vorkultur wurden ca. 50 mL eines autoklavierten Nährmediums in einem 500 mL-Schüttelkolben mit je 200 µL einer Kryokultur des entsprechenden Mikroorganismus versetzt. Es folgte die Zugabe einer sterilen Glucoselösung, bis das Kulturgut eine Glucosekonzentration von 10 - 12 g/L aufwies. Der Kolben wurde anschließend über Nacht in einem Schüttelschrank unter den jeweiligen Messbedingungen inkubiert. Die Messbedingungen entsprechen den überwachten Schüttelkolbenkultivierungen aus Abschnitt C3.4 (unten). Die Parametereinstellungen für schaumabhängige Kultivierungen sind Tabelle 4.9 (S. 76) bzw. für schaumunabhängige Kultivierungen Tabelle 4.12 (S. 80) zu entnehmen.

C3.2 Vorkulturen von Hefen

Wie Abschnitt C3.1 (oben). Zum Animpfen wurden statt einer Kryokultur i.d.R. einige Kolonien von einer Agarplatte mit einer ausgeglühten Impföse im Nährmedium resuspendiert.

C3.3 Vorkulturen mycelbildender Kulturen

Für eine Vorkultur von *F. velutipes* wurde ein NB-Schüttelkolben mit 200 - 250 mL Nährmedium gefüllt und autoklaviert (20 min bei 121 °C). Ein 1 cm² großer Ausschnitt einer bewachsenen Agarplatte wurde in diesen Kolben überführt und mit einem Ultra-Turrax[®] Stab homogenisiert. Das Kulturgut wurde anschließend bei Raumtemperatur in einem Schüttelschrank für ca. 7 d inkubiert, bis ausreichend Mycelkugeln für die Inokulation der Hauptkultur zur Verfügung stand.

Vorkulturen von *A. niger* wurden durch sterile Zugabe einer Sporen-Kryokultur mit einer Zielkonzentration von $5 \cdot 10^5$ Sporen/mL angeimpft. Der Kolben wurde anschließend über Nacht in einem Schüttelschrank unter den jeweiligen Messbedingungen inkubiert. Die Messbedingungen sind Tabelle 4.15 (S. 93) zu entnehmen.

C3.4 Schüttelkolbenkultivierungen zur online-Überwachung

Für die Überwachung einer Schüttelkolbenkultivierung wurde das autoklavierte Nährmedium in einem 500 mL-Kolben vorlegt und mit einer sterilen Glucoselösung auf eine zuvor definierte Glucosekonzentration eingestellt. Die Inokulation der Hauptkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen entweder direkt aus einer Kryokultur (200 µL Kryokultur auf 100 mL Medium) oder durch Zugabe von 10% des Füllvolumens einer vorher erstellten Vorkultur (Abschnitt C3.1, oben). Schüttelkolbenkultivierungen wurden unter vorgegebenen Parametereinstellungen überwacht (Tabelle 4.9, S. 76 und Tabelle 4.12, S. 80). Die Probennahmen zur offline-Analytik erfolgten in allen Kultivierungen unter sterilen Bedingungen; bei Bakterien und Hefen mit einem Intervall von 60 min sowie bei mycelbildenden Kulturen zwei offline-Proben pro Tag.

C4 Analytische Methoden

C4.1 Bestimmung der Zelldichte durch Trübungsmessung

Die offline-Bestimmung der optischen Dichte erfolgte durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm in einem Zweistrahl-Spektralphotometer. Aus dementsprechenden Messkolben wurde eine offline-Probe entnommen und in einer Einwegküvette mit 0,9% (w/v) NaCl-Lösung (Saline) auf ein Volumen von 1.000 µL aufgefüllt. Die benötigte Verdünnung wurde zuvor gemäß [23] berechnet. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur gegen das Verdünnungsmedium (Saline) als Referenz, um einen konstanten Nullwert zu gewährleisten. Es wurden für jede offline-Probennahme

drei voneinander unabhängige Verdünnungen durchgeführt. Die Ermittlung des Verdünnungs- und Gerätefehlers erfolgte über die Standardabweichung.

C4.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung des Zelltrockengewichts wurden jeweils 2 mL Probe aus dem entsprechenden Schüttelkolben entnommen und in ein tariertes 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Gefäße wurden hierfür vor der Ermittlung der Leergewichte im Trockenschrank vorgetrocknet und im Exsikkator abgekühlt. Die Suspension wurde anschließend 5 min (Hefen), 6 min (*L. zeaе*), 8 min (*E. coli*) bei 13.000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet einmal mit 0,9% (w/v) NaCl-Lösung gewaschen. Für weitere Analytiken wurde der Überstand eingefroren. Das gewaschene Pellet wurde über Nacht im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet.

Bei der Bestimmung der Biotrockenmasse mycelbildender Kulturen wurde diese Vorgehensweise verändert. Die gravimetrische Bestimmung von *A. niger* erfolgte über die Entnahme von je 2 mL Kulturbrühe und Überführung in ein tariertes Reaktionsgefäß in Doppelbestimmung. Es wurde darauf geachtet, dass die gebildeten Mycelkugeln gleichmäßig verteilt vorlagen. Für weitere offline-Analysen erfolgte die Entnahme von abgezählten Mycelkugeln, aus denen das arithmetische Mittel berechnet wurde. Das weitere Vorgehen entsprach homogener Kulturen (s.o.).

