

Entwicklung einer universellen Bypass-
Messkammer und Automatisierungsplattform
für die Überwachung und Regelung von
Tierzellkultivierungen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Tim Henrik Lücking

geboren am 26.06.1986 in Lübbecke

2015

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann

Weiterer Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Dirk Lütkemeyer

Tag der Promotion: 08.06.2015

Kurzfassung

Heute hergestellte biotechnologische Produkte sind oft hochwertige Wirkstoffe für Human-Therapien. Viele Unternehmen nutzen Messtechnik für die Überwachung der Produktion, um somit die Qualität der Produkte sowie die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten. Mit Messtechnik können die Kultivierungen der produzierten Organismen genauer beobachtet und anhand der daraus gewonnenen Daten eine geeignete Regelung aufgebaut werden.

Die große Herausforderung besteht darin die Messtechnik in moderne Reaktorkonzepte zu integrieren. Für diesen Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit eine modulare Messkammer entwickelt, mit der Standard-Messtechnik flexibel an eine Vielzahl von Prozessen gekoppelt werden kann. Eine ebenfalls entwickelte Automatisierungsplattform steuert den Vorgang der Probenahme und der Messkammer-Analytik.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die bei 4 °C gelagerten Proben über einen Zeitraum von 72 Stunden nicht verändern. Die Überwachung von insgesamt sieben Kultivierungen in verschiedenen Maßstäben und Betriebsdauern hat die Machbarkeit und Sterilität bewiesen. Es war möglich detaillierte Kulturverläufe mit minimalem Aufwand zu erfassen. Ebenfalls konnte über die in zwei Messkammern verbaute Analytik, ein 2D-Fluoreszenz-Spektrometer und ein In situ Mikroskop, repräsentative Daten aus dem Prozess gewonnen werden. Über die entwickelte Automatisierungsplattform konnte eine Glukoseregulation eines *Fed-Batch*-Prozesses ermöglicht werden.

Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit 3D-gedruckte, individualisierte Bauteile für das Labor erprobt. Die additiven Fertigungsverfahren wurden neben der Messkammer-Konstruktion, auch für neue Konzepte von Verbrauchsmaterialien eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits heute verfügbare Technologien und Materialien biokompatible und sterilisierbare Bauteile ermöglichen, welche direkt im Labor eingesetzt werden können.

Stichwörter: Tierzellkultivierung; Messtechnik; Automatisierung; Regelung; 3D-Druck

Abstract

Present biotechnological products are often high-value drugs for human therapy. To ensure the quality of the products and the safety of the patients, more and more companies utilize process analytical technologies. Measuring techniques enable both the monitoring of the producing organisms and using this information in order to achieve a closed loop controlling.

Thereby, the challenge is the integration of the often well-established measuring systems into modern reactor concepts. For this purpose a modular measuring chamber was developed enabling an integration of multiple standard measuring sensors into a variety of processes. Within this thesis, the developed automation platform functions as a device for sample taking and controlling the measuring chamber analytics.

It could be shown that the common analytes can be stored at 4 °C over a period of 72 hours without any effect on their composition. The monitoring of altogether seven cultivations in different scales and different process strategies demonstrates the feasibility and sterility of the system. It was possible to obtain detailed data over the entire course of the cultivations with only minimal time requirements. Moreover, representative data were obtained from the analytics within the measuring chamber, a 2D-fluorescence spectrometer and an In situ microscope. The developed automation platform has been successfully used for achieving a glucose controlled fed-batch process.

Furthermore, 3D-printed and thus individual labware were created and tested within this thesis. Additive manufacturing was used for the construction of the measuring chamber and for new laboratory consumables. It could be shown that nowadays available technologies and materials enable biocompatible and serializable parts which can be directly used in a laboratory.

Keywords: mammalian cell cultivation; measurement technology; Automation; controlling; 3D-printing

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Additive Manufacturing	5
2.1 Theorie des <i>Additive Manufacturing</i>	5
2.1.1 <i>Fused Deposition Modeling</i>	5
2.1.2 <i>Selective Laser Sintering</i>	7
2.2 Weitere Additive Manufacturing Verfahren.....	9
2.2.1 Flüssiges Ausgangsmaterial.....	9
2.2.2 Pulver als Ausgangsmaterial	11
2.2.3 Festes Ausgangsmaterial	12
2.2.4 Gasförmiges Ausgangsmaterial	13
2.2.5 Zusammenfassung der gezeigten AM-Verfahren	13
2.3 Vorteile des <i>Additive Manufacturing</i>	14
3. Entwicklung einer Bypass-Messkammer	18
3.1 Konstruktion der Messkammer	19
3.1.1 Sterilkonstruktion	20
3.1.2 Modulares Prinzip der Messkammer	21
3.1.3 Auslegung der Messkammer für Standard-Sonden.....	22
3.1.4 Anpassungen an unterschiedliche Messprinzipien	24
3.2 Anwendungsbeispiele	28
3.2.1 Messungen der Sauerstoffaufnahme im Bypass.....	28
3.2.2 Rekalibrierung eines Systems.....	28
3.2.3 <i>Continuous Manufacturing</i>	28
4. Automatisierung der Probenahme und Bypass-Analytik	30
4.1 Stand der Technik der automatisierten Probenahmen	30
4.2 Konzept und Ablauf der neu entwickelten Probenahme	32
4.3 Bauteile der Probenahme	34
4.3.1 Automatisierungsplattform	34
4.3.2 Spritzenpumpe für kontaktlosen Proben transport.....	37
4.3.3 Magnetventile für die Flüssigkeitsführung.....	37
4.3.4 Autosampler als Probensammler	37
4.3.5 Flüssigkeitssensor	38

4.3.6	Gewährleistung der Sterilität.....	38
4.4	Reaktorspezifische Probenahme-Ports.....	39
4.4.1	Probenahme im 2 Liter Glasreaktor	39
4.4.2	Probenahme im 15 Liter Edelstahlreaktor	40
5.	Ergebnisse und Diskussion	42
5.1	<i>Additive Manufacturing</i> für neue Konzepte in der Biotechnologie.....	42
5.1.1	Zellkultivierungen in Extraktionsmedium	42
5.1.2	Zellkultivierung in 3D-gedruckten 24er-Wellplatten.....	47
5.1.3	Diskussion und Zusammenfassung der Materialtests.....	48
5.2	Automatische Probenahme.....	50
5.2.1	Lagerstabilität von Zellkulturproben.....	50
5.2.1.1	Einfluss der gekühlten Lagerung auf die Zellen.....	50
5.2.1.2	Einfluss der gekühlten Lagerung auf die Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen.....	52
5.2.2	Prozessüberwachung mit der automatischen Probenahme	53
5.2.2.1	Perfusionskultivierung mit <i>Settler</i> -System im 2 Liter Maßstab.....	54
5.2.2.2	<i>Fed-Batch</i> -Kultivierung im 15 Liter Reaktor.....	61
5.2.2.3	Zusammenfassung und Diskussion der Kulturverläufe.....	65
5.3	Messkammer-Analytik.....	66
5.3.1	BioView-Messungen in einer Messkammer	68
5.3.1.1	Trend der Daten bei unterschiedlichen Kultivierungen	69
5.3.1.2	Optimierung der Messkammer	71
5.3.1.3	Vergleich der Messdaten zwischen Bypass- und <i>inline</i> Betrieb	73
5.3.2	In situ Mikroskop-Messungen in einer Messkammer.....	77
5.3.2.1	ISM-Messungen am 2 Liter Reaktor	79
5.3.2.2	ISM-Messungen am 15 Liter Reaktor.....	80
5.3.3	Zusammenfassung und Diskussion der Messkammer- Analytik.....	81
5.4	Glukose-Regelung im 15 Liter Reaktor durch Einsatz der Automatisierungsplattform	84
5.4.1	Theorie des Glukose-Reglers.....	84

5.4.2	Glukoseverlauf während einer geregelten Kultivierung	85
5.4.3	Zusammenfassung und Diskussion der Glukoseregulung	87
6.	Zusammenfassung und Ausblick.....	88
7.	Literatur.....	94
8.	Anhang.....	103
8.1	Material.....	103
8.1.1	Materialien für die Reaktorkultivierungen.....	103
8.1.2	Materialien und Bauteile für den <i>SampleTaker</i>	104
8.1.3	Materialien für den 3D-Druck und die Materialtests.....	105
8.2	Methoden.....	106
8.2.1	Reaktorkultivierungen.....	106
8.2.1.1	Vorkultur	106
8.2.1.2	2 Liter Reaktorkultivierung.....	106
8.2.1.3	15 Liter Reaktorkultivierung.....	107
8.2.2	Analytik der Zellkulturproben.....	108
8.2.2.1	Lagerstabilität der Zellkulturproben	108
8.2.2.2	Manuelle Probenahme.....	108
8.2.2.3	Vorbereitung der automatisch entnommenen Proben.....	109
8.2.2.4	Nährstoff- und Metabolitkonzentrationsmessungen	109
8.2.2.5	Zellkonzentrationsmessungen	110
8.2.2.6	2D-Fluoreszenz-Spektren	111
8.2.2.7	In situ Mikroskop Aufnahmen.....	111
8.2.3	3D-Druck Experimente.....	111
8.2.3.1	Modellierung und Druck-Technologie	111
8.2.3.2	3D-Druck Rohmaterial und Herstellung der Extraktionsmedien.....	112
8.2.3.3	3D-gedruckte Wellplatten.....	112
8.2.3.4	Kultivierung und Testung der adhärennten Zellen...112	
8.2.3.5	Kultivierung und Testung der Suspensionszellen ..113	
8.2.3.6	CTB Zellviabilitäts-Assay	113
8.2.3.7	CytoTox-ONE™ homogener Membran- integritäts-Assay (LDH)	114

8.2.3.8	Zellzählung	114
8.3	Probenahme-Port 15 Liter Reaktor	115
8.4	Technische Zeichnungen der Messkammer-Module	116
8.5	Ergänzende Graphen	122
8.5.1	Lebend- und Gesamtzellkonzentration der Lagerstabilität....	122
8.5.2	Korrektur der Zellkonzentration 2 Liter Reaktor	122

Abkürzungen

2DF	Zweidimensionale-Fluoreszenz
3D	Dreidimensional
3DP	<i>3D Printing</i>
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol
AM	<i>Additive Manufacturing</i>
CAD	<i>computer aided design</i>
CE	<i>concurrent engineering</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CTB	<i>cell titer blue</i>
D	<i>dilution rate</i> (Verdünnungsrate) [d ⁻¹]
DLP	<i>Digital Light Processing</i>
EBM	<i>Electron Beam Melting</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ISM	In situ Mikroskop
LCVD	<i>Laser Chemical Vapor Deposition</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LENS	<i>Laser Engineered Net Shaping</i>
LOM	<i>Laminated Object Manufacturing</i>
MIR	Mittleres Infrarot
<i>n</i>	natürliche Zahl
NADH/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
ND-Filter	Neutraldichte-Filter
NIR	Nahes Infrarot
OUR	<i>oxygen uptake rate</i>
PA	Polyamid
PA12	Polyamid 12

PA12 UV	UV-stabile Variante des Polyamid 12
PAT	Prozess Analysen Technologien
PG	Panzergewinde
PLA	Polylactide
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
R ²	Bestimmtheitsmaß
RMSE	<i>root-mean-square error</i>
RPT	<i>Rapid Prototyping</i>
Sacova	<i>safe coupling valve</i>
SE	<i>simultaneous engineering</i>
SGC	<i>Solid Ground Curing</i>
SIA	sequentielle Injektions Analytik
SIP	<i>steam in place</i>
SLA	Stereolithographie
SLS	<i>Selective Laser Sintering</i>
SMA	<i>Sub-Miniature-A</i>
STL	<i>surface tessellation language</i>
STR	<i>stirred tank reactor</i>
SU	<i>single use</i>
TCC	<i>total cell concentration</i>
TiAlN	Titanaluminiumnitrid
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
USP	U.S. Pharmacopeia
UV-Vis	<i>ultraviolet and visible (light)</i>
VCC	<i>viable cell concentration</i>

1. Einleitung und Zielsetzung

Der Wunsch vom ewigen und gesunden Leben ist ein uralter Menschheitstraum. Unsere Lebenserwartung ist in den letzten Jahrzehnten drastisch gestiegen und die moderne Medizin ermöglicht es uns eine immer bessere Lebensqualität bis in das hohe Alter aufrecht zu erhalten. Nicht nur die Änderungen der Lebensweise und die bessere Versorgung mit Nahrung hat unsere Lebenserwartung immer weiter steigen lassen. Vor allem Medikamente, welche die Medizin unterstützen und Leiden bekämpfen, sind einer der größten Faktoren für eine verbesserte Gesundheit. Mit zunehmendem Wissen über die Physiologie des Menschen ist es möglich Krankheiten besser vorzubeugen, zu erkennen und schlussendlich zu behandeln. Genau wie das Wissen über die Mechanismen von Krankheiten immer größer wird, muss auch das Wissen über die Herstellung der Medikamente stetig wachsen. Die Produktion von komplexen biologischen Wirkstoffen durch biotechnologische Verfahren ist ein Garant für eine effektivere Bekämpfung von ernsten Krankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf- oder Stoffwechsel-Erkrankungen.

Ein großes Thema der letzten Jahre ist die personalisierte Medizin. Ziel ist es einen Wirkstoff individuell auf eine Person zugeschnitten produzieren zu können. Die größte Hürde dieses zu realisieren sind die Kosten, die eine solche individuelle Produktion verursachen. Somit ist es für die Menschheit unabdingbar, dass die Produktionsprozesse effektiver und günstiger werden. Nur wenn diese Verfahren wirtschaftlich werden, können auch seltene Krankheiten mit Hilfe von Pharmazeutika bekämpft werden.

Die Produktion von biopharmazeutischen Wirkstoffen und anderen hochwertigen, rekombinanten Produkten unterliegen strengen regulatorischen Auflagen. Eine der wichtigsten Behörden in diesem Bereich ist die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). Prozesse, die einen biotechnologisch hergestellten Wirkstoff

als Zielprodukt haben, werden von dieser Behörde im amerikanischen Markt kontrolliert und autorisiert. Im Verlauf der Zulassungsverfahren werden dabei eine Vielzahl an Parametern des Prozesses definiert, welche der Qualitätskontrolle dienen und somit auch die Sicherheit der Patienten gewährleisten. Während der Vermarktung des Produktes müssen diese Grenzen und Toleranzen eingehalten werden. Dies bedeutet außerdem, dass eingesetzte Technologien nicht ohne erneute Behördenkontrolle ausgetauscht werden dürfen.

Um besonders die Prozessüberwachung dennoch modern zu halten und somit die Sicherheit weiter zu verbessern, hat die FDA die sogenannte PAT Initiative ins Leben gerufen. Diese Initiative unterstützt es, moderne Prozess Analysen Technologien (PAT) in Prozesse einzubinden wodurch der Prozess nicht nur besser überwacht, sondern auch geregelt werden kann. Hiermit soll es ermöglicht werden Abweichungen oder Prozessschwankungen durch die entsprechende Messtechnik zu erkennen und mit einer Regelung darauf zu reagieren. Durch eine geeignete Kombination aus Messtechnik und Regelung können Prozessgrenzen eingehalten werden, womit eine gleichbleibende Produktqualität gewährleistet wird.

Seit langem erfolgt bereits eine Regelung der Zellkulturprozesse auf Basis der Temperatur, des pH-Wertes sowie dem Partialdruck des gelösten Sauerstoffs (pO_2) im Bioreaktor. Diese etablierten Methoden müssen erweitert werden, um beispielsweise während der Kultivierung anhand spektroskopischer Messungen Rückschlüsse auf Nährstoff- oder Metabolitkonzentrationen tätigen zu können.

Die Auswahl, Integration und anschließende Etablierung geeigneter Analytik für den zu beobachtenden Trend während einer Kultivierung ist besonders wichtig. Zuerst muss ermittelt werden welche Analytik einen geeigneten Messwert ohne große zeitliche Differenz erzeugen kann. Je nach Organismus können in relativ kurzer Zeit große Änderungen im Prozess entstehen. Hierfür muss zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Prozessentwicklung eine große Anzahl an potentieller Messtechnik erprobt werden.

Während Edelstahlreaktoren für die Integration der Messtechnik standardisierte seitliche Anschlüsse besitzen, hat ein kleinerer Glasreaktor nur Deckelzugänge mit weitaus kleineren Dimensionen. Moderne Einwegreaktorsysteme besitzen gar keine Anschlüsse für Standard-Analytik. In der Prozessentwicklung werden

allerdings zuerst kleinvolumige Glas- oder Einwegreaktoren genutzt, in die komplexere Messtechnik aufgrund fehlender Anschlüsse nicht integriert werden kann. Aus diesem Grund kann die Integration und Datengenerierung für Prozessvorhersagen oft erst zu einem späteren Zeitpunkt der Prozessentwicklung in einem größeren Maßstab erfolgen.

Nach der Messtechnikintegration folgt die Etablierung bzw. Kalibrierung des Systems. Moderne Sensoren erzeugen eine große Menge an multivariaten Daten. Um aus diesen Daten Prozessinformationen zu erhalten, müssen viele Kalibrationspunkte aus unterschiedlichen Prozessen für eine Modellbildung verwendet werden.

Im Verlauf der Kultivierungen müssen für die Referenzwerte entsprechend viele Proben entnommen und auf den Zielanalyt hin analysiert werden. Dies bedeutet einen großen zeitlichen Aufwand, der aufgrund der anfangs genutzten Glas- oder Einwegreaktoren oftmals erst am Ende der Prozessentwicklung steht.

Die Voraussetzung einer hohen Probendichte für die Kalibrierung der multivariaten Daten verdeutlicht den Bedarf an einer automatischen Probenahme. Nur die Bereitstellung einer hohen Anzahl an Messpunkten ermöglicht es eine Kalibration für die Vorhersage von Prozessen mit der verwendeten Messtechnik zu realisieren.

Sobald aus der Analytik Informationen vorliegen und das System kalibriert ist, kann im nächsten Schritt der Regelkreis geschlossen werden. Dadurch kann eine Regellogik auf den Messwert reagieren und den Prozess durch beispielsweise Nachdosierung eines Stoffes beeinflussen. Die Regelung und die zugrundeliegenden Messwerte können dabei beliebig komplex werden.

Ein hoher Automatisierungsgrad in biotechnologischen Prozessen und damit die Möglichkeit eine höhere Effizienz und Produktivität zu erhalten, ist ein Weg die Kosten der Produktion von Wirkstoffen zu reduzieren. Hierfür wird eine Kombination von neuen Reaktor- und Messkonzepten benötigt.

Insbesondere bei der Entwicklung neuer Analytik und deren Integration in einen Prozess, kommen konstruktionstechnische Fragestellungen auf. Neben der klassischen Prototypenentwicklung, welche zumeist auf zerspanende Bearbeitung von Werkstoffen setzt, gibt es heutzutage auch eine Vielzahl an sogenannten additiven Herstellungsverfahren. Hierzu zählt vor allem das *Rapid Prototyping* (RPT)

bzw. *Additive Manufacturing* (AM) welches oft auch als 3D-Drucken bezeichnet wird. Dieser Überbegriff fasst viele unterschiedliche Methoden zusammen, die dem Zweck dienen erste einsetzbare Modelle in kürzester Zeit zu generieren. Somit wird die Entwicklungsgeschwindigkeit drastisch erhöht. Außerdem wird eine Verwendung des 3D-Drucks im Labor zukünftig die direkte Herstellung neuer und individueller Laborgeräte ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer universellen Messkammer, welche es ermöglicht bisherige Standard-Analytik mit den entsprechend genormten Bauformen auch an beliebige Reaktorkonzepte zu adaptieren. Hierbei soll eine Möglichkeit geschaffen werden nicht die Sonden selbst modifizieren zu müssen, sondern die zu meist seit Jahrzehnten etablierte Messtechnik und Geräte über eine Messkammer im Bypass an alle denkbaren Prozesse zu koppeln.