Für die Biotrockenmassebestimmung von *F. velutipes* wurden die verwendeten Parallelkolben vor Beginn der Kultivierung tariert und während der Kultivierungen zeitlich versetzt eingefroren. Die Abtrennung des Mediums erfolgte über Lyophilisation. Das weitere Vorgehen entsprach homogener Kulturen (s.o.).

C4.3 Biomassegewinnung

Für die Biomassegewinnung wurden das Kulturgut in 50 mL-Reaktionsgefäßen gesammelt und die Zellen mit Hilfe einer Zentrifuge vom Medium abgetrennt. Das Zentrifugieren erfolgte bei Hefezellen (*S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *P. pastoris*) mit 2.000 xg für 10 min, bei Bakterien (*E. coli* K12, *L. zeaе*) bei 2.500 xg für 15 min. Die abgetrennten Zellen wurden einmal mit jeweils 50 mL 0,9% (w/v) NaCl-Lösung (Saline) gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet bei 4°C gelagert, bis genug Zellen für die Experimente zur Verfügung standen.

C4.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellgesamtkonzentration pro Milliliter wurde eine Thoma-Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,02 mm verwendet. Mit einer 20x Vergrößerung wurden pro zu untersuchende Probe zwei Bilder (1280 x 960 Pixel) derselben Verdünnung aufgenommen und ausgezählt. Die Proben wurden mit 0,9% (w/v) NaCl-Lösung derart verdünnt, dass sich in einem Großquadrat ca. 50 – 100 Zellen befanden. Zur Zellzahlbestimmung wurde der Mittelwert der ermittelten Zellen aller Großquadrate berechnet. Verdünnungsschritte wurden bei der Berechnung der Zellkonzentration berücksichtigt. Das Auszählen der Zellen erfolgte entweder händisch oder über das Bildverarbeitungsprogramm *ImageJ* in Kombination mit dem in [67] entwickelten Algorithmus zur Objektdetektion. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit erfolgte eine Doppelbestimmung und Bildung der Standardabweichung.

C4.5 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration erfolgte als amperometrische Messung im Schnelltest mit Hilfe des Analysator 2700 Select von Yellow Springs Instruments, Ohio, USA. Zunächst wurden die Zellen entsprechend Abschnitt C4.3 (oben) vom Medium abgetrennt und mit deionisiertem H₂O auf eine geschätzte Konzentration von < 1,8 g/L Glucose verdünnt. Das Substrat wird stöchiometrisch durch das auf einer Membran immobilisierte Enzym Glucose-Oxidase zu H₂O₂ umgesetzt. Dieses diffundiert durch die poröse Membran und wird an einer Platinelektrode zu Sauerstoff oxidiert. Der hierbei entstehende elektrische Strom steigt proportional mit zunehmender Glucosekonzentration. Zur Verifizierung der Messdaten wurden je drei voneinander unabhängigen Verdünnungen durchgeführt und separat gemessen. Die Ermittlung des Verdünnungs- und Gerätefehlers erfolgte über die Standardabweichung.

C5 Kalibrationsmethoden

C5.1 Konventionelle Kalibrationsmethode

Die Erstellung von Kalibrationen auf konventionelle Art erfolgt über die logische Verknüpfung einer offline-Probe während eines laufenden Bioprozesses mit einem zeitlich passenden digital gefilterten online-Signal. Das Streulichtsignal wird mit Hilfe eines Medianfilters, verwendet als kontinuierlicher Rückwärtsfilter, und Fensterbreite 45 (bzw. 89 für mycelbildende Kulturen) gebildet. Abhängig vom Verhalten der Kultur

ist für schaumreduzierte Bioprozesse der verbesserte erste online-Wert nach der Probennahme zu verwenden (Abschnitt 4.3.2, S. 68f.). Neigt die Kultur zu starker Schaumbildung oder handelt es sich um eine heterogene Kultur, muss der letzte Messwert vor der Probennahme für eine online-/offline-Wertepaarermittlung herangezogen werden. Für eine exakte Kalibration muss eine stetige Probennahme bestehen. Je mehr Wertepaare über den gesamten Zeitraum einer Kultivierung ermittelt werden, desto höher ist die Aussagekraft der Kalibration. Im Bereich geringer optischer Dichte überlagern Grenzflächenreflexionen das Streulichtsignal, so dass die Messgenauigkeit stark sinkt. Um eine möglichst genaue Vorhersage bieten zu können, wird für die Untergrenze der Kalibration der Mittelwert aus allen online-Signalen zuvor berechnet. Der Grenzwert ist der Zeitpunkt, ab dem die kontinuierliche Standardabweichung (Fensterbreite 45) einen konstanten Wert erreicht. Zur Sicherstellung der Kalibration muss die Wertepaarermittlung aus mehreren verschiedenen Kultivierungen gleicher Messparameter erfolgen.

C5.2 Kalibrationserstellung über sequenzielle Verdünnung

Bei der Kalibration über sequenzielle Verdünnung erfolgt die Messung eines definierten Volumens entsprechender Trübung. Die Kalibrationsmethode beruht ebenfalls auf die Ansammlung und Kombination einer Vielzahl verschiedener online-/offline-Wertepaare. Die Ermittlung des online-Signals erfolgt als Nachahmung eines Bioprozesses im Schüttelbetrieb. Es wird der Mittelwert aus 30 – 50 Messwerten gebildet. Als Verdünnungsmedium kann entweder 0,9% (w/v) NaCl-Lösung (Saline) oder das Nährmedium verwendet werden. Im ersten Fall werden die Zellen zunächst durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt, mit Saline gewaschen und anschließend in Saline resuspendiert und auf o.g. Volumen aufgefüllt. Ein direkter Vergleich zwischen den Kalibrationsmethoden ist hierbei schwierig, da sich die Brechungsindices der Medien unterscheiden. Im zweiten Fall erfolgt die Verdünnung durch frisches Nährmedium. Bakterien müssen hierbei durch ein Bakteriostatikum, Hefezellen durch ein Fungistatikum in ihrer Zellteilung gehemmt werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der aus Abschnitt C5.1 (oben) ist die schnelle Kalibrationserstellung und die Einstellung genau definierter Trübungswerte (keine zeitliche Abhängigkeit der Trübung).