Neben der Messkammer soll eine dazugehörige Automatisierungsplattform entwickelt werden. Die Plattform soll in der Lage sein über die dazugehörige Peripherie eine Probe aus dem Reaktor zu entnehmen und darüber hinaus auch die verwendeten Messsonden zu steuern und deren Daten aufzuzeichnen.

Die Automatisierungsplattform soll im Weiteren für die Regelung eines Zellkulturprozesses verwendet werden. Auf Basis von geeigneter Messtechnik für eine Prozessvariable soll dadurch eine Optimierung von Kultivierungen möglich sein.

Für die Konstruktion der Messkammer sowie für weitere Anwendungszwecke im Labor dient das *Additive Manufacturing*. Im Rahmen dieser Arbeit wird erstmals die Thematik des individualisierten Laborbedarfs für den Einsatz mit tierischen Zellkulturen behandelt. Dieser Themenbereich wird im Laufe der nächsten Jahre ein immer größeres Thema werden und in Zukunft die Arbeit im Labor revolutionieren.

2. Additive Manufacturing

2.1 Theorie des *Additive Manufacturing*

Additive Manufacturing, früher häufiger als *Rapid Prototyping* bezeichnet, ist ein Begriff der viele verschiedene Technologien zur schnellen Erstellung von Prototypen umfasst. 3D-Druck wird heutzutage als anschauliches Synonym für die große Menge an günstigeren Druckern im *Consumer* Bereich verwendet. Mit diesen generativen Verfahren werden Bauteile direkt aus 3D-*Computer Aided Design* (CAD)-Dateien hergestellt. Die Grundlage jedes AM-Verfahrens ist somit immer ein digitales 3D-Modell. Dieses kann mit Hilfe einer CAD-Software oder mit einem 3D-Scanner aus einem physikalischen Objekt entstehen.

Das anschließende Drucken des Modells erfolgt in 2 ½ Dimensionen - dies bedeutet, dass ein zweidimensionaler Querschnitt auf eine Druckplattform aufgetragen und mit der vorhergehenden Schicht verbunden wird. Dieser Vorgang wird anschließend solange wiederholt, bis das vollständige Bauteil erstellt ist. Für diesen Prozess müssen die digitalen Daten in n verschiedene Schichten geschnitten werden, welche wiederum vom jeweiligen Drucker interpretierbar sein müssen. Für diesen Zweck wurde ein internationales Dateiformat, das STL-Format, etabliert [1, 2]. Die vielen verschiedenen AM-Verfahren unterscheiden sich hauptsächlich in der Methode mit der die Schichten erstellt werden sowie in der Ausgangsform des eingesetzten Materials. Im Folgenden werden die beiden gängigsten und für diese Arbeit relevanten Verfahren näher erläutert.

2.1.1 *Fused Deposition Modeling*

Fused Deposition Modeling (FDM) ist eine Erfindung von Stratasys Ltd. aus dem Jahre 1989 (Eden Prairie, USA) [3]. Bei diesem Verfahren wird ein Polymer eingesetzt, welches in den meisten Fällen in Form eines Filaments auf einer Spule vorliegt. Dieses Filament wird zu einer beheizten Düse, dem Extruder, transportiert und dort bei

der jeweiligen Schmelztemperatur verflüssigt. Der Extruder wird gesteuert und bewegt sich entlang der x- und y-Achse über der Bauplattform, auf der wiederum das geschmolzene Material entsprechend der jeweiligen Ebenen-Daten platziert wird. Beim extrudieren verfestigt sich das Material auf der Druckplattform. Nach dem beenden einer Ebene senkt sich die Plattform um eine Schichtdicke und die nächste Ebene wird auf die vorherige gedruckt. Durch die Hitze des geschmolzenen Materials verbinden sich die aufeinanderfolgenden Schichten miteinander. In Abbildung 1 ist der schematische Aufbau eines FDM-Druckers gezeigt.

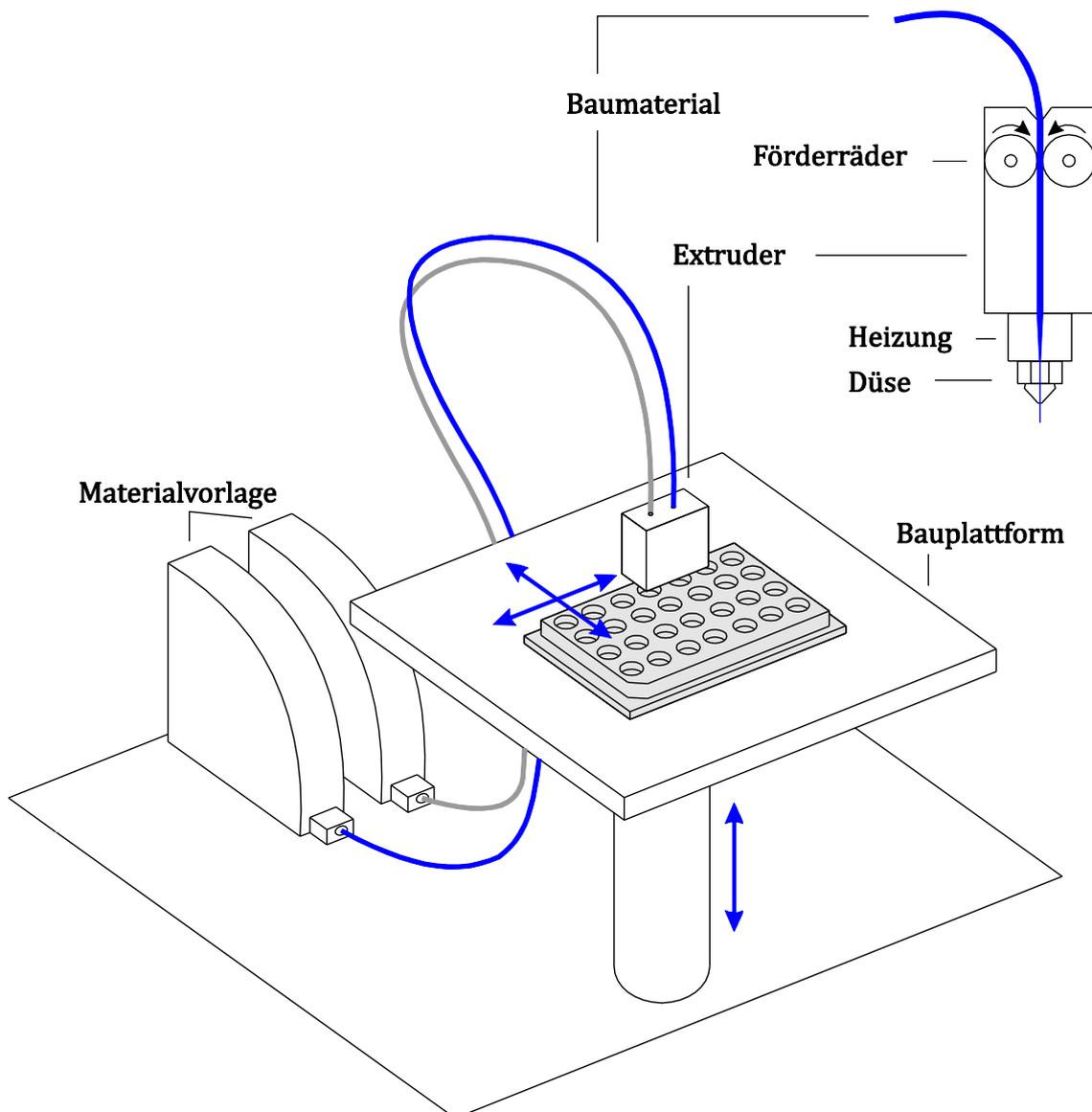


Abbildung 1: Schematische Darstellung des FDM-Druckprozesses.

Wenn ein Bauteil überhängende Elemente oder Hohlräume beinhaltet, werden zusätzlich Stützstrukturen benötigt. Diese geben dem Bauteil halt und ermöglichen es solche Elemente drucken zu können. Das Entfernen der Stützen kann vereinfacht werden, indem das Bau- und Stützmaterial aus unterschiedlichen Kunststoffen bestehen und die Stützen beispielsweise durch chemische Lösungsmittel aufgelöst werden können.

Aufgrund des Auslaufens mehrerer Patente erfolgte im Jahr 2013 ein großer Schritt der einfache 3D-Drucker, welche das FDM-Verfahren nutzen, für den *Consumer* Markt verfügbar machte. Solche günstigen FDM-Drucker erreichen derzeit eine Auflösung bis zu 100 μm [2]. Der Großteil der preislich attraktiven Drucker verarbeiten entweder Acrylnitril-Butadien-Styrol (ABS) oder Polylactide (PLA). Die Auswahl an anderen Materialien, insbesondere für den Einsatz im Labor, ist bislang sehr limitiert. Allerdings ist es lediglich eine Frage der Zeit, bis vielseitigere und beständigere Materialien wie Polyamid (PA) für *benchtop* Drucker verfügbar sein werden. Aktuelle Optimierungen zielen darauf ab Nylon (PA 6.6) als Material für neue Konstruktionen einsetzen zu können.

2.1.2 *Selective Laser Sintering*

Eine anspruchsvollere AM-Technologie ist das *Selective Laser Sintering* (SLS). Anders als beim FDM-Verfahren, bei dem das Material in Form eines Filaments vorliegt, kommt beim SLS das Material in Pulverform zum Einsatz. Das Materialpulver wird gleichmäßig auf der Druckplattform mit Hilfe einer Rolle oder einem Raketel aufgetragen und dabei gleichzeitig komprimiert. Anschließend sorgt ein Laser für ausreichend thermische Energie, um die Pulverpartikel punktuell zu verschmelzen. Nachdem eine Ebene fertiggestellt ist, wird die Bauplattform eine Schichtdicke abgesenkt und neues Pulver auf der Oberfläche aufgetragen. Beim Sintern der nachfolgenden Schicht erfolgt erneut ein Verbinden mit den vorherigen Partikeln. [3, 4]

Im Gegensatz zum FDM-Verfahren werden keine Stützstrukturen benötigt, das Bauteil ist im Pulver eingebettet und stützt sich somit selbst. Dadurch ist dieses Verfahren besonders geeignet für komplexere Formen, die auch Überhänge oder andere frei schwebende Geometrien beinhalten. Auch verschachtelte Geometrien sind realisierbar, wodurch ineinander bewegliche Bereiche möglich sind.

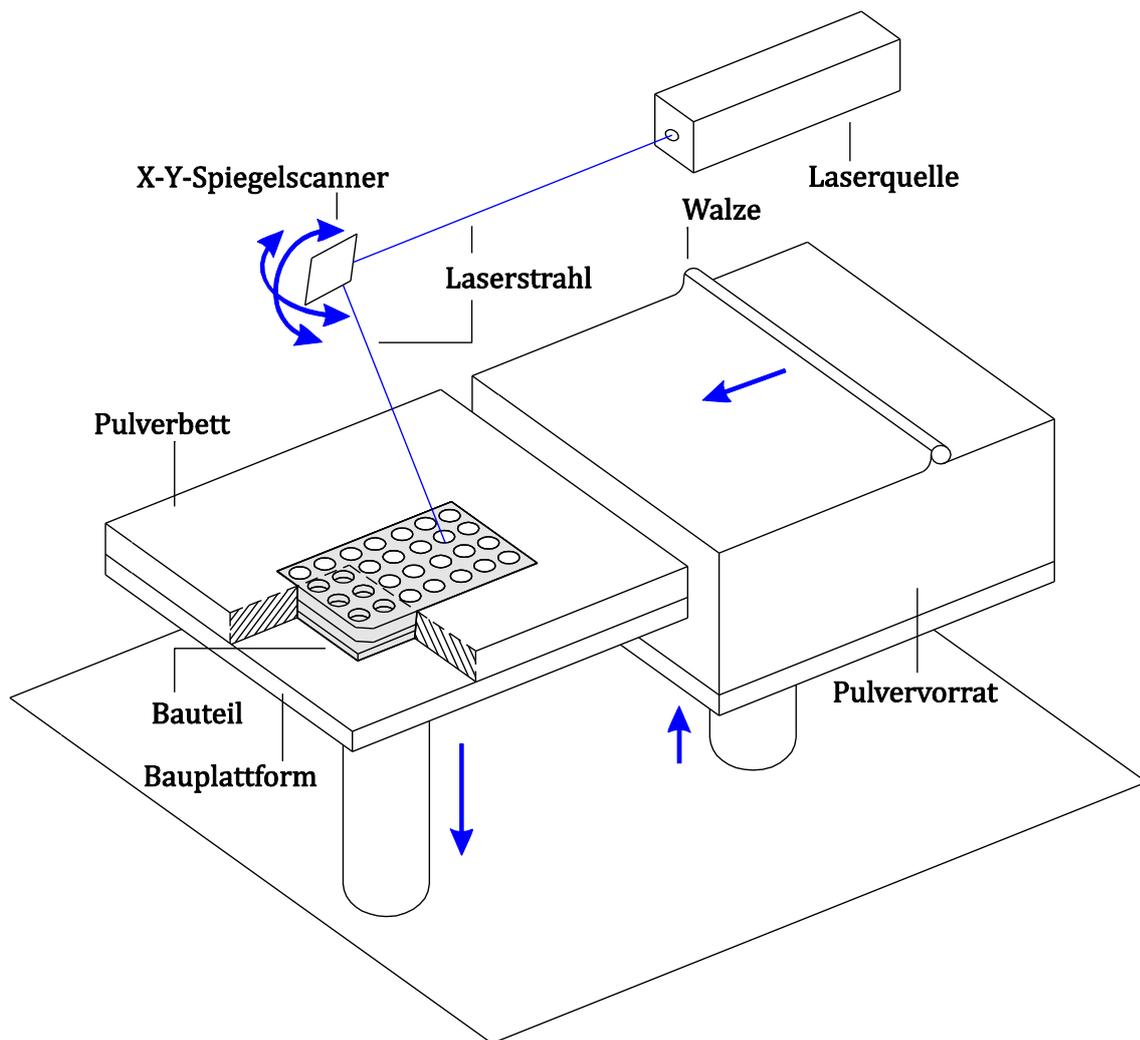


Abbildung 2: Schematische Darstellung des SLS-Druckprozesses. Die schraffierte Fläche zeigt einen Ausschnitt des Pulverbetts.

Die Auflösung dieses Verfahrens liegt im Bereich von 50 μm . Limitierend ist hauptsächlich die Feinheit des Materialpulvers, da die Korngröße ausschlaggebend für die Schichtdicke ist. In Abbildung 2 ist der schematische Aufbau des SLS-Druckprozesses dargestellt.

Der größte Vorteil dieser Methode ist die umfangreiche Auswahl an einsetzbaren Materialien. Neben Standard Polymeren ist es auch möglich Metallpulver, Glasgefüllte Polymere oder theoretisch jedes Material, das als feines Pulver herstellbar und mit einem entsprechenden Laser geschmolzen werden kann, einzusetzen [5].

Hinsichtlich der direkten Anwendung gedruckter Bauteile im Laboralltag, eröffnet dieses Verfahren mit der beachtlichen Menge an potentiellen Materialien neue Möglichkeiten für die Erstellung von *single use* (SU) aber auch wiederverwendbaren Equipments.

Dennoch besitzt der Einsatz des SLS-Verfahrens noch einige Hindernisse. Dies sind die derzeit relativ hohen Anschaffungskosten der Sinterstation sowie der Bedarf an großem *Know-How* für den Druckprozess. Darunter fallen die Wichtigkeit einer korrekten Platzierung im Bauraum um ein Verziehen des Bauteils oder den natürlichen Schrumpfungsprozess beim Abkühlen zu kompensieren. Das Pulver im Bauraum wird nah an die Schmelztemperatur aufgeheizt, allerdings ist diese Temperierung technisch nicht absolut homogen möglich und kann Schwankungen unterliegen. Dadurch sind für ein optimales Druckergebnis vorherige Testläufe nötig, um ein zufriedenstellendes Ergebnis zu erzielen.

Die Optimierung von Druckparametern ist ebenfalls wichtig, dadurch kann die poröse Struktur der SLS-Modelle einen gas- und flüssigkeitsdichten Zustand erreichen. Solche Anpassungen werden unter anderem durch Parameter, wie die vertikale Geschwindigkeit des Laserstrahls und dessen Intensität oder auch die Häufigkeit mit der eine Ebene vom Laser abefahren wird, beeinflusst. Das mehrfache Sintern einer Kontur führt zu einer stärkeren Verschmelzung der Pulverpartikel und kann somit die Dichtigkeit verbessern.

2.2 Weitere Additive Manufacturing Verfahren

Neben den bereits im vorherigen Abschnitt erläuterten Verfahren, dem FDM und dem SLS, wird nachfolgend ein Kurzüberblick über weitere Methoden gegeben. Eine Klassifizierung der unterschiedlichen Verfahren kann anhand des eingesetzten Zustands des Ausgangsmaterials nach flüssig, fest, pulverförmig oder gasförmig erfolgen.

2.2.1 Flüssiges Ausgangsmaterial

Stereolithographie (SLA) gehört zu den bekanntesten AM-Verfahren und verwendet ein flüssiges Photopolymer für die Herstellung der Bauteile. Das Verfahren wurde

von dem Unternehmen 3D Systems im Jahre 1986 entwickelt. Es zählt zu einem der ersten AM-Verfahren und der Begriff Stereolithographie stand lange Zeit als Synonym für das *Rapid Prototyping*. [6]

Bei diesem Verfahren ist der Bauraum mit einem flüssigen photosensitiven Polymer gefüllt. Dieses wird mit einem Ultraviolett (UV)-Laser ausgehärtet. Der Laser scannt die Kontur der jeweiligen Schichtinformationen ab, wodurch das Material verfestigt wird. Dieser Schritt wird für jede Schicht wiederholt bis das Bauteil fertiggestellt ist. Die Grundlage bildet also die Photopolymerisation, bei der ein flüssiges Monomer durch UV-Strahlung zu einem festen Polymer umgewandelt wird. Dieses Verfahren bietet eine sehr hohe, bis 10 µm genaue Auflösung. [7–10]

Die mechanisch, thermisch und chemisch instabileren Eigenschaften der eingesetzten Materialien im Vergleich zu SLS-Bauteilen sorgen jedoch für eine erhebliche Einschränkung für den Laborbereich. Allerdings werden immer neue Materialien entwickelt, die beispielsweise für Implantationszwecke zugelassen sind und eine gute Biokompatibilität aufweisen (z.B. MED610™, Stratasys).

Eine neue Methode, die ebenfalls ein flüssiges Photopolymer verwendet, nutzt die *Digital Light Processing* (DLP)-Technologie aus der Projektionstechnik. Die Firma Prodways (Les Mureaux, Frankreich) betreibt diese Technologie unter dem Namen MOVINGLight® und ermöglicht eine schnelle Fertigung der Bauteile mit einer Auflösung von 40 µm. Durch die Kombination des *Moving DLP* und UVA-LEDs werden sogenannte Voxel (volumetrische Pixel) in das Photopolymer eingestrahlt und härten dieses aus. Das Besondere an dieser Technologie sind die Materialien, welche von Prodways angeboten werden. Das Material „PLASTCure Clear 100“ ist ein biokompatibles Material (DIN ISO 10993 zertifiziert), welches transparent ist und darüber hinaus dampfsterilisiert werden kann. Dieses Verfahren und das genannte Material werden in Zukunft für das Labor immer wichtiger werden, da das Verbrauchsmaterial oft für Messungen oder Beobachtungen transparent sein muss. [11]

Ein weiteres Verfahren, welches ein Photopolymer einsetzt, ist das *Solid Ground Curing* (SGC). Die Aushärtung des Harzes erfolgt allerdings nicht mit einem Laser

oder LEDs, sondern mit einer UV-Lampe. Zwischen der UV-Lampe und dem Photopolymer wird eine Belichtungsmaske platziert, welche für die selektive Belichtung und Aushärtung des Materials sorgt.

Die Grundlage der Maske bildet eine Glasplatte, welche über elektrostatische Aufladung mit einem Negativ der jeweiligen Bauteilschicht versehen wird. Diese Technologie entspricht dadurch einem ähnlichen Verfahren wie heutige Papier-Laserdrucker. Zwar ermöglicht das SGC-Verfahren sehr filigrane, detailreiche Bauteile, jedoch fallen die Anschaffungs- und Betriebskosten noch relativ hoch aus. [12]

Das Polyjet-Verfahren trägt ein Photopolymer mit einer Druckdüse direkt auf die Bauplattform auf. Anschließend wird die jeweilige Schicht mit einer UV-Lampe ausgehärtet. Mit diesem Verfahren ist es möglich mehrere Farben in einem Bauteil zu vereinen. Die Auflösung ist mit bis zu 16 μm sehr genau, allerdings haben die Bauteile eine vergleichsweise geringe Stabilität (verglichen mit z.B. SLA- oder SLS-Bauteilen). [6]

Alle Verfahren mit flüssiger Materialbasis benötigen für Überhänge und freischwebende Geometrien gesonderte Stützkonstruktionen. Beim SLA, *Moving DLP* und Polyjet werden diese Stützen zusammen mit dem Bauteil gedruckt und anschließend manuell entfernt. Beim SGC hingegen wird nach dem Drucken jeder Schicht das nicht verfestigte Harz abgesaugt und die Hohlräume mit einem Wachs gefüllt. Das Wachs wird im Nachhinein thermisch vom Rest des Bauteils entfernt.

2.2.2 Pulver als Ausgangsmaterial

3D Printing (3DP) ist neben dem SLS das bekannteste Verfahren, welches pulverförmiges Baumaterial verwendet. In den letzten Jahren entwickelte sich die Bezeichnung *3D Printing*, bzw. 3D-Drucken als Synonym für das *Additive Manufacturing*. Bei dem Verfahren werden die auf Stärkebasierenden Pulverpartikel mit einem Wasserbasierenden Binder miteinander verklebt. Ähnlich wie bei einem gängigen Tintenstrahl-Drucker wird dieser Kleber mit einer Druckdüse präzise aufgetragen. Das entstehende Bauteil ist vielmehr ein Anschauungsmodell und besitzt keine große mechanische Stabilität. [6]

Prometal ist ein Metallpulver basiertes Verfahren, welches hauptsächlich für den schnellen Bau von Spritzgussformen und Werkzeugen genutzt wird. Ähnlich dem

3DP-Verfahren wird mit einer Druckdüse ein flüssiger Binder auf das Pulver aufgebracht. Die Druckplattform wird um eine Schichtstärke abgesenkt und neues Pulver darauf verteilt. Im Nachhinein kann das Bauteil durch Sintern, Infiltrieren und gegebenenfalls Schleifen weiter bearbeitet und dadurch für den Einsatzzweck stabilisiert oder verdichtet werden. [6, 8, 9]

Dem SLS-Verfahren sehr ähnlich ist das *Electron Beam Melting* (EBM). Das Pulver wird bei diesem Verfahren allerdings mit einem Elektronenlaser aufgeschmolzen. Der Vorgang findet unter Verwendung eines Vakuums statt, um Oxidationsreaktionen vorzubeugen. Hauptsächlich kommt beim EBM ein Metallpulver zum Einsatz, wobei viele verschiedene Legierungen verarbeitet werden können. [6]

Stützstrukturen werden im Gegensatz zu den flüssigen Ausgangsmaterialien bei den pulverbasierten Verfahren nicht benötigt. Das Pulver umschließt jede Schicht des Bauteils, wodurch dieses stabilisiert wird und somit freihängende Geometrien ermöglicht werden.

Ein etwas abweichendes Verfahren ist das *Laser Engineered Net Shaping* (LENS). Hierbei wird das Metallpulver direkt beim Auftragen auf die Bauplattform von einem Hochleistungslaser aufgeschmolzen. Somit wird das Material nur an der Stelle aufgetragen, an der es benötigt wird. Der Bauraum enthält eine Argon-Atmosphäre. Nach dem Auftragen kühlt und erstarrt das Material wieder. Bei diesem Verfahren sind viele verschiedene Metalle und auch Legierungen einsetzbar, allerdings werden für Überhänge Stützstrukturen benötigt. [6]

2.2.3 Festes Ausgangsmaterial

Ein Beispiel für die Verwendung von festem Ausgangsmaterial ist das *Laminated Object Manufacturing* (LOM). Bei diesem Verfahren kommen Blätter oder dünne Bleche zum Einsatz. Diese werden miteinander verbunden, beispielsweise über Verkleben. Die Kontur des Bauteils wird dann zum Beispiel mit einem CO₂-Laser ausgeschnitten. Anschließend wird die nächste Ebene verklebt und die darauffolgende Ebene ausgeschnitten. Das LOM ist ein sehr kostengünstiges Verfahren. Einer der größten Nachteile ist, dass besonders innenliegende Konturen nur sehr schwer realisiert werden können, da das ausgeschnittene Material von dort im Nachhinein kaum entfernbar ist. [7, 8, 13]

2.2.4 Gasförmiges Ausgangsmaterial

Eine aufwändigere Methode stellt das *Laser Chemical Vapor Deposition* (LCVD) dar. Hierbei wird für die Erstellung von Bauteilen ein Abscheiden des Werkstoffes aus der Gasphase genutzt. In einem Bauraum ist beispielsweise ein aluminium- und sauerstoffhaltiges Gas vorhanden. Zwei sich kreuzende Laser sorgen für ausreichend lokale Energie, um aus dem Gas ein festes Aluminiumoxid zu bilden.

Diese Technologie wird für Mikrostrukturen eingesetzt, es ist möglich Strukturen bis zu 5 µm Auflösung herzustellen. [14]

2.2.5 Zusammenfassung der gezeigten AM-Verfahren

Tabelle 1 zeigt einen tabellarischen Vergleich der erläuterten generativen Fertigungsverfahren.

Tabelle 1: Vergleich der erläuterten AM-Verfahren mit Fokus auf die Einsetzbarkeit im Labor

Verfahren	Ausgangsmaterial	Prinzip	Biokompatibilität	Einsetzbarkeit im Labor
FDM	Kunststoff auf Spule	Aufschmelzen	Teilweise	Nein, da Sterilisierbarkeit nicht möglich
SLS	Pulver	Sintern durch Laser	Ja (z.B. Polyamid)	Ja, Material ist robust und sterilisierbar
SLA	Flüssiges Photopolymer	Laser härtet Material aus	Teilweise (z.B. neuere Materialentwicklungen)	Material oft chemisch und thermisch instabil
3DP	Pulver	Binder verklebt Pulver	Nein	Nein
Polyjet	Flüssiges Photopolymer	Druckdüse trägt Material auf	Teilweise (z.B. neuere Materialentwicklungen)	Material oft chemisch und thermisch instabil
Moving DLP	Flüssiges Photopolymer	Voxel werden in das Photopolymer projiziert	Teilweise (Prodways besitzt biokompatibles, klares und dampfsterilisierbares Material)	Ja, mit Prodways-Material möglich
SGC	Flüssiges Photopolymer	Belichtung des Polymers durch Maske	Teilweise (z.B. neuere Materialentwicklungen)	Material oft chemisch und thermisch instabil

Verfahren	Ausgangsmaterial	Prinzip	Biokompatibilität	Einsetzbarkeit im Labor
Pro-metal	Metallpulver	Binder verklebt Pulver	Teilweise (Binder muss ausgetrieben werden)	Nach Sintern wie das reine Metall
EBM	Metallpulver	Elektronenstrahl zum Sintern	Ja	Ja, wie Metall
LENS	Fest – Metall	Laser schmilzt Metall auf	Ja	Ja, wie Metall
LOM	Blätter oder Bleche	Laser schneidet Konturen aus	Nein	Nein
LCVD	Gasförmig	Abscheiden aus der Gasphase	Ja	Ja, wie Metall

Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen AM-Verfahren und jedes Verfahren besitzt unterschiedliche Vorteile für die Herstellung von Bauteilen. Während Verfahren, die Photopolymere nutzen, zwar eine hohe Auflösung erzielen, ist die Biokompatibilität sowie thermische und chemische Stabilität für den Einsatz im Labor oft nicht ausreichend.

Pulverbasierte Verfahren hingegen ermöglichen den Einsatz einer großen Anzahl an Kunststoffen, Metallen und auch Metall-Legierungen. Oft ist aber die Auflösung geringer und die Oberfläche besitzt eine höhere Rauigkeit als beispielsweise Photopolymer-Bauteile. Derzeit bieten Bauteile aus dem SLS-Verfahren die beste Verwendungsmöglichkeit für Laborverbrauchsmaterial. Es können komplexe Geometrien und auch ineinander bewegliche Teile gedruckt werden. Zudem gibt es biokompatible Material und die Bauteile besitzen eine gute mechanische, thermische und chemische Stabilität.

2.3 Vorteile des *Additive Manufacturing*

Seit vielen Jahren gilt das *Additive Manufacturing* als Erfolgsgarant in klassischen Fertigungsbetrieben. Dort ist vor allem das Prinzip des *simultaneous engineering* (SE), oder auch *concurrent engineering* (CE) ein Hauptfaktor für die effektive Produktentwicklung. Ein hoher Grad an Parallelisierung in der Entwicklung sorgt für schnelle und iterative Verbesserungen bereits in frühen Entwicklungsphasen.

Auch bei der Entwicklung von Geräten für den Bereich der Biotechnologie spielen diese Faktoren eine entscheidende Rolle. So ist es beispielsweise möglich neue Sonden zu konstruieren und bereits in einer sehr frühen Phase physikalische Erfahrungen damit zu sammeln, auch wenn dies lediglich Optimierungen bezüglich eines Formfaktors oder auch eines simpleren Handlings sind.

Diese Art der Entwicklung stellt aber nur eine Seite der Einsatzgebiete dar. Besonders interessant wird die Verwendung des AM für direkt im Labor einsetzbare Bauteile. Obwohl heutzutage Großunternehmen Verbrauchsmaterial, wie beispielsweise Wellplatten in Massenproduktion herstellen, ist der Bedarf an hochgradig individuellen Einzelstücken bei den Konsumenten vorhanden. Mit Hilfe des 3D-Drucks können rasant neue, optimierte Laboruntensilien erzeugt und getestet werden. So entstehen neue spezifische Bauteile für eine spezielle Arbeit oder ein Experiment.

Durch generative Fertigungsverfahren können nicht nur die Bauteile selbst, sondern auch Werkzeuge für den Formbau hergestellt werden. Dadurch kann auch der Bereich der Massenproduktion mit Hilfe von AM-Verfahren bedient werden. Diese Methodik wird als *Rapid Tooling* bezeichnet. Die Herstellung von Spritzgussformen ist bisher äußerst kostenintensiv und eine spätere Anpassung der Formen für benötigte Änderungen kaum wirtschaftlich. Werden die Formen selbst gedruckt, besteht auch hier eine hohe Flexibilität.

Ein Leitsatz des AM ist, dass Komplexität keine Mehrkosten verursacht. Beim Druckverfahren kommt es lediglich darauf an, wie viel Material verbaut wird. Jegliche Komplexität, welche bei normalen Fertigungsverfahren die Kosten immens steigern könnte, ist hier nicht ausschlaggebend. Da die Kostenkalkulationen von Bauteilen größtenteils abhängig von der benötigten Menge an Material ist, spielen Stückzahlen bei den Kosten für 3D-gedruckte Bauteile ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle. Die Kosten jedes Bauteils bleiben dieselben, natürlich unter dem Vorbehalt, dass der Bauraum der Maschine effektiv genutzt wird. Klassische Fertigungsverfahren sind dagegen stark stückzahlabhängig, wodurch gerade Einzelanfertigungen für neue Produkte oder auch Experimente oft an den relativ hohen Kosten scheitern.

Die Vorteile des AM sind im Rahmen dieser Arbeit genutzt worden, um eine schnelle Konstruktion und Optimierung neuer Bauteile zu ermöglichen.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe von SLS-Druck individualisiertes Verbrauchsmaterial hergestellt und erprobt werden. Unterschiedliche Bauteile wurden für den Einsatz im Labor *in silico* entworfen, mit dem SLS-Verfahren gedruckt und anschließend in Experimenten erprobt. Im Folgenden werden zwei Beispiele vorgestellt, die bereits in zwei Veröffentlichungen publiziert worden sind. [15, 16]

Wellplatten werden für Kultivierungen im kleinen Maßstab eingesetzt. Die Herstellung von Wellplatten über den 3D-Druck ermöglicht es die klassisch runde Form der Wells zu modifizieren.

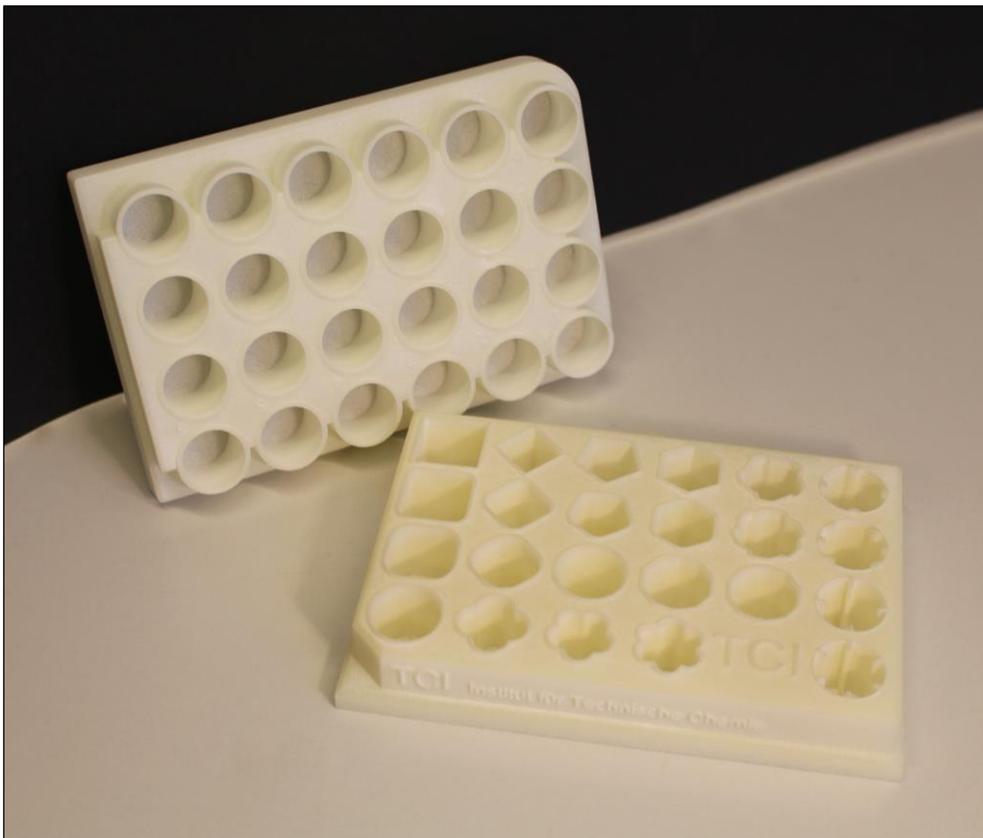


Abbildung 3: Eine 3D-gedruckte Wellplatte mit 24 runden Wells und eine Wellplatte mit 23 individuellen Geometrien. Hergestellt mit dem SLS-Verfahren.

Die unterschiedlichen Wellgeometrien verursachen beispielsweise unterschiedliche Sauerstoffeinträge in ein Medium, wodurch der Einfluss des Sauerstoffs auf die kultivierten Organismen untersucht werden kann. Abbildung 3 zeigt die in Rahmen

dieser Arbeit 3D-gedruckten Wellplatten mit unterschiedlichen Geometrien, sowie eine gedruckte Standardausführung einer 24er-Wellplatte.

Ein weiteres Beispiel veranschaulicht die Möglichkeit Alltagsprobleme im Labor mit Hilfe des 3D-Drucks zu vereinfachen. Bei Schüttelkolben-Kultivierungen muss der Kolben für die Probenahme, Zugabe von Korrekturmitteln oder frischem Medium aus einem Inkubator unter eine Sterilwerkbank transportiert und der Kolbendeckel dort für weitere Arbeiten abgeschraubt werden. Um diesen Vorgang zu vereinfachen und die Flexibilität zu maximieren, wurden Luer-Lock-Anschlüsse in den Deckel integriert. Die Verwendung des SLS-Verfahrens ermöglicht es einen Deckel zu drucken, der für den direkten Einsatz im Labor geeignet ist. Die Luer-Lock-Verschraubungen sind passgenau und es ist möglich die Kanäle zum Inneren des Kolbens nicht nur gerade, sondern auch in einer Rundung verlaufen zu lassen. Über klassische zerspanende Fertigung wäre dies nicht ohne großen Aufwand möglich. Abbildung 4 zeigt den modifizierten Kolbendeckel mit Luftfiltern und Probenahmeanschluss an den Luer-Lock-Verbindungen.

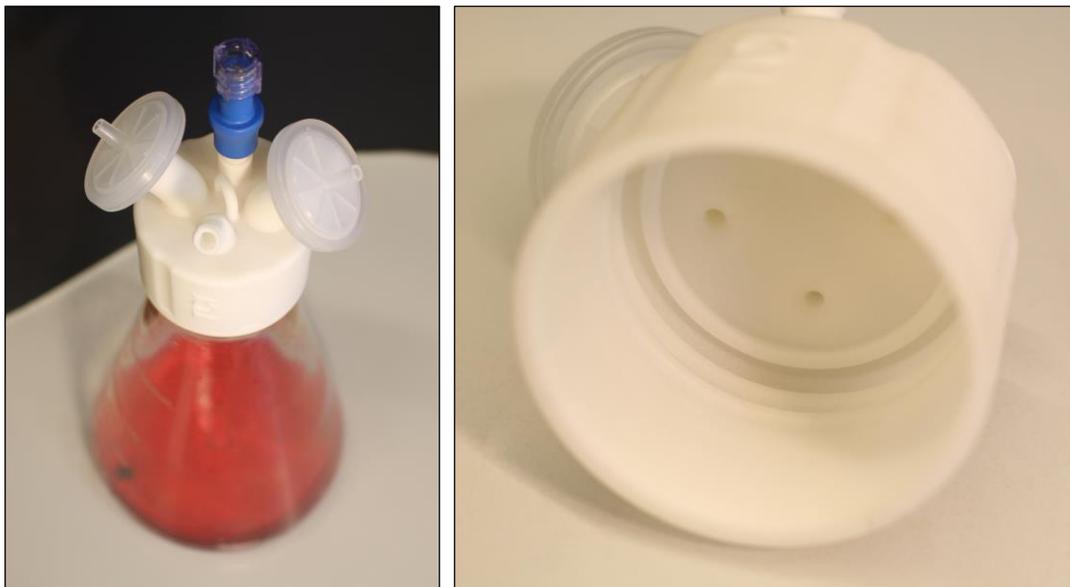


Abbildung 4: 3D-gedruckter modifizierter Kolbendeckel mit unterschiedlichen Luer-Lock-Anschlüssen. Die rechte Darstellung zeigt die Details innerhalb des Deckels.