C6 Statistische Analysen

Zur Bewertung der ermittelten Messergebnisse wurden statistische Analysendurchgeführt. Diese erfolgten durch unten vorgestellte Werkzeuge der statistischen Fehlerberechnung.

C6.1 Statistische Grundlagen

Das arithmetische Mittel \bar{x} bezeichnet den durchschnittlichen Messwert einer Beobachtungsreihe. Der Mittelwert wird in dieser Arbeit eingesetzt, um die Abweichung vom Idealverhalten hervorzuheben und das Messrauschen des Streulichtensors zu charakterisieren. Er ist definiert als Quotient der Summe aller betrachteten Werte und deren Anzahl.

$$\text{Mittelwert } \bar{x}: \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \quad (\text{C6.1})$$

n: Anzahl der Messwerte

Der Median bezeichnet den Mittelpunkt einer Datenreihe. 50% der Werte liegen ober- und unterhalb dieses Zahlenwerts. Er wird von extrem abweichenden Werten praktisch kaum beeinflusst. Im Fall einer digitalen Datenfilterung wird die Angleichung einer Datenreihe ans Idealverhalten durch Ausreißer beeinträchtigt. In diesem Fall ist es sinnvoll, statt des arithmetischen Mittels den Medianwert zu verwenden.

Bei der Betrachtung des Streulichtverhaltens wird das Messrauschen durch die Standardabweichung σ beschrieben. Sie bezeichnet das Ausmaß streuender Werte um den Mittelwert. Die Standardabweichung besitzt die Dimension der betrachteten Werte. Sie ergibt sich aus der Wurzel der Varianz.

$$\text{Standardabweichung } \sigma_x: \quad \sigma_x = \sqrt{V(x)} \quad (\text{C6.2})$$

V: Varianz

Die Varianz beschreibt die Abweichung der tatsächlichen Messwerte vom arithmetischen Mittel aller Werte. Es wird die Streuung der Werte relativ zum Erwartungswert gemessen. Zudem erfolgt eine Gewichtung durch das Quadrat der Abweichungen abhängig von ihrer Wahrscheinlichkeit.

$$\text{Varianz } V(x): \quad V(x) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{C6.3})$$

x_i : Messwert

C6.2 Regressionsanalyse

Eine Aussage über die Güte einer Regressionsgerade kann über den quadratischen Korrelationskoeffizienten R^2 gemacht werden. Er verdeutlicht das Ausmaß der Varianz aller Variablen durch die Modellbildung. Beim linearen Bestimmtheitsmaß handelt es sich um einen relativen Wert zwischen 0 und 1. Hierbei beschreiben 100% einen perfekten linearen Zusammenhang. Anwendung findet die Regressionsanalyse mittels R^2 in den vorgestellten experimentellen Arbeiten nur bei linearen Beziehungen (Triggerwinkelabhängigkeit von der Schüttelfrequenz, Abschnitt 4.2.1, S. 41f.).

Die Güte der Anpassung von nicht linearen Ausgleichsfunktionen wurde mit Hilfe der Minimierung des χ^2 -Fehlers durch OriginLab[®] bewertet. Die Software nutzt den Levenberg-Marquardt-Algorithmus zur Bestimmung der Funktionsparameter. Es handelt sich um eine relative Größe. Je kleiner der χ^2 -Fehler einer nicht linearen Regression ist, desto genauer erfolgt die Anpassung ans Modell [69].

C6.3 Validierung von Kalibrationen

Wie gut ein erstelltes Modell die tatsächlichen offline-Werte vorhersagen kann, wird durch die in Abschnitt C6.2 (oben) vorgestellten Werkzeuge (R^2 und χ^2) beschrieben. Eine Validierung dieser Modelle erfolgt durch sog. Validierungskultivierungen. Hierbei handelt es sich um Kultivierungen gleicher Messparameter, die abseits der Modellbildung durchgeführt wurden. Es werden somit von der Kalibration unabhängige online-/offline-Wertepaare erhalten. Die online-Messwerte lassen sich durch die Kalibration in eine entsprechende Basisgröße umrechnen. Die Summe aller quadrierten Differenzen von Modell- und Messwert ergibt die Fehlerquadratsumme (FQS). Aus der FQS kann der absolute Fehler (RMSEP) ermittelt werden. Er wird aus der Wurzel der Summe aller Fehlerquadrate bezogen auf die Anzahl Messwerte erhalten. Die Dimension entspricht somit der Basisgröße.

$$\text{Fehlerquadratsumme FQS: } \text{FQS} = \sum_{i=1}^n (f(x_i) - y_i)^2 \quad (\text{C6.4})$$

y_i : Messwert der Basisgröße

$$\text{Absoluter Fehler RMSEP: } \text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\text{FQS}}{n}} \quad (\text{C6.5})$$

Die Bewertung der Genauigkeit einer Kalibration kann ebenfalls über eine prozentuale Aussage der durchschnittlichen Messabweichung erfolgen. Dieser relative Fehler ist wie folgt definiert.

$$\text{Relativer Fehler:} \quad \text{Fehler [\%]} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\sqrt{(f(x_i) - y_i)^2}}{f(x_i)} \cdot 100 \right) \quad (\text{C6.6})$$

Über die Nachweisgrenze LOD (limit of detection) wird die untere Grenze einer Kalibration beschrieben, die gerade noch einen zuverlässigen Nachweis gewährleistet. Die Unterschreitung eines vorgegebenen Konfidenzintervalls führt zu einer erhöhten Messungenauigkeit. Die LOD ergibt sich aus der Summe des arithmetischen Mittels und der dreifachen Standardabweichung der kontinuierlichen Messung.

$$\text{Nachweisgrenze LOD:} \quad \text{LOD} = \bar{x} + 3 \cdot \sigma_x \quad (\text{C6.7})$$

C6.4 Verwendete Funktionen zur Kalibrationserstellung

Im Rahmen der vorgestellten Kalibrationen wurden unterschiedliche Ausgleichs- und Anpassungsfunktionen verwendet.

$$\text{BELEHRADEK} \quad f(x, a, c, b, c) = a(x - b)^c \quad (\text{C6.8})$$

$$\text{BLEASDALE-NELDER} \quad f(x, a, b, c) = (a + bx)^{-\frac{1}{c}} \quad (\text{C6.9})$$

$$\text{Logarithmische Funktion} \quad f(x, a, b, c) = a - b \ln(x + c) \quad (\text{C6.10})$$

$$\text{Logistische Funktion} \quad f(x, a, b, c, d) = \frac{a - b}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^d} + b \quad (\text{C6.11})$$

$$\text{Polynomische Funktion} \quad f(x, a, b, c, d, e) = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4 \quad (\text{C6.12})$$

Tabelle C.3: Anpassungsfunktionen für schaumabhängige Kultivierungen mit Parametern. Durch die Kalibrationen ist eine Umrechnung des Sensorsignals in die Basisgröße OD₆₀₀ möglich. Die Verwendung gleicher Kultivierungsparameter ist erforderlich.

Spezies	Funktionstyp	Kalibration	χ^2	R^2
<i>L. zaeae</i>	BELEHRADEK	$f(x) = 0,0298 \cdot (x - 1,048,9547)^{0,5997}$	0,0261	0,9956
<i>K. marxianus</i>	BELEHRADEK	$f(x) = 0,1300 \cdot (x - 2,874,2742)^{0,5235}$	1,2966	0,9707
<i>E. coli</i> K12	BELEHRADEK	$f(x) = 0,2386 \cdot (x - 2,363,8475)^{0,4314}$	0,1789	0,9898
<i>S. cerevisiae</i>	BELEHRADEK	$f(x) = 0,0022 \cdot (x - 1,876,4161)^{0,9378}$	0,3253	0,9629
<i>P. pastoris</i>	Logistisch	$f(x) = \frac{(-6,6273) - 23,7268}{1 + \left(\frac{x}{11,091,8178}\right)^{3,1362}} + (-6,6273)$	0,9322	0,9862

Tabelle C.4: Anpassungsfunktionen für schaumunabhängige Kultivierungen mit Parametern. Durch die Kalibrationen ist eine Umrechnung des Sensorsignals in die Basisgröße OD₆₀₀ möglich. Die Verwendung gleicher Kultivierungsparameter innerhalb einer Spezies ist erforderlich.

Spezies	Funktionstyp	Kalibration	χ^2	R^2
<i>B. megaterium</i>	BELEHRADEK	$f(x) = 1,2562 \cdot (x - 1.466,9916)^{0,2791}$	0,6960	0,9744
<i>S. cerevisiae</i>	BLEASDALE-NELDER	$f(x) = (-10,2077 + 0,0077x)^{\frac{1}{1,5644}}$	0,3856	0,9918
<i>K. marxianus</i>	BLEASDALE-NELDER	$f(x) = (-36,1437 + 0,0247x)^{\frac{1}{1,9123}}$	0,2607	0,9957
<i>P. pastoris</i>	BLEASDALE-NELDER	$f(x) = (-11,1041 + 0,0080x)^{\frac{1}{1,6153}}$	0,3919	0,9920
<i>E. coli</i> K12	BELEHRADEK	$f(x) = 0,0105 \cdot (x - 1.059,7351)^{0,8084}$	0,5500	0,9961
<i>L. zeae</i>	BELEHRADEK	$f(x) = 0,1074 \cdot (x - 2.226,4444)^{0,4591}$	0,0495	0,9894

Tabelle C.5: Anpassungsfunktionen für schaumunabhängige Kultivierungen mit Parametern. Durch die Kalibrationen ist eine Umrechnung des Sensorsignals in die Basisgröße BTM möglich. Die Verwendung gleicher Kultivierungsparameter innerhalb einer Spezies ist erforderlich.