3. Entwicklung einer Bypass-Messkammer

Der stetige Entwicklungsfortschritt in der Biotechnologie bringt ständig neue Reaktorkonzepte und innovative Messtechnik hervor. Eine Herausforderung für die Kombination der Messtechnik mit den Reaktoren stellt die Integration der Analytik-Sonden in die unterschiedlichen Systeme dar.

Heutzutage kommen nicht nur klassische Edelstahl *stirred tank* Reaktoren (STR) und Glasreaktoren zum Einsatz. Immer häufiger werden sogenannte *Disposable*-Reaktoren genutzt. Diese neuen Einwegreaktorkonzepte sind sowohl in kleinen, als auch großen Maßstäben in allen Phasen der Wertschöpfungskette einer biotechnologischen Produktion zu finden.

Edelstahl-, Glas- und *Disposable*-Reaktoren besitzen jeweils unterschiedliche Möglichkeiten Messtechnik in den Prozess zu integrieren. Edelstahlreaktoren verfügen über standardisierte, zumeist seitlich zugängliche Anschlüsse sowie Anschlüsse im Reaktordeckel. Kleinvolumige Glasreaktoren hingegen besitzen ausschließlich Anschlussmöglichkeiten über den Reaktordeckel. Allerdings ist der Platz auf dem Reaktordeckel limitiert und die Sonden benötigen eine Mindestlänge um in die Zellsuspension zu reichen. Somit ist nicht jede Messtechnik für den Einbau im Deckel geeignet. *Disposable*-Systeme besitzen keinen dieser standardisierten Anschlussmöglichkeiten. Da die Einwegsysteme vom Hersteller steril geliefert werden, ist auch kein nachträglicher Selbsteinbau und anschließende Sterilisation möglich.

Da ein Messsondentyp nicht in allen gängigen Reaktorsystemen verwendet werden kann, ist es nicht möglich eine Messtechnik für die Überwachung in Edelstahlreaktoren bereits während der Prozessentwicklung in Glas- und Einwegreaktoren zu etablieren.

Inline verbaute Sonden, die sich direkt in einem Reaktor-Port befinden, sind aufgrund des Anschlussprinzips somit nicht universell in den unterschiedlichen Systemen einsetzbar. Dagegen bietet eine *online* Integration, also die Auslagerung der Messtechnik in einen Bypass, die Möglichkeit unterschiedlichste Sonden-Bauformen an jegliche Prozesse zu koppeln. Dadurch ist die Auswahl der Messtechnik unabhängig von dem Reaktorsystem und der Bauform der Sonde. [17]

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer universellen Bypass-Messkammer die an allen beliebigen Reaktortypen genutzt werden kann. In die modular aufgebaute Kammer soll jeder beliebige Sensor zur Messung integriert werden können, sodass alle Kombinationen aus Reaktor und Sensor miteinander nutzbar sind. Im Folgenden werden die Konstruktion sowie einige Anwendungsbeispiele der in dieser Arbeit entwickelten Messkammer dargestellt.

3.1 Konstruktion der Messkammer

Die Verwendung einer Durchflussmesskammer im Bypass ermöglicht es Messtechnik an einem beliebigen Reaktor zu nutzen. Hierfür muss die Messsonde in die Kammer eingebaut werden. Der Ein- und Auslass der Messkammer wird über Schläuche mit dem Reaktorinhalt verbunden. Eine Pumpe fördert die Zellsuspension aus dem Reaktor in die Kammer, in der die analytische Messung durchgeführt wird.

Für den sterilen Betrieb an einem Bioprozess muss die Messkammer mit Dampf sterilisierbar sein. Dies kann durch eine entsprechende Sterilkonstruktion ermöglicht werden.

Wenn verschiedene Messsonden eingesetzt werden sollen, ist es möglich mehrere dieser Messkammern hintereinander zu betreiben. Dadurch können innerhalb eines Bypass-Systems verschiedene Messsonden in Reihe genutzt werden. Abbildung 5 zeigt schematisch zwei aufeinanderfolgende Messkammern mit unterschiedlichen Messsonden an einem Bypass-System.

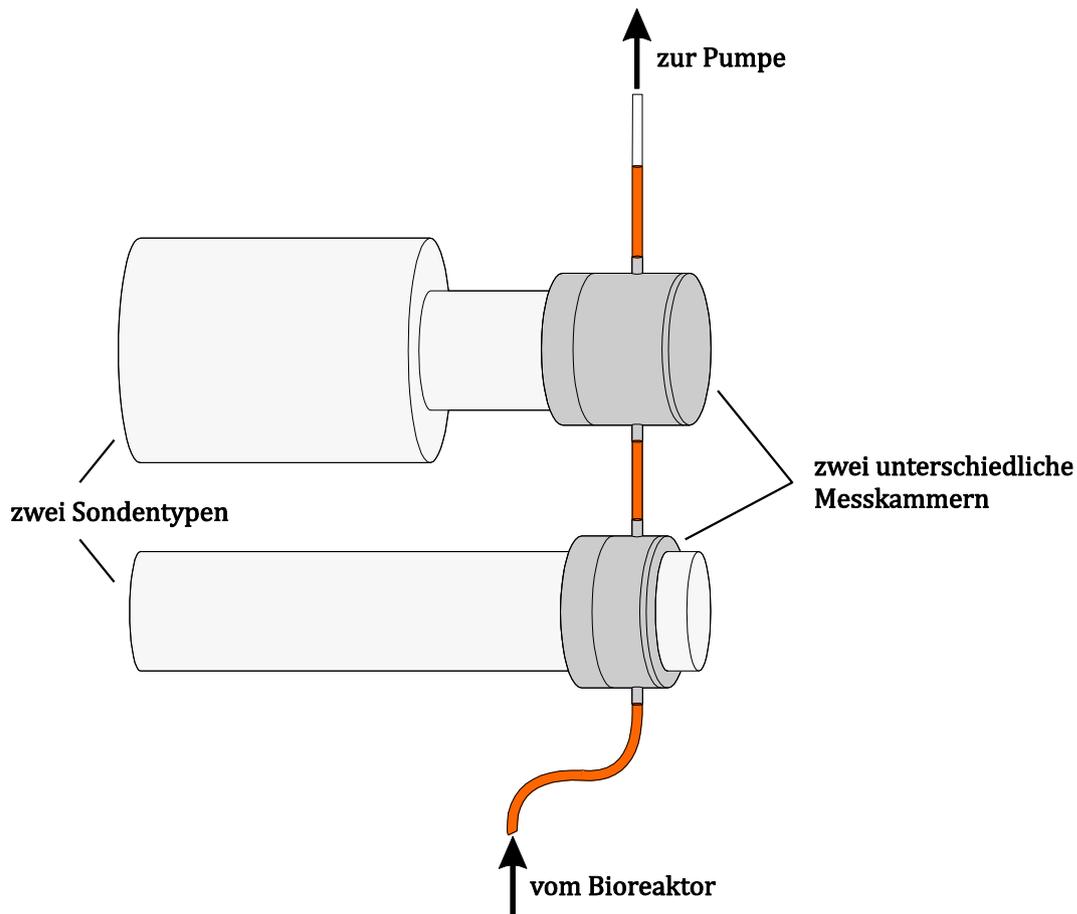


Abbildung 5: Schematische Darstellung zweier aufeinanderfolgender Messkammern mit unterschiedlichen Messsonden in einem Bypass-System.

3.1.1 Sterilkonstruktion

Langsam wachsende Organismen, wie tierische Zellen, sind anfällig für Kontaminationen durch andere schnellwachsende Organismen. Gelangen Bakterien oder Pilze in eine Zellkultur, so wachsen diese weitaus schneller als die eigentlichen Zielorganismen, verbrauchen sämtliche Nährstoffe und verunreinigen die Zellsuspension. Aus diesem Grund müssen alle Bauteile, die innerhalb des Sterilbereichs eines Bioprozesses zum Einsatz kommen, bereits bei deren Konstruktion entsprechend ausgelegt werden. Ziel der Sterilkonstruktion ist es, durch konstruktive Merkmale eine erfolgreiche Sterilisation zu garantieren. Die Sterilisationsbedingungen, z.B. eine gesättigte Dampf Atmosphäre, müssen alle Teile des Sterilbereichs erreichen

und ausreichend lange aufrechterhalten werden können. Nur so kann der sterile Betrieb gewährleistet werden.

Details und Problemstellungen, welche bei der Auslegung von Bauteilen für Bioreaktoren und deren Peripherie beachtet werden müssen, sind in Leitfäden für die Sterilkonstruktion erläutert. Diese Betrachtungen beinhalten die Auswahl des Materials, die Oberflächeneigenschaften, die Verbindung von Bauteilen durch Schweißen oder Verschrauben und die Abdichtung mit O-Ringen sowie deren korrekte Platzierung. [18]

Die Abdichtung der Messkammer mit O-Ringen ist entscheidend für den sterilen Betrieb innerhalb eines Bioprozesses. Sie sind so platziert, dass keine Einschlüsse oder länglichen Schlitze zwischen den Bauteilen entstehen (siehe Abbildung 6). Diese unzugänglichen Bereiche würden bei der Sterilisation nicht ausreichend erhitzt oder nicht direkt mit Dampf in Kontakt kommen, wodurch eine Kontaminationsquelle in der Messkammer verbleiben kann.

3.1.2 Modulares Prinzip der Messkammer

Die Messkammer ist modular aufgebaut, um möglichst viele verschiedene Sondentypen und Messtechniken im Bypass nutzen zu können. In Abbildung 5 sind zwei verschiedene Kammern mit entsprechenden Sonden schematisch dargestellt.

Die Messkammer besteht immer aus drei funktionalen Bauteilen: einem Klemmring, einem Kammerring und einem Verschluss. Der in Abbildung 6 dargestellte Querschnitt einer Explosionsdarstellung veranschaulicht diese drei Komponenten sowie die O-Ringe für die Abdichtung. Technische Zeichnungen der im Folgenden erläuterten Messkammermodule können dem Anhang entnommen werden (siehe Kapitel 8.4).

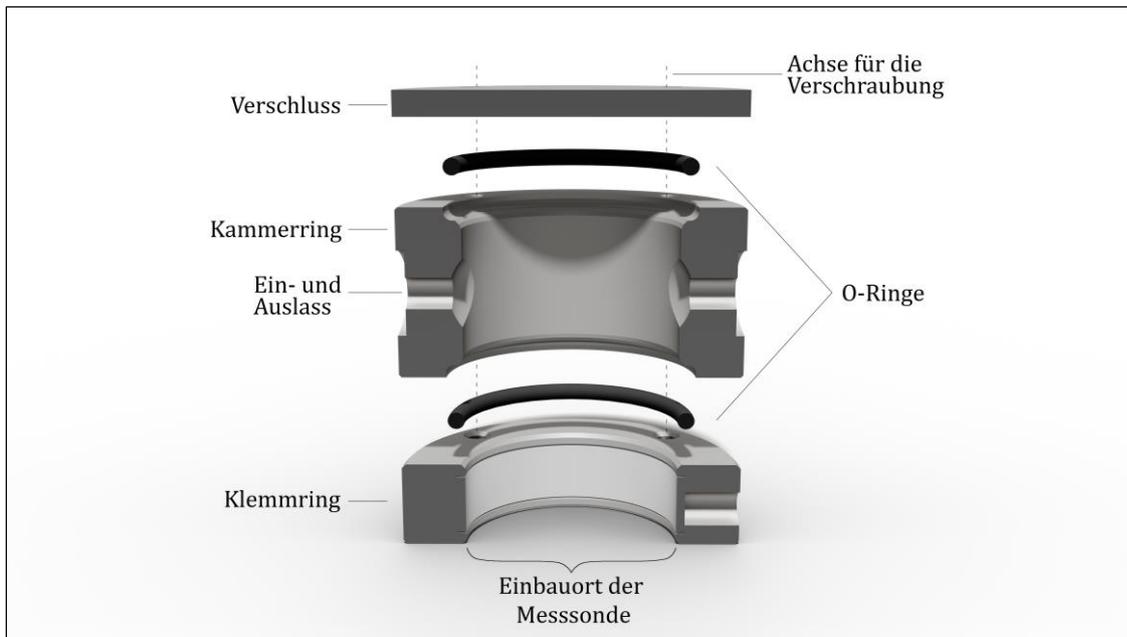


Abbildung 6: Explosionsdarstellung der drei Module einer Messkammer im Querschnitt.

Der Klemmring dient der Fixierung der Kammer an der Messsonde. Im Klemmring ist ein beweglicher, weicherer Metalleinsatz platziert, welcher über Gewindestifte auf dem Schaft der jeweiligen Sonde fixiert werden kann.

Der Kammerring besitzt einen Ein- und Auslass für die Verbindung mit dem Bypass und bildet das Volumen in das die Probe gefördert und vermessen werden kann. Außerdem sind am Kammerring die konstruktiven Elemente für die Platzierung der O-Ringe eingearbeitet. Im äußeren Bereich befinden sich vier durchgehende Gewindebohrungen über die alle drei Module fest miteinander verschraubt werden. Abhängig vom Aufbau und Prinzip der Messtechnik, kann der Kammerring in seinen Dimensionen angepasst werden.

Der Verschluss des Kammerrings ermöglicht ein abdichtendes Verschließen der Messkammer.

3.1.3 Auslegung der Messkammer für Standard-Sonden

In großen Edelstahlreaktoren können Sonden an zwei unterschiedlichen Anschlüssen, den sogenannten Ingold-Ports und den PG 13,5-Verschraubungen, genutzt werden. Beide Anschlüsse sind in Abbildung 7 dargestellt. Der Ingold-Port ist ein

seitlicher Reaktorzugang mit 25 mm Durchmesser. Eine darin eingebaute Sonde taucht direkt in die Zellsuspension des Bioprozesses ein, sodass eine *inline* Messung erfolgen kann. Ingold-Ports werden in der Regel für komplexere Analytik wie Spektroskopie-Sonden verwendet. [19]

Die PG 13,5-kompatiblen Analytiksonden besitzen einen Schaftdurchmesser von 12 mm und werden über ein 13,5 mm Panzergewinde (PG) verschraubt. Eine darin verbaute Sonde muss für eine *inline* Messung zunächst den Kopfraum durchdringen, bevor sie in die Zellsuspension eintaucht. Die gängigsten Vertreter der PG 13,5-Sonden sind die klassischen pH-Glaselektroden, sowie die Clark Elektroden zur pO_2 -Bestimmung.

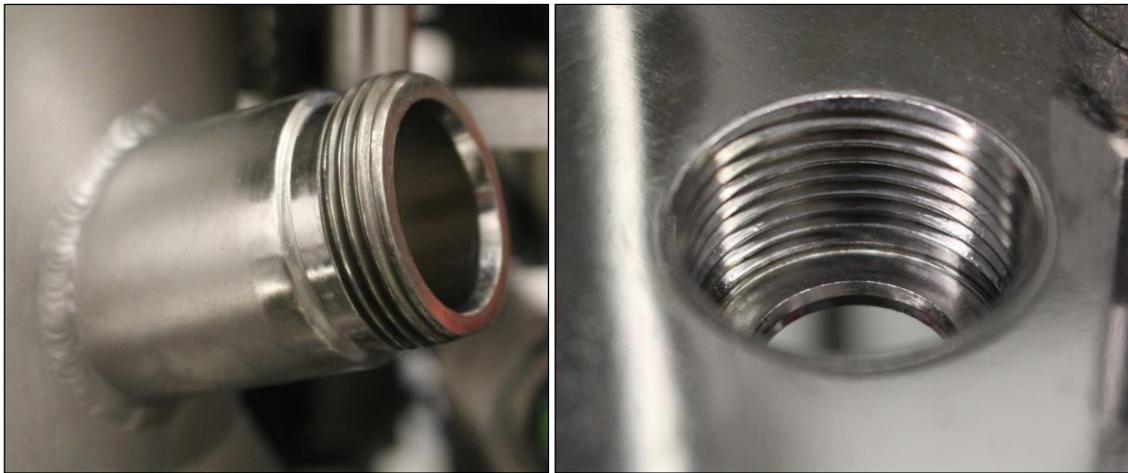


Abbildung 7: Standard-Anschlüsse für Messsonden am Bioreaktor. Der Ingold-Port (links) für 25 mm Sonden und der PG 13,5-Anschluss (rechts) für 12 mm Sonden.

Die entwickelte Messkammer kann beide dieser Standard-Bauformen aufnehmen und die Sonden im Bypass an die Prozesse koppeln. Hierfür muss lediglich der Kammerring modifiziert werden.

Für Analytik im Ingold-Format ist die zentrale Öffnung des Kammerrings 25 mm im Durchmesser, damit der ebenfalls 25 mm Schaft der Sonde in die Kammer eingebaut werden kann.

Für PG 13,5 kompatible Analytik beträgt der Durchmesser des Kammerrings 15 mm, damit das Volumen der Kammer für die weitaus kleineren Sonden nicht

unnötig groß ausfällt und diese dennoch von der Zellsuspension umspült werden können.

Für die Fixierung der Messkammer an der Messsonde im PG 13,5-Format wird zusätzlich ein kommerziell erhältlicher „Ingold-Port auf PG 13,5“-Adapter benötigt. Mit diesem können die Sonden in einen Ingold-Port verbaut werden, dadurch ist es ebenfalls möglich den Klemmring an dem Adapter anzubringen (siehe Abbildung 9).

3.1.4 Anpassungen an unterschiedliche Messprinzipien

Neben der Bauform ergeben sich aus dem zugrundeliegenden Messprinzip der Sonden Anforderungen an die Konstruktion der Messkammer. Beispielsweise werden Messungen mit optischen Sonden in Reflexions- und Transmissionsmessungen unterschieden. Beide Messmethoden benötigen jeweils unterschiedliche Konstruktionen der Sonden.

Bei dem 2D-Fluoreszenz (2DF)-Spektrometer BioView® erfolgt eine Reflexionsmessung in der Probenlösung und das reflektierte Licht wird von einem Detektor analysiert. Aus diesem Grund muss die Probe direkt über das Ende der Sonde und somit den Ein- und Austritt des Lichts hergeführt werden.

Andere Sonden, wie das BioPAT® Spectro NIR verwenden eine Kombination aus Reflexions- und Transmissionsmessung, die sogenannte Transflektionsmessung an einem Messspalt, welchen die Probe passieren muss. Auch das *in house* entwickelte In situ Mikroskop (ISM) nutzt einen Messspalt für die Aufnahme eines mikroskopischen Durchlichtbildes.