Spezies	Funktionstyp	Kalibration	χ^2	R^2
<i>B. megaterium</i>	BELEHRADEK	$f(x) = 0,0181 \cdot (x - 928,6833)^{0,66372}$	0,0080	0,9943
<i>S. cerevisiae</i>	BLEASDALE-NELDER	$f(x) = (-1,8699 + 0,0015x)^{\frac{1}{1,7609}}$	0,1591	0,9592
<i>K. marxianus</i>	BLEASDALE-NELDER	$f(x) = (-2,3254 + 0,0016x)^{\frac{1}{1,9221}}$	0,0115	0,9962
<i>P. pastoris</i>	BLEASDALE-NELDER	$f(x) = (-1,1748 + 0,0008x)^{\frac{1}{1,6430}}$	0,0193	0,9927
<i>E. coli</i> K12	BELEHRADEK	$f(x) = 0,0171 \cdot (x - 1.893,7427)^{0,5556}$	0,0774	0,7893
<i>L. zeae</i>	BELEHRADEK	$f(x) = 0,0755 \cdot (x - 2.346,1792)^{0,3491}$	0,0128	0,9479

Tabelle C.6: Anpassungsfunktionen für schaumunabhängige Kultivierungen mit Parametern. Durch die Kalibrationen ist eine Umrechnung des Sensorsignals in die Basisgröße ZZ möglich. Die Verwendung gleicher Kultivierungsparameter innerhalb einer Spezies ist erforderlich.

Spezies	Funktionstyp	Kalibration	χ^2	R^2
<i>E. coli</i> K12	Logarithmisch	$f(x) = -0,13 \cdot 10^6 + 1,83 \cdot 10^4 \cdot \ln(x + 307,15)$	$2,17 \cdot 10^6$	0,9887
<i>L. zeae</i>	Logarithmisch	$f(x) = -2,60 \cdot 10^4 + 0,39 \cdot 10^4 \cdot \ln(x - 1.210,18)$	$1,07 \cdot 10^5$	0,9893
<i>B. megaterium</i>	Logarithmisch	$f(x) = 335,69 + 119,26 \cdot \ln(x - 1.466,93)$	3.035,89	0,9917
<i>P. pastoris</i>	Polynomisch	$f(x) = -649,65 + 0,62x - 5,78 \cdot 10^{-5}x^2 + 2,41 \cdot 10^{-9}x^3 - 3,34 \cdot 10^{-14}x^4$	15.791,31	0,9804
<i>K. marxianus</i>	Logarithmisch	$f(x) = -2.052,85 + 376,10 \cdot \ln(x + 1.199,87)$	11.256,66	0,9684
<i>S. cerevisiae</i>	Logarithmisch	$f(x) = -4.115,60 + 532,02 \cdot \ln(x - 1.055,43)$	1.482,75	0,9879

Tabelle C.7: Anpassungsfunktionen für mycelbildende Kulturen mit Parametern. Durch die Kalibrationen ist eine Umrechnung des Sensorsignals in die Basisgröße BTM möglich. Die Verwendung gleicher Kultivierungsparameter innerhalb einer Spezies ist erforderlich.

Spezies	Funktionstyp	Kalibration	χ^2	R^2
<i>A. niger</i>	Logarithmisch	$f(x) = -47,03 + 5,80 \cdot \ln(x + 2.938,10)$	2,3534	0,8370
<i>F. velutipes</i>	Logarithmisch	$f(x) = -335,03 + 30,14 \cdot \ln(x + 65.774,77)$	0,8739	0,9375

D Material

D1 Lösungen und Kulturmedien

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Suspensionslösungen und Kulturmedien vorgestellt.

Tabelle D.1: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien. Nach vollständigem Auflösen der Bestandteile in je 1.000 mL deionisiertem Wasser werden die Kulturmedien für 30 min bei 121 °C autoklaviert. Die Zugabe der Kohlenstoffquelle erfolgt über einen Sterilfilter nachdem die Medien abgekühlt sind.

	FM [g/L]	LB [g/L]	MM [g/L]	MRS [g/L]	SNL [g/L]	TB ¹ [g/L]	YM [g/L]
Hefeextrakt		5		5	3	24	3
Malzextrakt							3
Sojapepton	10						5
Trypton		10		10		12	
D-Glucose	20	10 – 12		20	30		10
L-Asparagin					4,5		
Glycerol						4 mL	
NaCl		10					
Natriumacetat				5			
NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	1						
KH ₂ PO ₄	1		3		1,5		
K ₂ HPO ₄			5,64	2			
NH ₄ SO ₄	5		2				
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2		0,1	0,2	0,5		
MnSO ₄ ·H ₂ O				0,05			
Citronensäure				1,58			
tri-Natriumcitrat H ₂ O			0,2				
Vitamin-Stammlsg.				5 mL			
Spurenelement-Lsg.					1 mL		
Kaliumphosphat-Puffer ¹						10%	
TEGO [®] AF KS 911 (nach Bedarf)	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	-	200 µL	200 µL
pH	6,0	7,2	7,2	6,5	6,0	7,4	6,2

¹ Die Pufferlösung wird separat gelöst und autoklaviert. Hierzu werden 2,31 g KH₂PO₄ und 12,54 g K₂HPO₄ in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst.

Tabelle D.2: Zusammensetzung der Vitamin-Stammlösung für MRS-Medium. Alle Substrate werden steril filtriert in die Lösung überführt.

Substanz	Konzentration [mg/L]
Biotin	2
Folsäure	2
Pyridoxin-HCl	10
Thiamin-HCl · 2H ₂ O	5
Riboflavin	5
Nicotinsäure	5
D-Ca-Pantothenat	5
Vitamin B12	0,1
<i>p</i> -Aminobenzoesäure	5
Liponsäure	5

Tabelle D.3: Zusammensetzung der Spurenelement-Lösung für SNL-Medium. Alle Substrate werden steril filtriert in die Lösung überführt.