Neben den verschiedenen dimensional Bauformen der Messsonden – Ingold- und PG 13,5-Format – muss demzufolge auch die Möglichkeit zur individuellen Konfiguration der Messkammer für das jeweilige Messprinzip möglich sein. Die Flexibilität der Messkammer-Positionierung auf der Sonde wird über verschiedene Ausführungen des Verschlusses ermöglicht.

Für eine Messung am Sondenkopf, z.B. bei einer Reflexionsmessung, wird ein Volumenelement benötigt, das für die Messung von Licht durchstrahlt werden kann. Daher wird für die Messung ein geschlossener Deckel genutzt, der die Messkammer abdichtet. Dadurch kann die Probe an der Messsonde vorbeigeführt und analysiert werden.

Für die Messung an einem Messspalt, z.B. bei der Transflexionsmessung, muss die Kammer genau auf den benötigten Spalt der Sonde platziert werden. Diese Platzierung ermöglicht ein Verschlussring mit einer zentralen 25 mm Bohrung. Dieser Ring sorgt für einen ausreichenden Anpressdruck auf den O-Ring, damit die Abdichtung um den Messspalt erfolgen kann. Abbildung 8 zeigt die entwickelte Bauform für das Ingold-Port-Format mit einem Verschlussring (links) und einem geschlossenen Deckel (rechts).

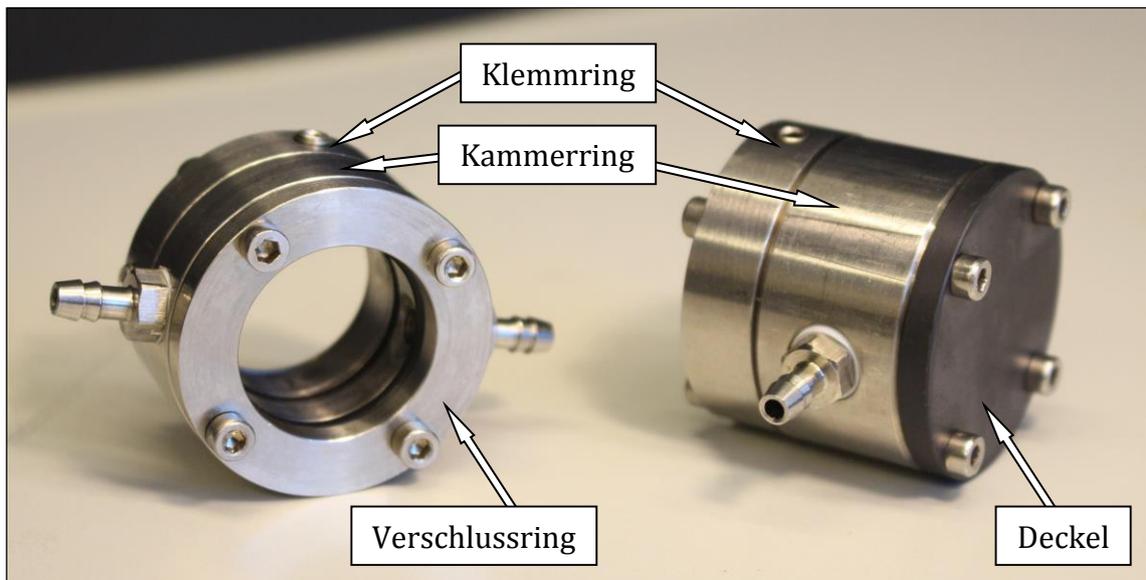


Abbildung 8: Ingold-Messkammer mit Verschlussring (links) und geschlossenem Deckel (rechts).

Für verschiedene Eindringtiefen des Lichts einer optischen Messung oder verschiedenen hohe Messspaltgrößen wird der Kammerring in unterschiedlichen Höhen gefertigt. So können die Kammern flexibel für die unterschiedlichen Sonden-Typen und Geometrien genutzt werden.

Auch die Messkammer für PG 13,5-kompatible Sonden kann in unterschiedlichen Höhen gefertigt oder die zentrale Bohrung für andere Innenvolumina angepasst werden. Abbildung 9 zeigt die Messkammer für PG 13,5-Sonden ohne den montierten Deckel, wodurch die freiliegende Messsonde innerhalb der Kammer sichtbar ist.

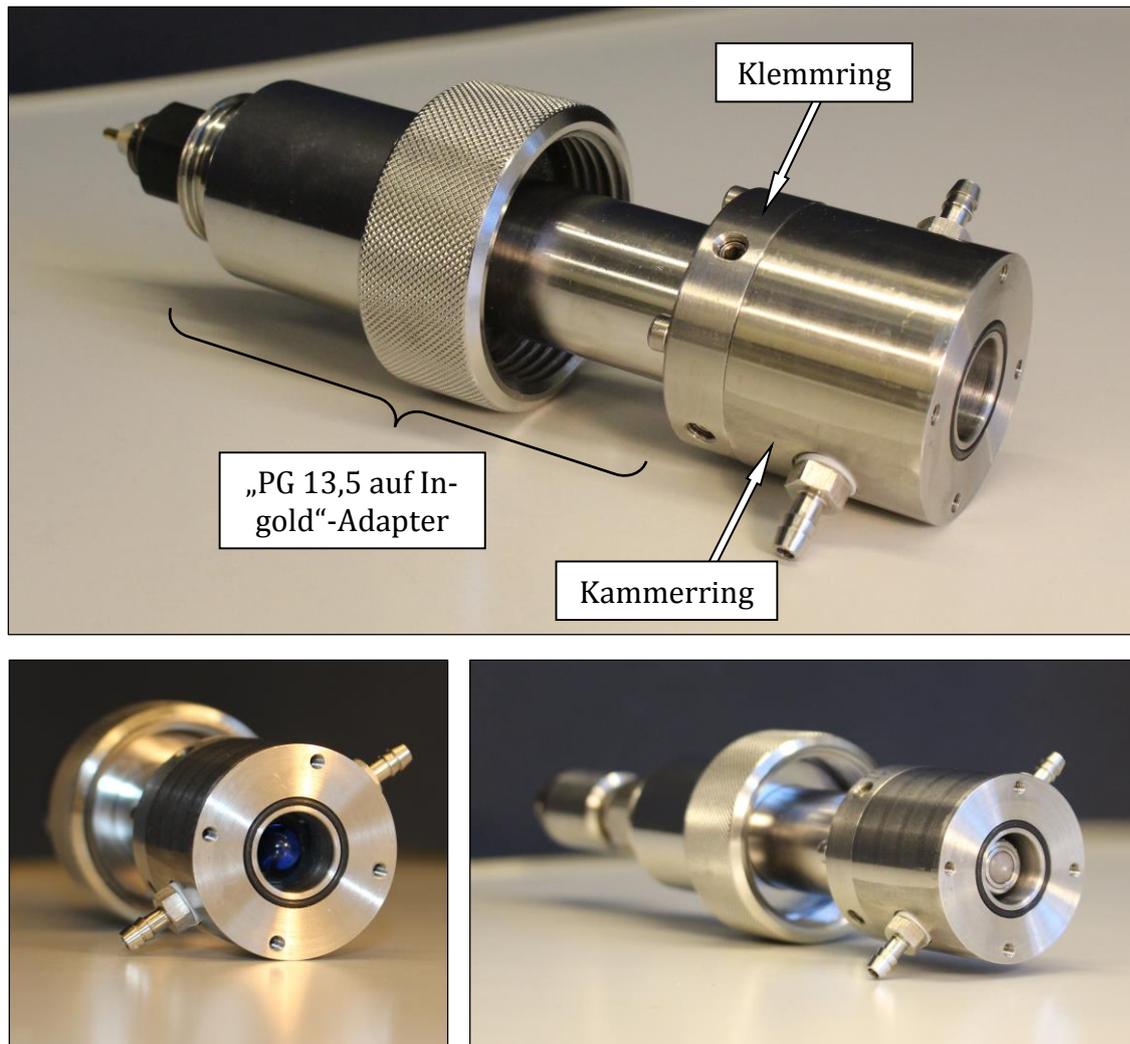


Abbildung 9: Seitliche Ansicht (oben) der Messkammer für PG 13,5-Sonden. Mit eingebauter pH-Sonde (unten, links) und pO₂-Sonde (unten, rechts). In allen Ansichten fehlt der geschlossene Deckel um die eingepassten Sonden sichtbar zu machen.

Durch das modulare Konzept müssen nur Einzelkomponenten für neue Messsonden ausgetauscht werden. Beispielsweise wird für einen 7 mm hohen Messspalt eines ISM ein 10 mm hoher Kammerring mit Verschlussring platziert (siehe Abbildung 35). Beim BioView hingegen findet die Messung nicht an einem Messspalt statt und das Licht muss tiefer in die Probe eindringen, weshalb in einem solchen Aufbau ein 20 mm Kammerring mit einem geschlossenen Deckel zum Einsatz kommt (siehe Abbildung 29). Der Klemmring ist allerdings bei beiden Varianten identisch.

Ebenfalls zum modularen Konzept gehört die Möglichkeit mehrere Bypass-Messkammern in Reihe zu betreiben und somit über nur einen Anschluss mehrere Sonden an ein System anzuschließen.

Neben der Auslegung der Messkammern für Standard-Sonden klassischer STR-Reaktoren, erfolgten außerdem Anpassungen an andere Messprinzipien. Durch die Nutzung von Glas für den Verschluss des Kammerrings können spektroskopische Durchlichtmessungen erfolgen. Dadurch ist es zudem möglich Sensorpatches an einer solchen Glasscheibe anzubringen. Ein spezieller Deckel mit SMA-Verschraubungen ermöglicht die Messung mit diesen Spots im Bypass. Zusätzlich ist die zentrale Öffnung der Kammer modifiziert worden, um das Kammervolumen zu minimieren. Abbildung 10 zeigt diese Variante.

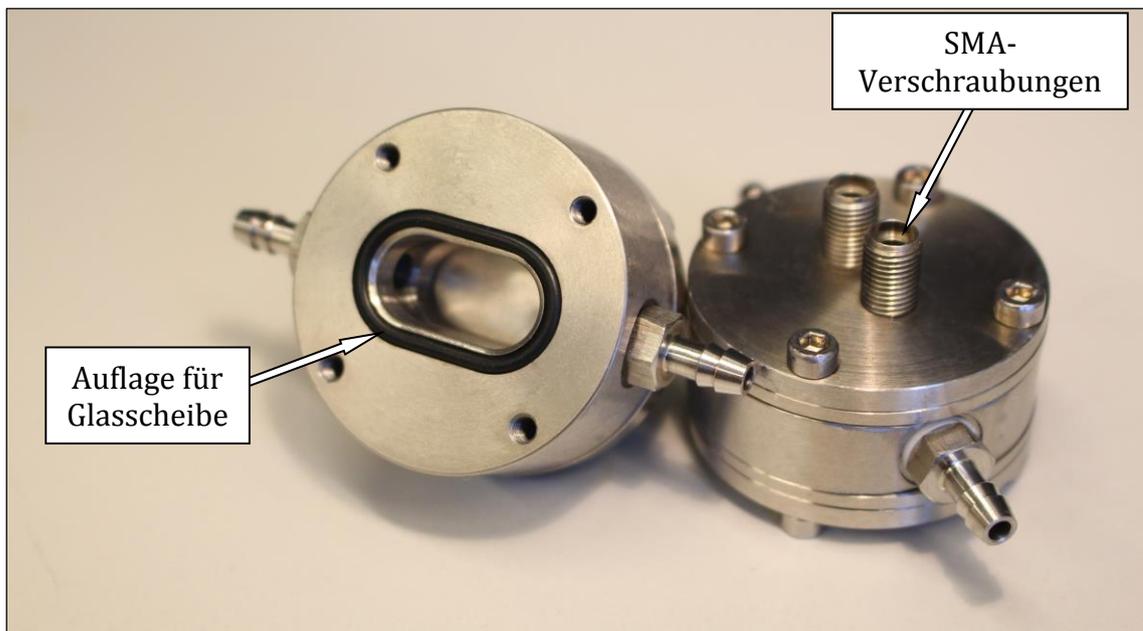


Abbildung 10: Messkammer für Sensorpatches. Der Deckel verfügt über SMA-Verschraubungen für die direkte Anbindung von Lichtwellenleitern. Auf der darunterliegenden Glasscheibe können die Patches platziert werden.

3.2 Anwendungsbeispiele

3.2.1 Messungen der Sauerstoffaufnahme im Bypass

Die in Abbildung 10 präsentierte Variante der Messkammer mit pO_2 -Messspots (nicht in der Abbildung dargestellt) kann für eine Bypass-Messung der Sauerstoffaufnahme (OUR) von diversen Organismen genutzt werden.

Die Zell- oder Bakteriensuspension wird aus dem Reaktor in die Bypass-Messkammer gefördert. Anschließend werden die Schläuche am Ein- und Ausgang der Kammer verschlossen, wodurch kein Sauerstoff in die Kammer gelangen kann. Die anschließende pO_2 -Messung über einen definierten Zeitraum gibt einen Aufschluss über die Verbrauchsgeschwindigkeit bzw. die Sauerstoffaufnahme und somit der metabolische Aktivität der Organismen. Dieser Messwert kann beispielsweise für die Prozessregelung eingesetzt werden. [20]

3.2.2 Rekalibrierung eines Systems

In großen industriellen Bioprozessen müssen die eingesetzten optischen Sonden, wie beispielsweise pH- oder pO_2 -Patches, regelmäßig nachkalibriert werden, um einen möglichen Signal-Drift zu korrigieren.

Mit der PG 13,5-Messkammer kann zusätzlich eine klassische Ausführung der Sonden im Bypass betrieben und die resultierenden Signale direkt für eine Nachkalibrierung genutzt werden.

3.2.3 *Continuous Manufacturing*

Continuous Manufacturing spielt in den letzten Jahren eine immer größere Rolle für die Produktion von hochwertigen Wirkstoffen oder anderen biotechnologischen Produkten. Das grundlegende Prinzip ist eine direkte Verbindung des *Up-* und *Downstream Processing*. Hierfür kann die Kultivierung kontinuierlich, beispielsweise mit Zellrückhaltungssystemen (beispielsweise ein Plattensedimenter siehe Kapitel 5.2.2.1) erfolgen. Dabei wird der entnommene Zellkulturüberstand gemeinsam mit dem gebildeten Produkt kontinuierlich der Aufarbeitung zugeführt. In einem solchen hochkomplexen und verschachtelten Aufbau spielt die verwendete

Messtechnik für die Automatisierung und Prozessintelligenz eine entscheidende Schlüsselrolle. [21, 22]

So ist es möglich Messkammern zwischen den einzelnen Aufarbeitungsschritten zu integrieren und die Menge an Protein über UV-Vis- oder 2DF-Spektroskopie zu überwachen. Es können Messungen durchgeführt werden, die eine Auskunft über die Reinheit geben und für eine Regelung der Dauer oder Häufigkeit einer chromatographischen Aufreinigung genutzt werden. Auch die Zellabtrennung vor der Aufarbeitung kann über eine Streulichtmessung in einer Messkammer überwacht und gegebenenfalls angepasst werden.

4. Automatisierung der Probenahme und Bypass-Analytik

Durch Automatisierung von Prozessen und Abläufen ist es möglich diese mit geringerem Zeitaufwand reproduzierbar durchzuführen. Bei biotechnologischen Prozessen gibt es viele Teilschritte, die automatisierbar sind und somit insgesamt effizienter gestaltet werden können. Wichtig ist die Überwachung eines Prozesses anhand vieler Proben, die nach automatischer Probenahme analysiert und dokumentiert werden.

Für das Ziel der Automatisierung eines solchen Vorgangs müssen zuerst geeignete Komponenten für die Durchführung ausgewählt werden. Das Hauptziel bei einer automatischen Probenahme ist es, eine repräsentative Probe aus dem Reaktor zu erhalten ohne dabei die Sterilität des Prozesses zu gefährden. Im Folgenden werden die für die Probenahme ausgewählten Bauteile und Komponenten erläutert und diskutiert.

4.1 Stand der Technik der automatisierten Probenahmen

Der Vorgang der sterilen Probenahme stellt immer noch eine Herausforderung in der Biotechnologie dar. Trotz vorhandener kommerzieller Lösungen erfolgt die regelmäßige Beprobung eines Bioreaktors in der Regel manuell [23]. Keines der bereits entwickelten Systeme konnte sich zum weitläufig verbreiteten Laborstandard entwickeln.

Die Automatisierung von Prozessen und Abläufen bietet viele Vorteile. So werden die Mitarbeiter entlastet, wenn beispielsweise eine hohe Probendichte für die Erstellung chemometrischer Modelle benötigt wird. Eine so realisierbare höhere Probenfrequenz sorgt zudem für eine höhere Auflösung von Dynamiken innerhalb eines Prozesses. Zusätzlich wird durch die Automatisierung eine reproduzierbare

Prozedur geschaffen, welche im Gegensatz zu den manuellen Tätigkeiten keinen methodischen Fehlern unterliegt. Die automatische Entnahme einer Probe erfolgt jedes Mal exakt identisch.

Es sind verschiedene Konzepte und Systeme bekannt, welche die Beprobung eines Reaktors automatisieren. Der BaychromAT® (Bayer Technology Services, Leverkusen) entnimmt beispielsweise Proben aus einem dampfsterilisierbaren Ventil und transportiert diese direkt zu diversen Analysatoren [23–25]. Die Probe wird im System aufgenommen und kann individuell weiterverarbeitet werden. Somit findet die Entnahme, Probenvorbereitung, Analytik und Dokumentation gesteuert von einem System statt. Das Probenvolumen ist von der gewünschten Analytik abhängig. Bei der Verwendung eines Zellzählers und eines biochemischen Analysators beträgt das Probenvolumen knapp 15 mL. Der große Nachteil, welcher einer flächendeckenden Vermarktung entgegen wirkt, sind die sehr hohen Anschaffungskosten und die Abhängigkeit von Technikern, die den Ablauf der Probenahme genau abstimmen und gegebenenfalls anpassen müssen. Dadurch ist das System für den Endanwender äußerst unflexibel und Anpassungen an neue Systeme sind kaum selbst realisierbar.

Ein anderes Konzept der Firma TRACE Analytics (Braunschweig) verwendet spezielle Dialyse- oder Filtrationssonden in Kombination mit einem Analytik-Modul (TRACE C2), um die Probe direkt über amperimetrische Messmethoden auf bestimmte Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen hin zu untersuchen. Durch die Verwendung der Sonden ist lediglich die Entnahme einer zellfreien Probe möglich. Das benötigte Probenvolumen ist im Bereich von 0,5 bis 20 mL flexibel einstellbar. [26]

Ein anderer Ansatz kombiniert die automatische Beprobung eines Reaktors mit einem autarken Robotersystem. Die Probenahme erfolgt über ein spezielles Reaktorventil, an dem Schläuche für die Entnahme und anschließende Dampfsterilisation angeschlossen sind. Ein Probensammler bewegt den Schlauch zwischen Kondensat-Position und den Proberöhrchen. Nach erfolgter Probenahme transportiert ein Roboter die Probe in einem Raum zu unterschiedlichen Geräten wie beispielsweise einer Zentrifuge für die Probenvorbereitung und daraufhin zu den Analysatoren. Anders als beispielsweise beim BaychromAT ist hierbei zwar keine physikalische

Verbindung der Probenahme mit den Analysatoren nötig, dafür aber ein vergleichsweise aufwändiges Anlernen des Roboters erforderlich. Das Probenvolumen ist ebenfalls stark von der anschließenden Analytik abhängig. [27]

4.2 Konzept und Ablauf der neu entwickelten Probenahme

Das grundlegende Konzept und der Aufbau der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Probenahme ist in Abbildung 11 veranschaulicht.