Substanz	Konzentration [mg/L]
FeCl ₃ · 6H ₂ O	80
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	90
MnSO ₄ · H ₂ O	30
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5
Titriplex [®] III (EDTA)	400

D1.1 Herstellung einer Formazin-Standardlösung (ISO 7027)

Zur Herstellung des Kalibrationsstandards Formazin werden 10,0 g Hexamethylentetramin (C₂H₄N₂) in deionisiertem Wasser gelöst und auf 100 mL aufgefüllt. Weiterhin werden 1,0 g Hydrazinsulfat (N₂H₆SO₄) in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst. Beide Lösungen werden vermischt und unter dem Abzug für 24 h bei 25 ± 3 °C stehen gelassen. Aus der Lösung entsteht eine milchige Suspension mit einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 6,9. Sie kann zur Kalibration von Photometern verwendet werden und ist bei Lagerung im Dunkeln und Raumtemperatur bis vier Wochen haltbar. Die Formazin-Synthese verläuft in zwei Stufen. Zunächst reagiert C₂H₄N₂ mit Schwefelsäure (bereitgestellt durch N₂H₆SO₄), wodurch stöchiometrisch Formaldehyd gebildet wird. Der Formaldehyd reagiert im zweiten Reaktionsschritt unter Polymerisation zu Formazin.

D2 Chemikalienliste

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle D.4: Liste aller in der vorgestellten Arbeit verwendeten Chemikalien.

Substanz	Hersteller
Aceton, C ₃ H ₆ O	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Acetonitril, C ₂ H ₃ N	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Agar-Agar	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Ammoniumacetat, C ₂ H ₇ NO ₂	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
p-Aminobenzoesäure, C ₇ H ₇ NO ₂	Merck, <i>Darmstadt</i>
di-Ammoniumhydrogenphosphat, (NH ₄) ₂ HPO ₄	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Ammoniumsulfat, (NH ₄) ₂ SO ₄	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Ampicillin, C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Biochrom, <i>Berlin</i>
L-Asparagin, C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Biotin, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	Biochrom, <i>Berlin</i>
Calciumchlorid, CaCl ₂ · 2H ₂ O	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Citronensäure, C ₆ H ₈ O ₇	Riedel de Haen, <i>Seelze</i>
Cobaltnitrat, Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Eisenchlorid, FeCl ₃ · 6H ₂ O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Eisensulfat, FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Essigsäure, C ₂ H ₄ O ₂	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Ethanol, C ₂ H ₆ O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Folsäure, C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	Biochrom, <i>Berlin</i>
Glasperlen 2,85 – 3,45 mm	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Glutamin, C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Biochrom, <i>Berlin</i>
D-(+)-Glucose, C ₆ H ₁₂ O ₆	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Glycerol, C ₃ H ₈ O ₃	AppliChem, <i>Darmstadt</i>
Harnstoff, CH ₄ N ₂ O	BASF, <i>Ludwigshafen</i>
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i> Roth, <i>Karlsruhe</i>
Hexamethylentetramin, C ₆ H ₁₂ N ₄	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Hydrazinsulfat, N ₂ H ₆ SO ₄	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Kaliumchlorid, KCl	Riedel de Haen, <i>Seelze</i>
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	AppliChem, <i>Darmstadt</i>
di-Kaliumhydrogenphosphat, K ₂ HPO ₄	AppliChem, <i>Darmstadt</i>
Kaliumhydroxid, KOH	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Kaliumnitrat, KNO ₃	VWR, <i>Darmstadt</i>
Kupfersulfat, CuSO ₄ · 5H ₂ O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Lactose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Liponsäure, C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	Merck, <i>Darmstadt</i>
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Magnesiumsulfat, MgSO ₄ · 7H ₂ O	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Malzextrakt	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Mangansulfat, MnSO ₄ · H ₂ O	Merck, <i>Darmstadt</i>
Methanol, CH ₄ O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Natriumacetat, C ₂ H ₃ NaO ₂	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Natriumchlorid, NaCl	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Natriumcitrat, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat, NaH ₂ PO ₄	Roth, <i>Karlsruhe</i>
di-Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Riedel de Haen, <i>Seelze</i>
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Natriumhydroxid, NaOH	Merck, <i>Darmstadt</i>
Natriumnitrat, NaNO ₃	Riedel de Haen, <i>Seelze</i>

Tabelle D.4.2: Liste aller in der vorgestellten Arbeit verwendeten Chemikalien (*Fortsetzung*).

Substanz	Hersteller
Natriumsulfit, Na ₂ SO ₃	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Nicotinsäure, C ₆ H ₅ NO ₂	Merck, <i>Darmstadt</i>
Phosphorsäure, C ₃ H ₈ O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Pluronic® F-68	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
2-Propanol	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Pyridoxin Hydrochlorid, C ₈ H ₁₁ NO ₃	Merck, <i>Darmstadt</i>
Riboflavin, C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	Merck, <i>Darmstadt</i>
Saccharose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Salzsäure, HCl	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>
Säugerzellkulturmedium TC-42	TeutoCell, <i>Bielefeld</i>
Sojapepton	Fluka, <i>Buchs</i> , Schweiz
Streptomycin, C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	Biochrom, <i>Berlin</i>
TEGO® AF KS 911	Evonik, <i>Essen</i>
Thiaminhydrochlorid, C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ NO ₄ OS	Merck, <i>Darmstadt</i>
Titriplex® III, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O	Merck, <i>Darmstadt</i>
Trypanblau, C ₃₄ H ₂₈ N ₉ O ₁₄ S ₄	Biochrom, <i>Berlin</i>
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Vitamin B12, C ₆₂ H ₈₈ CoN ₁₃ O ₁₄ P	Merck, <i>Darmstadt</i>
Vitamin B5, C ₉ H ₁₇ NO ₅	Merck, <i>Darmstadt</i>
Zinksulfat, ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Sigma-Aldrich, <i>Seelze</i>

D3 Geräteliste

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle D.5: Liste aller in der vorgestellten Arbeit verwendeten Geräte und Materialien.

Gerät/Material	Hersteller
Analysenwaage „AC 211 S“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Analysenwaage „Analytik AC 210S“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Analysenwaage „AT621 DeltaRange“	Mettler Instrumente AG, <i>Greifensee</i>
Analysenwaage „CP8201“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Analysenwaage „MC1 AC 210 S“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Wasseraufbereitungsanlage "Arium® 661 Ultrapure water system"	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Autoklav "Systec V-150"	Systec GmbH, <i>Wettenberg</i>
Einkanal-Pipette „Reference“® (div. Größen)	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Einkanal-Pipette „Research“® (div. Größen)	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Einkanal-Pipette „Transferpette“® S (div. Größen)	Brand GmbH & Co. KG, <i>Wertheim</i>
Glasflaschen SCHOTT Duran® (div. Größen)	Schott AG, <i>Mainz</i>
Glucosemessgerät „YSI 2300 Start plus“	YSI Incorporated, Brannum Lane, <i>Yellow Springs</i> , Ohio, USA
Glucosemessgerät „YSI 2700 Select“	YSI Incorporated, Brannum Lane, <i>Yellow Springs</i> , Ohio, USA
Highspeed-Kamera „Exilim EX-FH20“	Casio Computer Co. Ltd., <i>Tokyo</i> , Japan
HPLC-Röhrchen	Techlab GmbH, <i>Erkerode</i>
Inkubationshaube „Certomat® H“	B. Braun Biotech International GmbH, <i>Melsungen</i>

Tabelle D.5: Liste aller in der vorgestellten Arbeit verwendeten Geräte und Materialien (*Fortsetzung*).

Gerät/Material	Hersteller
Inkubationsschüttler „KS 4000 ic control“	IKA® –Werke GmbH & Co. KG, <i>Staufen</i>
Inkubator „CH-4015“	INFORS AG, <i>Basel</i> , Schweiz
Inkubator „HERAcell 240 CO2 Incubator“	Thermo Electron Corp., <i>Waltham</i> , MA, USA
Messzylinder, 25 ml	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, <i>Bremen</i>
Multisensorplattform „Shake Flask Reader“	Precision Sensing GmbH, <i>Regensburg</i>
Optischer Filter „Calflex™ C“	Linios Photonics AG, <i>Göttingen</i>
Optischer Filter "OG590"	Schott AG, <i>Mainz</i>
Oszilloskop "RedHand Scope 20MHz"	Meilhaus Electronic GmbH, <i>Puchheim</i>
Parafilm® M	American National Can Group, <i>Chicago</i> , USA
Petrischalen, 94 mm, Kunststoff	Greiner Bio-One GmbH, <i>Frickenhausen</i>
Phasenkontrastmikroskop „BX41“	Olympus, <i>Hamburg</i>
pH-Elektrode „InLab422“	Mettler Toledo, <i>Greifensee</i> , Schweiz
pH-Meter	Deutsche Metrohm GmbH, <i>Filderstadt</i>
pH-Meter „HI 211“	Hanna Instruments, <i>Kehl am Rhein</i>
pH-Meter „pH522“	WTW GmbH, <i>Weilheim</i>
Photometer „Cary 50“	Varian, <i>Darmstadt</i>
Photometer „Spectrophotometer UVIKON 922“	Kontron Instruments GmbH, <i>Düsseldorf</i>
Photometerküvetten (1.000 µL, 1 cm Dicke, Kunststoff)	Sarstedt AG & Co., <i>Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Pipettierhelfer „accu-jet pro®“	Brand GmbH & Co. KG, <i>Wertheim</i>
Reaktionsgefäße 10 mL/50 mL	Corning Inc., <i>Corning</i>
Reaktionsgefäße 10 mL/50 mL	Greiner Bio-One GmbH, <i>Frickenhausen</i>
Reaktionsgefäße, 1 mL/2 mL/15 mL/50 mL	Sarstedt AG & Co., <i>Nümbrecht</i>
Sauerstoffmessgerät „Fibox 3 LCD trace“	Precision Sensing GmbH, <i>Regensburg</i>
Schlauchpumpe „IPC ISM930C, Ismatec“	IDEX Health & Science GmbH, <i>Wertheim-Mondfeld</i>
Schüttelkolben mit vier/ohne Schikanen, PC, 125 mL/250 mL/500 mL/1.000 mL	Corning Inc. <i>Corning</i>
Schüttelkolben, vier Schikanen, Duran®, 500 mL	Schott AG, <i>Mainz</i>
Schüttelschrank, Certomat® BS-1	B. Braun Biotech International GmbH, <i>Melsungen</i>
Serologische Pipetten, Stripette®, 1 – 50 mL	Corning Inc., <i>Corning</i>
Sterilbank „MSC-Advantage 1.2“	Thermo Fisher Scientific Inc., <i>Waltham</i> , MA, USA
Sterilbank „Herasafe®“	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, <i>Bonn</i>
Sterilfilter 0,2 µm PTFE "Midisart®"	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Sterilfilter 0,2 µm PTFE "Minisart®"	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Sterilfilter 0,2 µm "Minisart®"	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Thermoschüttler	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Tischschüttler "Sky Line Shaker DOS-10M"	ELMI Ltd., <i>Riga</i> , Lettland
Tischschüttler „Certomat® SI“	B. Braun Biotech International GmbH, <i>Melsungen</i>
Tischschüttler „Certomat® SII“	Sartorius Stedim Biotech, <i>Göttingen</i>
Trockenschrank "BK 5060 E"	Heraeus Holding GmbH, <i>Hanau</i>
Ultraschallreiniger „Sonorex Super RK 510 H“	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, <i>Berlin</i>
Vortex Mixer "Whirlmixer"	FISION Scientific Co., <i>Samjeong-Dong</i>
Wasserbad „WNB 14“	Memmert GmbH & Co. KG, <i>Schwabach</i>
Zellzähler "Cellometer® Auto T4 Cell Counter"	Nexcelom Bioscience LLC, <i>Lawrence</i> , MA, USA
Zentrifuge „Centrifuge 5415 R“	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Zentrifuge „Centrifuge 5702“	Eppendorf AG, <i>Hamburg</i>
Zentrifuge „Metafuge® 1.0 RS“	Heraeus Instruments GmbH, <i>Osterode</i>
Zentrifuge „Multifuge® 3S“	Heraeus Instruments GmbH, <i>Osterode</i>
Zentrifuge „Pico Heraeus“	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, <i>Bonn</i>