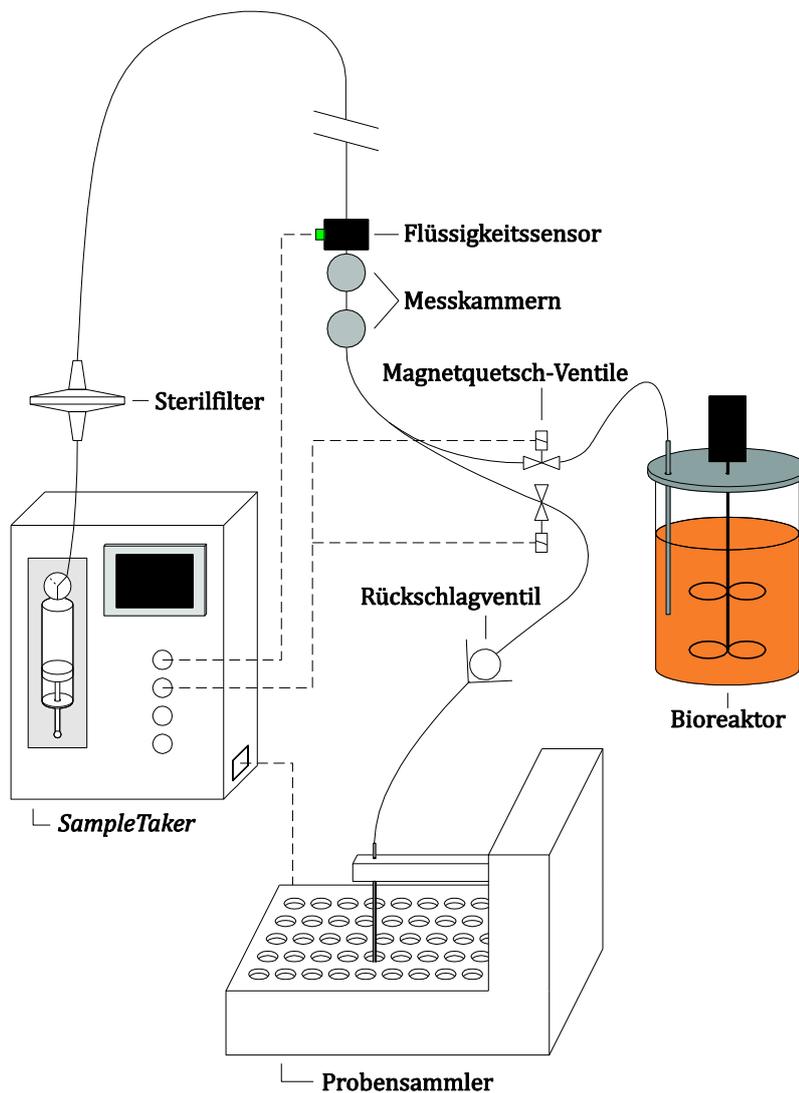


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Probenahme mit der Automatisierungsplattform (*SampleTaker*). Der Aufbau zeigt exemplarisch zwei aufeinanderfolgende Messkammern. Die durchgezogenen schwarzen Linien stellen Silikonschläuche dar, die gestrichelten Linien symbolisieren die jeweilige Steuerung über die Kommunikationsschnittstelle (*ComBox*).

Das hier entwickelte Konzept nutzt einen neuen Ansatz für die Entnahme von Proben und behandelt speziell die Problematik der Integration einer größeren Anzahl an standardisierten Sonden in unterschiedliche Prozesse. Dabei fungiert das Messkammer-Prinzip als ein sequentieller Bypass, indem klassische *inline* Sonden betrieben werden können (siehe Kapitel 3).

Eine Probe wird über einen reaktorspezifischen Probenahme-Port (siehe Kapitel 4.4) mit Hilfe einer Spritzenpumpe aus dem Reaktor entnommen und durch die optionalen Messkammern geleitet. In den Messkammern findet die jeweilige Analyse der Probe statt, während sich die Probe selbst weiter in Bewegung befindet. Ist die sequentielle Bypass-Analytik beendet, wird der Probenfluss umgekehrt, woraufhin zwei Wegstrecken möglich sind. Zum einen kann die Probe direkt zurück in den Reaktor transportiert werden, wodurch eine volumenverlustfreie Messung möglich ist. Zum anderen kann die bereits vermessene Probe umgeleitet und in einem gekühlten Probensammler aufgefangen werden. Hierfür wird an einer Gabelung der Schläuche das Magnetquetschventil zum Reaktor geschlossen und anschließend durch Öffnen des Ventils zum Probensammler die Flüssigkeit mit der Spritzenpumpe zu diesem transportiert.

Für einen sterilen Betrieb dieser Bypass-Lösung an einem Bioprozess kann sämtliche externe Peripherie, wie z.B. die Schlauchsysteme und die Messkammern, separat im Autoklav sterilisiert werden. Die Messkammern sind konstruktiv für die Dampfsterilisation und den anschließenden sterilen Betrieb ausgelegt (siehe Kapitel 3.1).

Die Spritzenpumpe kommt nicht mit der Probe in direkten Kontakt, sondern sorgt über die Bewegung der Luft im Schlauchsystem für den Probentransport. Über die Pumpe wird eine Geschwindigkeit von $7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ realisiert. Hierdurch wird ein möglichst geringer Scherstress bei möglichst schneller Probenahme erzeugt.

Die Dauer des gesamten Ablaufs der Probenahme ist abhängig von der jeweiligen Analytik im Bypass. Bei der Messung mit ISM und BioView beträgt die benötigte Zeit ungefähr 15 Minuten. Dies bedeutet gleichzeitig, dass Änderungen durch Reaktionen, die schneller als die Dauer einer Probenahme erfolgen, mit diesem System nicht erfasst werden können. Jedoch ist der Zeitraum von 15 Minuten zwischen zwei Proben für die Überwachung von Tierzellkultivierungen ausreichend klein.

Der hier beschriebene Ablauf der Probenahme besitzt einen weiteren Vorteil gegenüber einem kontinuierlichen Bypass. Durch den sequentiellen Bypass ist ein klarer Probenzeitpunkt definiert, sodass keine Mischzeiten innerhalb der Messkammer berücksichtigt werden müssen. Vielmehr wird exakt die Probe, welche in der Messkammer vermessen wird, auch im Probensammler für spätere Referenzanalytik gelagert.

Während die ausschließliche Messung im Bypass mit anschließendem Rücktransport in den Reaktor volumenverlustfrei erfolgt, kann das Probenvolumen für die Lagerung im Probensammler frei gewählt werden. Für den Vorlauf und das Totvolumen des Schlauches zum Probensammler werden zusätzlich 5 mL benötigt.

Der Ablauf einer Probenentnahme und Messung im Bypass ist für eine anschaulichere Erläuterung als Video dokumentiert. Über Abbildung 12 ist dieses Video im Internet abrufbar.

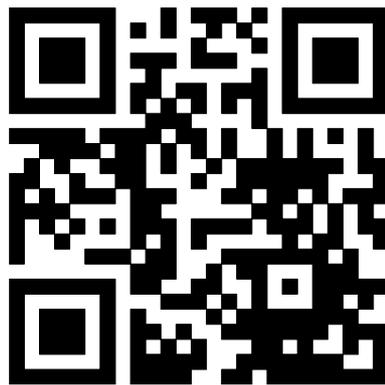


Abbildung 12: Dieser QR-Code führt zu einem Video, welches den Ablauf der Probenahme zeigt. Bitte mit entsprechender Smartphone App scannen.
Link: <http://youtu.be/nzdRFK0ZrPQ>

4.3 Bauteile der Probenahme

4.3.1 Automatisierungsplattform

Die Automatisierungsplattform, im Folgenden als *SampleTaker* bezeichnet ist ein Gehäuse, indem die für die Probenahme benötigten Komponenten vereint sind. Hierzu gehören der Steuerungsrechner, die Spritzenpumpe, mehrere Relais, zwei Netzteile, ein Ethernet-Switch und externe Anschlussmöglichkeiten für weitere

Komponenten. Dadurch kann das System flexibel verwendet und direkt am jeweiligen Reaktor eingesetzt werden. Abbildung 13 zeigt das System im geschlossenen und geöffneten Zustand.

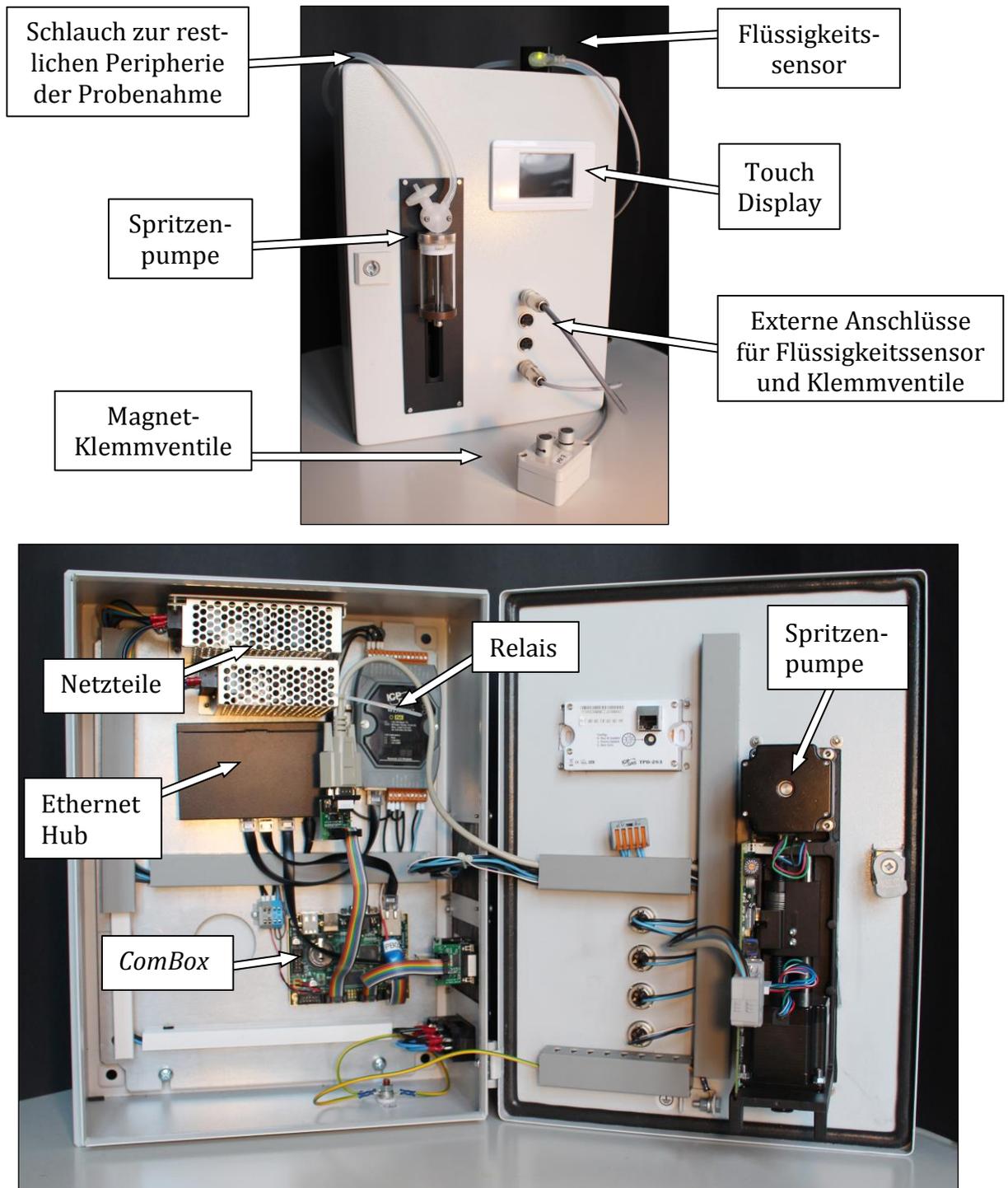


Abbildung 13: *SampleTaker* im geschlossenen (oben) und geöffneten (unten) Zustand. In der unteren Darstellung sind die intern verbauten Komponenten sichtbar.

Die Grundlage der entwickelten Automatisierungsplattform stellt ein in das System integrierter Rechner dar, ein sogenanntes *Embedded System*, welcher die Steuerung aller Komponenten gewährleistet. Dieser kompakte Rechner verfügt über eine Linux-Entwicklungsumgebung und bietet gleichzeitig viele Schnittstellen wie Ethernet, USB und serielle Schnittstellen für die Kommunikation mit anderen Geräten. Weiterhin ermöglicht die Linux-Grundlage die einfache Implementierung aller gängigen Protokolle und Funktionserweiterungen für die Anbindung der Geräte und Komponenten.

Die Laborumgebung bietet eine äußerst heterogene und herausfordernde Geräte-Landschaft. Viele Labore besitzen sowohl alte als auch moderne Geräte und Analysatoren, welche entsprechend ihres Alters verschiedene Schnittstellen und Protokollen für die Kommunikation und Datenspeicherung verwenden. Das frei anpassbare und erweiterbare Linux-System bietet die Möglichkeit flexibel an die Geräte adaptiert zu werden. Im Folgenden wird das *Embedded System* als *ComBox* betitelt, da es die zentrale Kommunikationsschnittstelle zwischen allen Geräten darstellt.

Als Programmiersprache für die Prozessabläufe wurde Python ausgewählt. Diese universelle Sprache ermöglicht nicht nur eine betriebssystemunabhängige Entwicklung, sondern auch die Implementierung und Nutzung großer Bibliotheken mit Funktionen und Protokollen. [28, 29]

Die Kommunikation mit dem BioView und dem ISM wurde in die *ComBox* integriert. Das BioView wird über einen sogenannten *Embedded Ethernet Device Server* angesprochen, an diesen Server kann das BioView über eine serielle Schnittstelle angeschlossen werden. Der Server wiederum ist über das Netzwerk erreichbar, sodass die *ComBox* die Befehle über das Netzwerk an den BioView senden und die Antworten empfangen kann. Das ISM benötigt eine eigenständige Software, welche die Motoren und die Bildaufnahme steuert. Für die Anbindung an die *ComBox* wurde diese Software um eine TCP/IP-Schnittstelle erweitert. Dadurch kann ebenfalls eine direkte Kommunikation über das Netzwerk erfolgen.

Ein Ethernet-Switch sorgt für die Anbindung der benötigten Komponenten und die interne Vernetzung. Auf der Vorderseite des *SampleTaker* ist eine Tecan Spritzenpumpe für die Flüssigkeitsbewegung und ein Touchscreen für Ausgabe und

Interaktion verbaut. Zudem befinden sich auf der Vorderseite Anschlüsse für die ausgelagerten Sensoren und Ventile. Auf der Front und der rechten Seite des *SampleTaker* sind diverse Schnittstellen nach außen gelegt, um flexibel andere Komponenten, wie beispielsweise Peristaltikpumpen, anzubinden.

4.3.2 Spritzenpumpe für kontaktlosen Probentransport

Das grundlegende Konzept der Probenahme besteht darin, dass eine definierte Probenmenge aus dem Reaktor herausgeleitet, in einer Messkammer beispielsweise spektroskopisch vermessen und daraufhin in den Reaktor zurück geführt oder in den Probensammler umgeleitet wird. Um dieses Konzept zu realisieren, wurde eine Spritzenpumpe ausgewählt, welche über ein Unterdruckprinzip die treibende Kraft für alle Flüssigkeitsbewegungen im System erzeugt. Im Vergleich zu einer Peristaltikpumpe hat diese die Vorteile eine pulsationsfreie Förderung zu ermöglichen und ist nicht auf spezielle Pumpschläuche angewiesen. Die Ankopplung an das restliche System erfolgt mit einem 0,2 µm Sterilfilter, welcher an dieser Stelle eine der Sterilgrenzen darstellt (siehe Kapitel 4.3.6).

4.3.3 Magnetventile für die Flüssigkeitsführung

Mit Hilfe von extern ansteuerbaren Magnetklemmventilen wird die Schlauchstrecke der Probe vorgegeben. Diese Ventile klemmen im ausgeschalteten Zustand einen Silikonschlauch ein (*normally closed*). Wenn das Schaltsignal erfolgt, wird dieser Klemmvorgang magnetisch unterbrochen, sodass die Probe den jeweiligen Schlauch passieren kann. Zwei Magnetklemmventile kommen zum Einsatz, um zwischen den Wegen zur Analytik oder zur Probenaufbewahrung umzuschalten.

4.3.4 Autosampler als Probensammler

Der Autosampler wird verwendet, um optional eine im Bypass vermessene Probe auch außerhalb des Reaktors zu lagern. Diese Proben können anschließend mit geeigneter *offline* Analytik vermessen werden. Der Probensammler verfügt über ein mit Peltier-Element gekühltes Gestell, indem eine Abkühlung der Proben auf 4 °C erfolgt. Die Kühlung einer 37 °C warmen Probe auf eine Temperatur von 4 °C

benötigt ungefähr 20 Minuten. Durch diesen Vorgang ist eine längere Lagerzeit realisierbar, ohne einen mikrobiellen Bewuchs in den nach der Entnahme unsterilen Proben zu erhalten (siehe Kapitel 5.2 für eine detaillierte Betrachtung der Lagerfähigkeit von Zellkulturproben).

4.3.5 Flüssigkeitssensor

Der Einsatz eines Ultraschall-Flüssigkeitssensors ermöglicht eine flexible Probenahme in unterschiedlichen Systemen. Wie in Abbildung 11 ersichtlich ist, wird dieser Sensor direkt auf dem Schlauch nach den Messkammern platziert. Hierdurch wird der Zeitpunkt ermittelt, ab dem die Kammern komplett mit Probe gefüllt sind und die jeweiligen Analysatoren extern über die *ComBox* gestartet werden können. Die Strecke bis zu dem Flüssigkeitssensor ist somit variabel anpassbar, ohne dass eine Änderung des generellen Ablaufskripts erfolgen muss.

Ursprünglich dient dieser Flüssigkeitssensor der Überwachung auf Luftblasen in einem Flüssigkeitsstrom, um so beispielsweise in Medizinprodukten die Patienten vor einer Luftembolie zu schützen. Durch eine werksseitige Rekonfiguration kann dieser auch für den umgekehrten Zweck eingesetzt werden, sodass der Sensor detektiert sobald eine Flüssigkeit den Schlauch passiert.

4.3.6 Gewährleistung der Sterilität

Die in Kapitel 3.1 erläuterte Sterilkonstruktion der Messkammer dient der optimalen Sterilisierbarkeit. Darüber hinaus sind im späteren Betrieb die Sterilgrenzen des Systems entscheidend für die Aufrechterhaltung der Sterilität.

Eine Betrachtung des schematischen Aufbaus (Abbildung 11) zeigt die zwei entscheidenden Positionen der Sterilgrenze. Dazu gehört zum einen ein 0,2 μm Sterilfilter, welcher die Spritzenpumpe mit dem Schlauchsystem verbindet und zum anderen ein Rückschlagventil, welches vor dem Probensammler platziert ist.