E Kooperierende Arbeiten

Die vorgestellten Arbeiten entstanden im Rahmen des drittmittelfinanzierten Forschungsprojekts „ZIM-Koop“ des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie in Kooperation mit Industriepartner PreSens GmbH (Regensburg).

Die Konstruktion des Prototyps und die Entwicklung der Softwareoberfläche entstanden nach Beratung mit dem Autor durch den Industriepartner.

Im Rahmen des Gesamtprojekts wurde ein Teil der praktischen Arbeiten für eine studentische Abschlussarbeit zur Verfügung gestellt. Die Tätigkeiten hierzu entstanden nach Vorgabe von und in Zusammenarbeit mit dem Autor. Die beteiligten Personen wurden ggf. im Text erwähnt. Eine Auflistung der unterstützenden Tätigkeiten ist Tabelle E.1 zu entnehmen.

Tabelle E.1: Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt.

Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt	Beteiligte Personen
Konstruktion des Multisensorprototyps	M. Findeis, PreSens GmbH, Regensburg
Entwicklung der Softwareoberfläche	M. Findeis, PreSens GmbH, Regensburg
Bildbearbeitende Auswertung der Highspeed-Videos	Dr. D. Solle, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Frequenzen der Schwingungsfunktionen im Oszilloskop	Dr. D. Solle, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
Praktische Arbeiten im Rahmen einer Masterarbeit <ul style="list-style-type: none"> • Medienuntersuchung • Kultivierungstätigkeiten mit Antischaummittel • Kalibrationen über seq. Verdünnung • Kultivierung mit zwei Kohlenstoffquellen 	C. Ude, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover

F Anhang: Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jörg Schmidt-Hager
Geburtsdatum	23. Juli 1981
Geburtsort:	Hannover

Schulbildung

08/1988 – 06/1992	Besuch der Grundschule Friesenschule in Hannover
08/1992 – 06/1994	Besuch der Orientierungsstufe Lürerstraße in Hannover
08/1994 – 06/2001	Besuch des Gymnasiums Sophienschule in Hannover
06/2001	Abitur (Allgemeine Hochschulreife; Note: <i>gut</i>)

Studium

10/2002 – 12/2009	Diplomstudiengang Chemie , Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Schwerpunkt: Technische Chemie; Note: <i>gut</i>
05/2009 – 12/2009	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper, Thema: Online-Monitoring der optischen Dichte an Schüttelkolbenkulturen (Note: <i>sehr gut</i>)
seit 04/2010	Doktorand am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper
07/2013	Promotion Chemie am Institut für Technische Chemie, Thema: Entwicklung und Optimierung eines Analysesystems zur online-Überwachung des Wachstums in geschüttelten Kulturen (<i>vorliegende Arbeit</i>)

Publikationen, Poster und Vorträge

- J. Schmidt-Hager, S. Beutel, M. Findeis, D. Andrzejewski, G. T. John, T. Scheper (09/2012); Optischer Online-Sensors zur Bestimmung des Wachstums in geschüttelten Kulturen (Vortrag, ProcessNet-Jahrestagung und 30. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Karlsruhe)
- J. Schmidt-Hager, S. Beutel, M. Findeis, D. Andrzejewski, G. T. John, T. Scheper (09/2012); Online-Method for biomass monitoring in shaking flask cultures (Posterbeitrag, 9th European Symposium on Biochemical Engineering Science; Istanbul/Türkei)
- J. Schmidt-Hager, S. Beutel, M. Findeis, D. Andrzejewski, G. T. John, T. Scheper (08/2012); Optischer Online-Sensor zur Bestimmung des Wachstums in geschüttelten Kulturen. CIT-Journal 2012, 84, No. 8, S. 1340.
- J. Schmidt-Hager, S. Beutel, M. Findeis, D. Andrzejewski, G. T. John, T. Scheper (05/2012); Nicht-invasive optische Streulichtmessung zur Bestimmung des Wachstums in geschüttelten Kulturen (Posterbeitrag, GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung „Biopharmazeutische Produktion“; Freiburg)
- J. Schmidt-Hager, S. Beutel, M. Findeis, D. Andrzejewski, G. T. John, T. Scheper (12/2011); Optischer Sensor zur Bestimmung des Wachstums in geschüttelten Kulturen (Posterbeitrag, 10. Dresdner Sensor Symposium; Dresden)