Der Sterilfilter gestattet es über ein Unterdruckprinzip mit der Spritzenpumpe die Flüssigkeitsbewegung im Schlauchsystem zu realisieren. Somit ist die Luft für den Aufbau des Druckes immer steril und kann auch für das Zurückdrücken der Probe in den Reaktor genutzt werden.

Die zweite Sterilgrenze befindet sich vor dem Probensammler. Da der Autosampler nicht sterilisierbar ist, kann die Probe selbst nur unsteril entnommen werden. Um ein Zurückspülen dieser unsterilen Probe zu verhindern, ist ein Rückschlagventil verbaut.

Sowohl der Sterilfilter, als auch das Rückschlagventil werden im montierten Zustand zusammen mit den Schläuchen autoklaviert. Die Peripherie mit den Schläuchen und Messkammern wird bei einem 2 Liter Reaktor zusammen mit diesem im Autoklaven sterilisiert. Bei einem 15 Liter Reaktor sind die Schläuche an einem separaten Probenahme-Ventil gekoppelt. In Kapitel 4.4 werden die beiden Probenahme-Ports detailliert dargestellt. Optional kann zudem ein Schlauchschweißgerät für die nachträgliche sterile Ankopplung genutzt werden.

Die Verbindung der Spritzenpumpe mit dem Sterilfilter erfolgt über einen Silikon Schlauch. Das Rückschlagventil wird nach dem Autoklavieren über einen Luer-Lock-Anschluss an den Probensammler angeschlossen.

Die klassische Sterilgrenze eines Bioprozesses, welche lediglich den Reaktor bis hin zur Begasung beinhaltet, wird in diesem Aufbau um den Bypass und die Messkammern erweitert.

4.4 Reaktorspezifische Probenahme-Ports

Die sterile Entnahme einer Probe erfolgt bauartbedingt bei jedem Reaktortyp auf unterschiedliche Art und Weise. Ein kleinerer Glasreaktor besitzt lediglich Zugänge über den Deckel, über welchen dadurch auch die Probe mit Hilfe eines Steigrohrs entnommen werden muss. Bei größeren Edelstahlreaktoren müsste ein Steigrohr unnötig lang und dadurch mit relativ großem Totvolumen ausgeführt sein. Aus diesem Grund besitzen diese Systeme die seitlichen Ingold-Ports. Für die manuelle Probenahme sind entsprechende dampfsterilisierbare Probenahme-Ventile verfügbar.

4.4.1 Probenahme im 2 Liter Glasreaktor

Im 2 Liter Glasreaktor erfolgt die manuelle Probenahme über einen mit Septum verschlossenen Anschluss am Ende eines Steigrohres. Hierbei ist das Septum in moderner Ausführung direkt mit selbst verschließendem Luer-Lock-Anschluss als

Rückschlagventil ausgestattet. Das Anbringen einer sterilen Luer-Lock-Spritze erfolgt unter vorherigem Einsprühen mit Isopropanol (70 %ig). Aufgrund der unsterilen Verbindung, darf verbleibende Flüssigkeit nicht in den Reaktor zurückgedrückt werden.

Für die Automatisierung ist an dem Steigrohr die Verschlauchung zusammen mit den optionalen Messkammern angekoppelt und wird gemeinsam mit dem Reaktor im Autoklav sterilisiert. Alternativ können die Schläuche mit einem Schlauch-Schweißgerät separat autoklaviert und anschließend steril an die Schläuche des Reaktors angeschweißt werden.

Durch diese beiden Vorgehensweisen ist der Reaktorinhalt direkt über das Steigrohr steril mit den Messkammern und der Probenahme verbunden.

4.4.2 Probenahme im 15 Liter Edelstahlreaktor

Bei einem Edelstahlreaktorsystem erfolgt die Probenahme über ein separat mit Dampf sterilisierbares Probenahme-Ventil, welches in einem der seitlichen Ingold-Ports verbaut ist.

Das im Rahmen dieser Arbeit neukonstruierte Ventil basiert auf dem Prinzip des kommerziell erhältlichen *Safe Coupling Valve* (Sacova-Ventil). Dieses Ventil besitzt einen geöffneten und einen geschlossenen Zustand. Im geöffneten Zustand ist das Ventil durchlässig und wird in dieser Position mit der angeschlossenen Peripherie im Autoklav sterilisiert. Unter sterilen Bedingungen kann das Ventil über eine Verschraubung geschlossen und in den Reaktor eingebaut werden. Anschließend erfolgt die SIP-Sterilisation des Reaktors gemeinsam mit dem verbauten Ventil. Sobald auch der Reaktor sterilisiert ist, kann das Ventil über die Verschraubung wieder geöffnet werden. Dadurch ist die sterile Peripherie über das Ventil mit dem sterilen Reaktor verbunden. Abbildung 40 zeigt eine technische Zeichnung des am Prinzip des Sacova-Ventils adaptierten Probenahme-Ventil im geöffneten und geschlossenen Zustand.

Sowohl bei dem 2 Liter, als auch bei dem 15 Liter Reaktoren besteht eine dauerhafte Verbindung des Ports mit der Probenahme, ohne eine Sterilisation oder Reinigung zwischen den Probenahme-Zyklen zu benötigen.

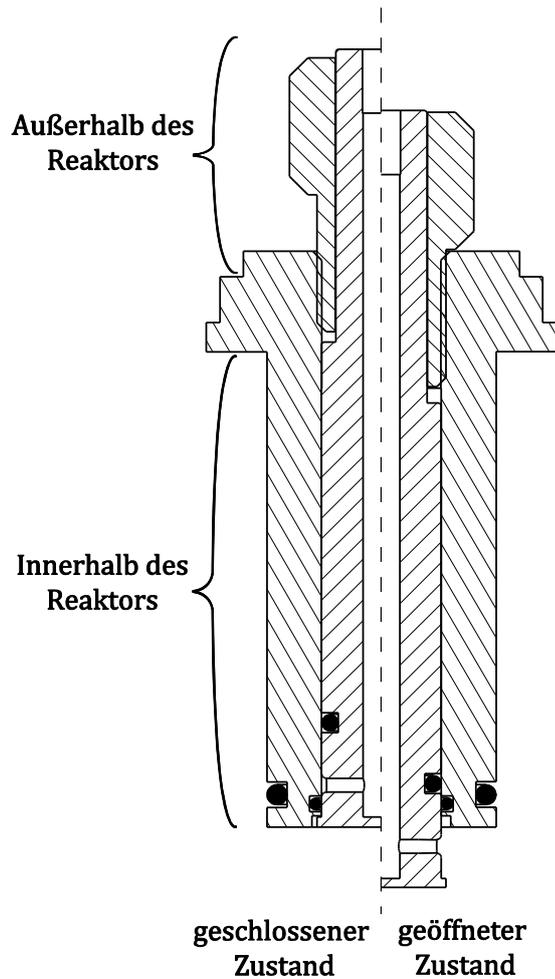


Abbildung 14: Technische Zeichnung des Probenahme-Ports des 15 Liter Reaktors. Auf der linken Seite ist der geschlossene und auf der rechten Seite ist der geöffnete Zustand dargestellt. Die schwarzen Kreise symbolisieren die jeweiligen O-Ringe.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 *Additive Manufacturing* für neue Konzepte in der Biotechnologie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde 3D-Druck eingesetzt um die Prototypenentwicklung der konstruierten Messkammern deutlich zu beschleunigen und die Geometrien zu optimieren. Um allerdings ein noch weitreichenderes Ziel, die individuelle Herstellung von Verbrauchsmaterialien zu erreichen, müssen die Bauteile wichtige Kriterien erfüllen. Zu diesen gehören chemische Beständigkeit, Biokompatibilität sowie die Eigenschaft Hitze- oder Strahlensterilisation ohne Veränderungen zu überstehen.

Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurden zwei verschiedene SLS-Materialien getestet, PA12 und PA12 UV. Das etablierte PA12 ist auf dessen Biokompatibilität getestet und besitzt eine U.S. Pharmacopeia (USP)-Zertifizierung. Es dient als Referenz für die Experimente mit dem UV-stabilisierten Material. Um die UV-Stabilität des verbesserten PA12-Materials zu ermöglichen, wird vom Hersteller eine unbekannt Menge eines Antioxidationsmittels zum Pulver hinzugemischt.

Im Folgenden werden Experimente dargestellt, welche einen Fokus auf die Biokompatibilität haben. Die Polyamid-Bauteile sind dampfsterilisierbar, wenn sie zudem biokompatibel sind eignen sie sich unmittelbar für biotechnologische Zwecke. Alle Ergebnisse dieses Kapitels sind Teil von zwei bereits veröffentlichten Publikationen [15, 16].

5.1.1 Zellkultivierungen in Extraktionsmedium

Für eine erste Betrachtung der Biokompatibilität erfolgte die Herstellung eines Extraktionsmediums aus dem jeweiligen Materialpulver entsprechend der Norm ISO 10993-12:2012 (Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials) [30]. Die genaue Vorgehensweise der Extraktion

sowie aller weiteren Experimente ist in Kapitel 8.2.3 im Anhang erläutert. Ein Vergleich der Zellzahl aus den Kultivierungen in Extraktionsmedium mit einer Kultivierung in unbehandeltem Medium gibt Aufschluss über mögliche Beeinflussungen durch sogenannte *leachables* aus dem Material [31].

Als adhärenzte Modellorganismus für die Biokompatibilitätstests sind Epithelzellen (A549) und Fibroblasten (NIH-3T3) kultiviert worden. Um mögliche toxische Effekte detektieren zu können, wurden die Zellen sowie der Zellüberstand mit drei verschiedenen Assays analysiert. Zum Einsatz kamen ein CTB-Assay, welcher die Zellvitalität über ihre metabolische Aktivität bestimmt sowie ein LDH-Assay, welcher einen Aufschluss über die Menge an nekrotischen Zellen gibt. Zusätzlich erfolgte eine manuelle Zählung der Zellen. Die Ergebnisse des CTB-Assays sind in Abbildung 15 zusammengefasst.

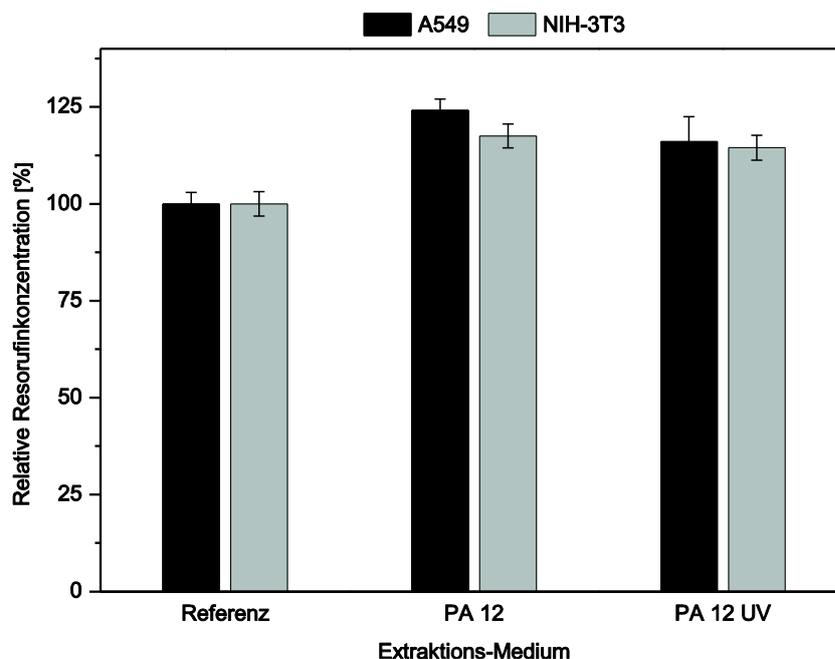


Abbildung 15: Relative Resorufin Konzentration nach der Kultivierung mit den eingesetzten Extraktionsmedien. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt mit je vier Replikaten innerhalb jedes Experiments.

Mit dem CTB-Test wird indirekt die metabolische Aktivität der Zellen vermessen, wodurch ein Aufschluss über die Zellvitalität möglich ist. Beide Zelllinien zeigen

dasselbe Verhalten, nachdem sie in dem Extraktionsmedium kultiviert wurden. Verglichen mit der Referenzkultur weisen beide Kultivierungen mit Extraktionsmedium eine leicht erhöhte metabolische Aktivität auf. Der Vergleich zwischen der PA12- und PA12 UV-Extraktionsmedium Kultivierung zeigen keine großen Variationen der viablen Zellen beider Zelllinien. Diese Variationen liegen beim PA12-Material bei maximal 6 % und beim PA12 UV-Material bei maximal 2 %.

Die Zellzählung desselben Experiments ist in Abbildung 16 zu sehen. Alle Kulturen erreichen vergleichbar hohe Zellkonzentration. Beide Kultivierungen mit Extraktionsmedium zeigen eine ähnliche Proliferation, die Abweichung der Zellzahl fällt gering aus. Die Zellkonzentration der A549-Zellen kultiviert im PA12-Extraktionsmedium unterscheidet sich im Vergleich zum PA12 UV-Extraktionsmedium um lediglich 1 %. Bei den NIH-3T3-Zellen fällt ein höherer Messfehler bei der Messung der Zellen im PA 12 UV-Extraktionsmedium auf, hier liegt die Zellkonzentration im PA 12 UV-Extraktionsmedium 13 % höher.

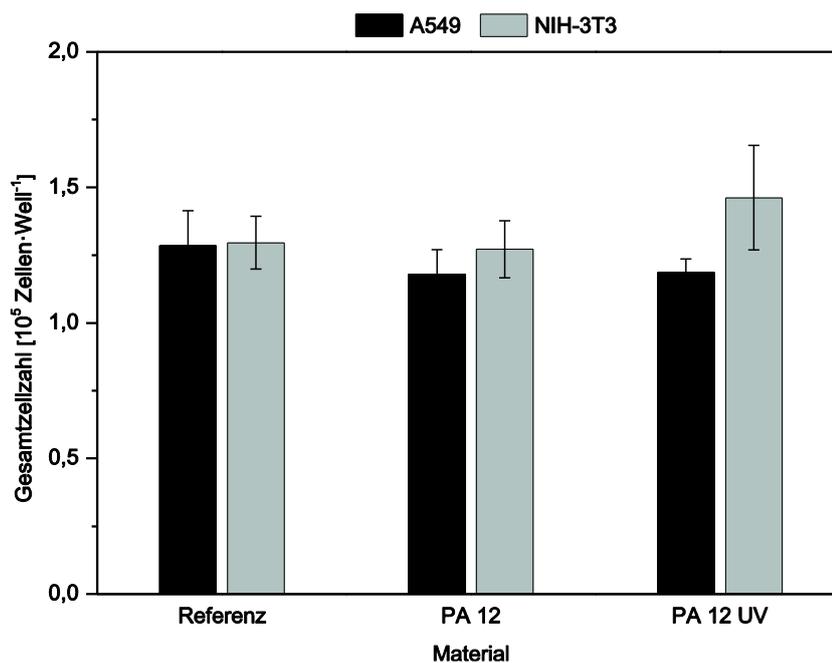


Abbildung 16: Absolute Zellzahl je Well. Die Zählung erfolgte manuell mit einer Neubauerkammer. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt mit je vier Replikaten innerhalb jedes Experiments.

Die nach Zellyse freigesetzte LDH-Konzentration ist in Abbildung 17 dargestellt. Aufgrund der Lyse geben die Ergebnisse eine Aussage über die gesamte Zellkonzentration in einem Well. Die Ergebnisse lassen eine geringfügig niedrigere LDH-Freisetzung und dadurch geringere Zellzahl mit dem PA12-Extraktionsmedium erkennen sowie eine leicht höhere Zellzahl mit dem PA12 UV-Medium. Dieser Effekt ist bei den NIH-Zellen deutlicher zu erkennen, da diese in der Regel sensitiver auf toxische Substanzen reagieren als A549-Zellen [32].

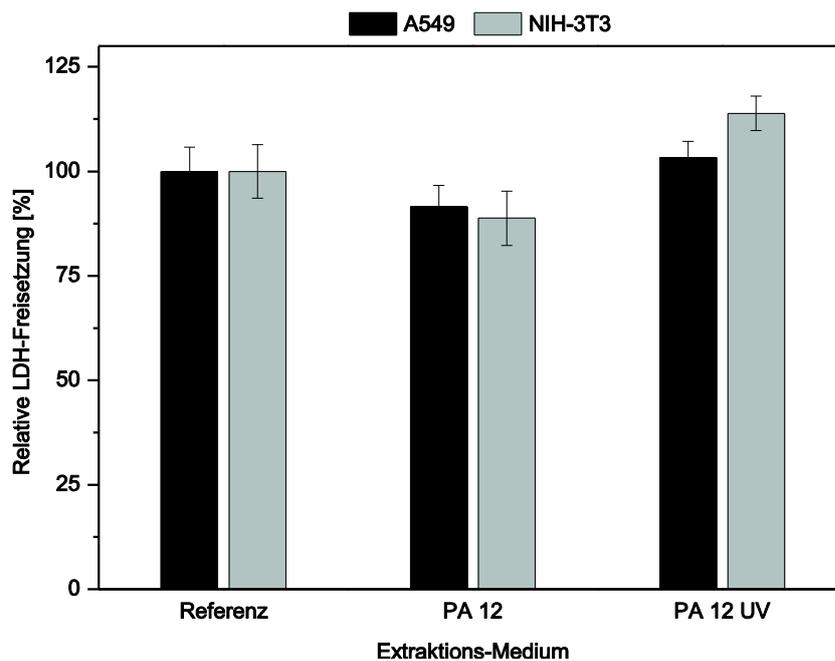


Abbildung 17: Relative LDH-Konzentration nach Zellyse. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt mit je vier Replikaten innerhalb jedes Experiments.

Für die Biokompatibilitäts-Tests mit Suspensionszellen sind CHO-K1-HP in 250 mL Schüttelkolben mit dem PA12- sowie dem PA12 UV-Extraktionsmedium kultiviert worden. Die Suspensionskultivierungen im Schüttelkolben erfolgten mit einem deutlich höheren Arbeitsvolumen als die adhärenen Kultivierungen in den Wellplatten. Aus diesem Grund konnte der Kulturzustand mit einem automatischen Zellzähler, welcher je Messung 1 mL Probenvolumen benötigt, überwacht werden. Die Verläufe der Kultivierungen sind in Abbildung 18 zu sehen.

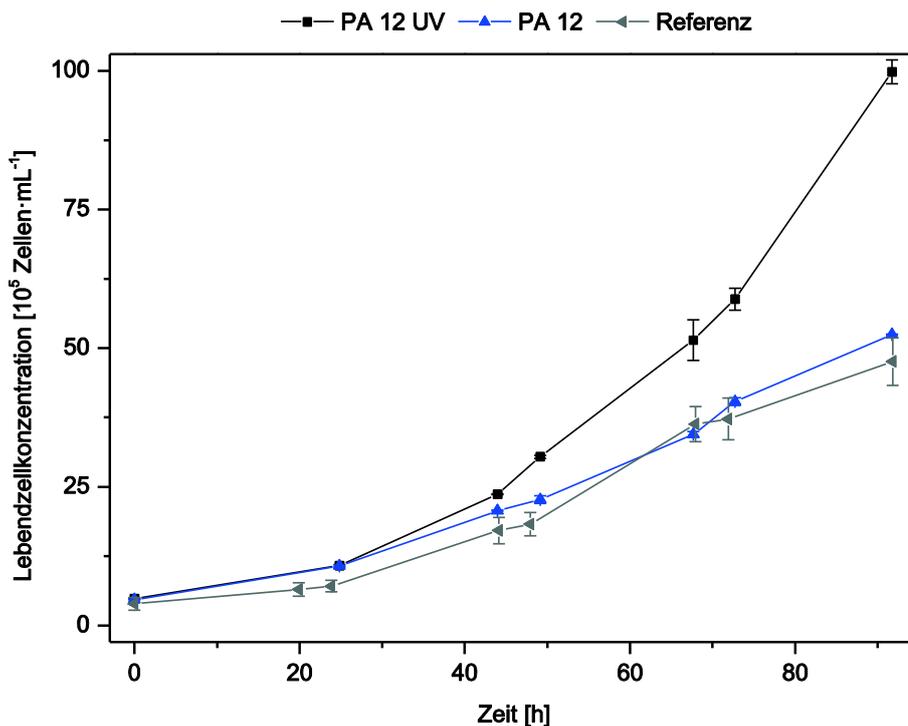


Abbildung 18: CHO-K1-HP Wachstumskurven der viablen Zellen (Mittelwerte aus zwei Parallel-Experimenten).

Alle Kulturen beginnen mit einer Zellkonzentration von $4,5 \cdot 10^5$ Zellen·mL $^{-1}$. Mit dem Extraktionsmedium, welches aus dem PA12 UV-Pulver hergestellt ist, resultiert das beste Zellwachstum. Verglichen mit dem PA12-Extraktionsmedium und der Referenz, ist die Zellkonzentration nach 96 h beinahe doppelt so hoch (um das 1,96 fache höher). Die Referenzkultur startete mit einer leicht verringerten Wachstumsgeschwindigkeit. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung, weisen die Kulturen mit dem Referenz- und dem PA12-Extraktionsmedium ein ähnliches Wachstum auf.

Sowohl in den Kultivierungen mit adhären-wachsenden, als auch in suspension-wachsenden Zellen konnte kein toxischer Effekt der Materialien festgestellt werden. Daher wird im Folgenden ausschließlich die Toxizität der gedruckten Wellplatten aus dem PA12 UV-Material gegen die Referenz getestet.

5.1.2 Zellkultivierung in 3D-gedruckten 24er-Wellplatten

Zusätzlich zu den Experimenten mit Extraktionsmedium, erfolgten Kultivierungen direkt in mit dem SLS-Verfahren gedruckten 24er-Wellplatten. Bei diesen Experimenten wurden sowohl ein längerer und intensiverer Kontakt zwischen den Zellen und dem Material als auch mögliche Veränderungen des Rohmaterials hinsichtlich der Biokompatibilität nach dem Prozessieren durch das 3D-Druck-Verfahren getestet.

Die gedruckte Wellplatte aus PA12 UV-Material wurde als exaktes Replikat der verwendeten Standard-Wellplatte entworfen, welche zur selben Zeit für die Referenz-Kultivierungen genutzt wurde.

Die Oberfläche der gedruckten Platte ist im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Varianten rauer, weshalb ein Ablösen der Zellen von der Oberfläche nicht vollständig möglich war. Aus diesem Grund wurde ausschließlich der LDH-Assay ohne Zelllyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Sie zeigen, dass die Wellplatte aus PA12 UV dieselbe Menge an aktiven Zellen nach der Kultivierungsdauer trägt. Dies gilt sowohl für die A549- als auch für die NIH-3T3-Zellen.

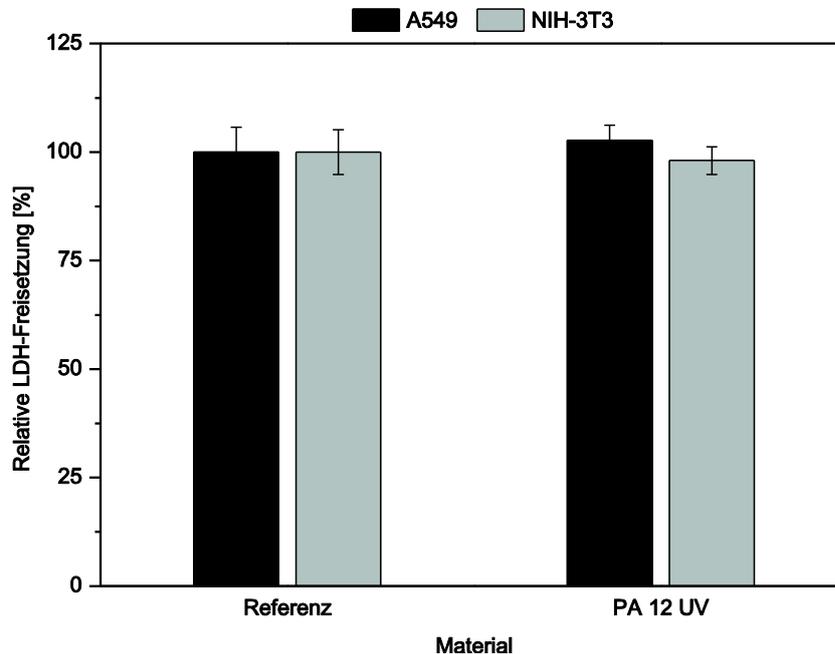


Abbildung 19: Relative LDH-Konzentration im Zellüberstand ohne Zelllyse. Die gezeigten Daten sind ein Durchschnitt aus vier Parallel-Experimenten.

5.1.3 Diskussion und Zusammenfassung der Materialtests

Die Kultivierungen mit dem Extraktionsmedium zeigten bei allen drei Zelllinien keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Auch die direkte Kultivierung der beiden adhärenen Zelllinien in 3D-gedruckten Wellplatten zeigte keine toxischen Effekte auf die Zellen.

Die beobachteten Ergebnisse unterstützen die bereits erteilte USP-zertifizierte Biokompatibilität des PA12-Materials. Die Experimente mit dem extrahierten PA12 UV-Material belegen auch dessen Biokompatibilität. Darüber hinaus zeigt das UV-stabilisierte Material einen positiven Effekt auf das Zellwachstum, da eine erhöhte Zellzahl der CHO-Kultivierungen beobachtet wurde.

Dieser Effekt beruht auf dem beigemischten Antioxidationsmittel, welche generell einen stabilisierenden Effekt auf Zellen haben. Somit unterstützt diese Beobachtung die Vermutung, dass oxidativer Stress ein nicht zu vernachlässigendes Problem in der Zellkultur darstellt und Nährmedien oft nur unzureichend mit solchen Radikalfängern supplementiert werden [33–35]. Dies erklärt warum die Zellkulturen eine erhöhte Proliferation in den mit Antioxidationsmittel angereicherten Medien aufweisen. Bei den Kultivierungen von adhärenen Zellen in Wellplatten, ist kein ähnlicher Effekt auf das Wachstum zu sehen. Der Grund hierfür ist der reduzierte Sauerstoffeintrag in die stationären Wellplatten im Vergleich zu den orbital geschüttelten Kolben. Der höhere Sauerstofftransfer im Schüttelkolben kann zu größeren Mengen an Sauerstoffradikalen im Medium führen. Somit zeigt sich in diesem Experiment ein positiver Effekt der Radikalfänger auf die Zellen. Die Abwesenheit von Sauerstoffradikalen in den nicht geschüttelten Wellplatten verdeutlicht warum keine Unterschiede in der Zellzahl zwischen den Kultivierungen mit dem PA12- und dem PA12 UV-Extraktionsmedium auftreten.

Zusammenfassend zeigt das PA12 UV-Material gleiche und in Bezug auf die erhöhte Zellzahl sogar bessere Ergebnisse als das bereits USP-Zertifizierte PA12-Material. Dies unterstützt die zukünftige Verwendung des neuen UV-stabilen Materials und unterstützt die Biokompatibilität des unbehandelten PA12-Materials. Die Eignung dieses Materials zeigt exemplarisch die Evaluation für weitere neue Materialien, die in Zukunft als geeignete Kandidaten für den Einsatz im Labor dienen können.

Ein zukünftiger Punkt für Optimierungen stellt die Materialdichtigkeit dar, denn eine Hauptproblematik bei gesinterten Bauteilen ist die zum Teil relativ poröse Struktur [4]. Der ausgewählte Dienstleister, welcher die Druckaufträge fertigt, hat die Druckprozedur auf eine minimale Porosität hin optimiert. Dabei spielt die Geschwindigkeit mit dem der Laser das Bauteil sintert oder die Häufigkeit mit der eine Schichtebene vom Laserscanner abgefahren wird eine entscheidende Rolle.

Auch die Art und Weise der Sterilisation ist ein beeinflussender Faktor. Zwar ist das eingesetzte Polyamid-Material generell dampfsterilisierbar, allerdings kann durch das Autoklavieren die Porosität zunehmen. Verstärkt wird dieser Effekt wenn die Bauteile mit Alkohol, wie beispielsweise 70 %igen Isopropanol, für Reinigungszwecke, in Kontakt kommen. Die leicht flüchtigen Lösungen lassen die Struktur anschwellen und sorgen somit für ein Austreten von Flüssigkeiten.

Aus diesem Grund ist das optimale Sterilisationsverfahren für solche Bauteile die Gammasterilisation. Diese ist bereits heute Standard für alle kommerziell erhältlichen sterilen Einweg-Laborartikel wie beispielsweise Wellplatten oder ganze *Disposable*-Reaktoren [36, 37]. Ein so sterilisiertes Bauteil kann direkt für Kultivierungszwecke verwendet werden.

5.2 Automatische Probenahme

Für die Verwendung der in dieser Arbeit entwickelten automatischen Probenahme (siehe Kapitel 4) an tierischen Zellkulturprozessen wird die gekühlte Probenlagerung sowie die Funktionalität während Kultivierungen erprobt.

5.2.1 Lagerstabilität von Zellkulturproben

Mit Hilfe des entwickelten Konzepts der automatischen Probenahme kann eine Vielzahl an Proben am Tag entnommen werden. Die Analytik dieser Proben findet anschließend beispielsweise gesammelt einmal täglich statt. Aus diesem Grund muss eine möglichst lange und stabile Lagerung der Proben gewährleistet sein. Stabil bedeutet, dass die Zellkonzentrationen und die relevanten Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen über einen ausreichend langen Zeitraum unverändert bleiben.

Hierfür wurde ein Probensammler ausgewählt, welcher über Peltier-Kühlelemente die Proben innerhalb von wenigen Minuten auf eine Temperatur von 4 °C herunterkühlen kann.

5.2.1.1 Einfluss der gekühlten Lagerung auf die Zellen

Um die Zellkonzentration der gelagerten Probe zu vermessen, muss diese wieder durchmischt werden. Der schnelle Abkühlprozess und das Resuspendieren des absedimentierten Zellpellets mit einer Pipette bedeuten Stress für die Zellen. Daher muss der Einfluss der gekühlten Lagerung und der veränderten Probenvorbereitung auf die Zellzählung untersucht werden.

Für die Ermittlung des Einflusses der gekühlten Lagerung auf die Zellen wurden Zellproben aus der Lag-Phase, aus der exponentiellen Wachstumsphase sowie aus dem Übergang von exponentiellen Wachstum zur stationären Phase verwendet [38–40]. Diese wurden bis zu 72 Stunden gekühlt gelagert und die Zellkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem Cedex ermittelt (siehe Kapitel 8.2.2.1 im Anhang). Abbildung 20 zeigt diese Messpunkte nach 4 °C Lagerung.

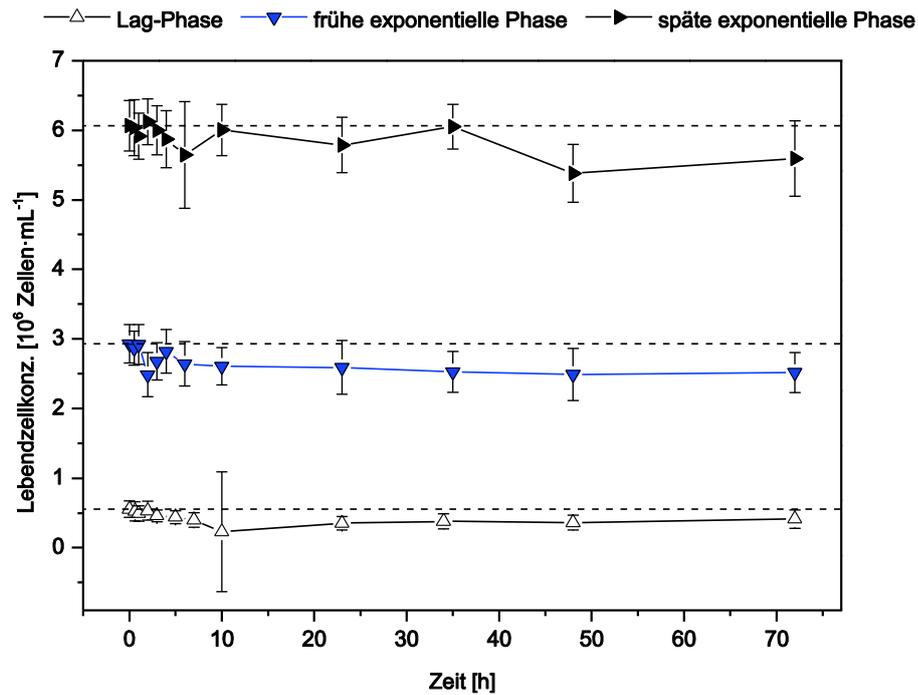


Abbildung 20: Zeitliche Änderung der Lebendzellkonzentrationen über 72 h nach Lagerung bei 4 °C. Die gestrichelten horizontalen Linien symbolisieren die Ausgangskonzentrationen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass keine signifikanten Änderungen der gemessenen Zellkonzentrationen auftreten. Die unterschiedlichen Wachstumsphasen der Zellkulturen zeigen ebenfalls keinen Einfluss auf die Stabilität. Bei einer höheren Zellkonzentration weichen die Messwerte des Cedex stärker voneinander ab.

Der Einfluss durch das Resuspendieren ist unerwartet gering, sodass durch die Lagerung und das Durchmischen keine Veränderung über der Zeit festgestellt werden können. Über 72 Stunden kann kein Anstieg nekrotischer Zellen oder Abfall der viablen Zellen beobachtet werden. Auch die Gesamtzellzahl blieb innerhalb der Messungengenauigkeit konstant (siehe Abbildung 41 im Anhang). Es hat daher keine Lyse der Zellen während der Lagerung stattgefunden.

5.2.1.2 Einfluss der gekühlten Lagerung auf die Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen

Die Beschreibung einer Kultivierung erfolgt neben der Bestimmung der Zellkonzentration auch über die zeitliche Entwicklung von Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen im Medium. Hierbei sind die gängigsten Analyten die Glukose als Haupt C-Quelle und das aus dem Stoffwechsel resultierende Laktat als Metabolit [41]. Zudem erfolgt immer häufiger die Quantifizierung von Glutamin, einer der bedeutendsten Aminosäuren im Stoffwechsel von immortalisierten Zelllinien [42]. Zusätzlich findet die Bestimmung der Glutamatkonzentration statt, welche ebenfalls eine große Rolle für die metabolischen Funktionen der Zellen spielt [43].

Aus diesem Grund wurden diese vier Substanzen als Modell-Analyten ausgewählt und deren Konzentration nach der gekühlten Lagerung über einen Zeitraum von 72 Stunden verfolgt. Die Messungen erfolgten mit einem biochemischen Analysator YSI 2700 (siehe Kapitel 8.2.2.1 im Anhang). Die zeitlichen Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 21 dargestellt.

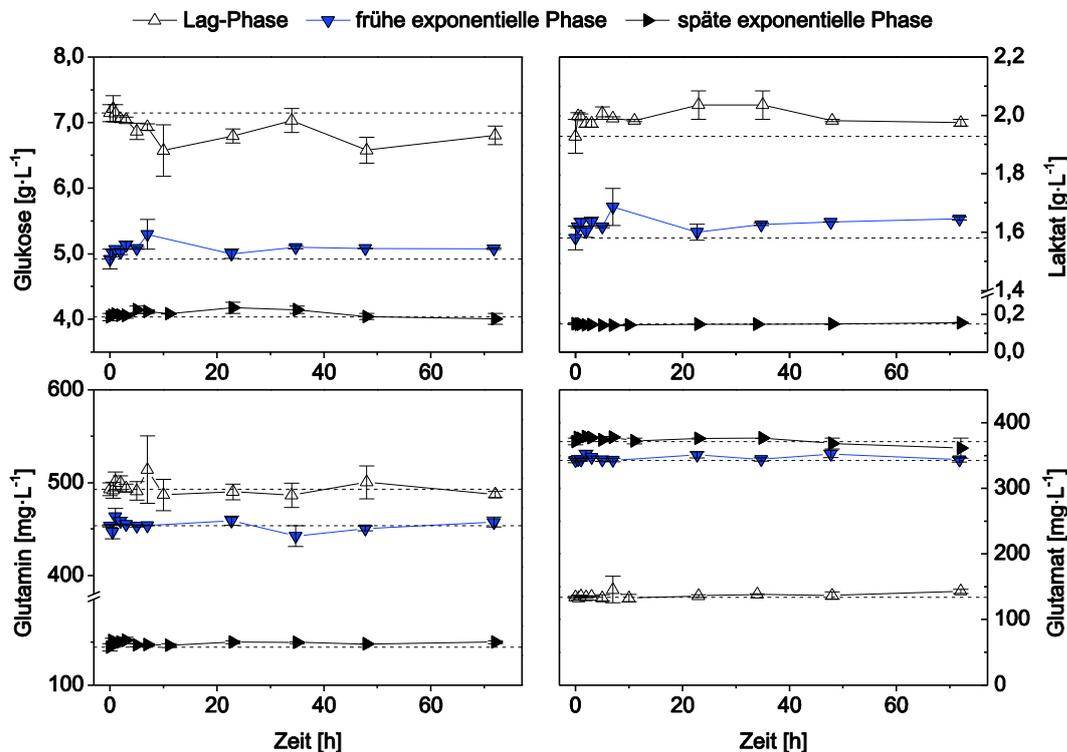


Abbildung 21: Zeitliche Änderung der Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Glutamatkonzentrationen über 72 h bei 4 °C (aus Dreifachbestimmung). Die gestrichelten horizontalen Linien symbolisieren die Ausgangskonzentrationen.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass über 72 Stunden keine signifikanten Änderungen der Konzentrationen resultieren. Der Vergleich der jeweiligen Ausgangskonzentrationen mit der Konzentration nach 72 Stunden ergibt für Glukose eine im Durchschnitt um 2,9 % veränderte Menge, für Laktat eine Änderung um 3,3 %, bei Glutamin ca. 2,1 % und bei Glutamat 3,2 %.

Tendenziell sinkt die Glukosekonzentration ab, wobei die Laktatkonzentration im Verlauf der ersten Messungen ansteigt. Dies kann auf eine gewisse Stoffwechsellaktivität hinweisen. Allerdings steigt auch die Glutamin- und Glutamatkonzentration leicht an, was bei einer noch aktiven Verstoffwechslung durch die Zellen nicht möglich wäre. Dadurch lassen sich die leichten Schwankungen über der Zeit auf die Messungenaugigkeit der Analytik zurückführen.

Die Messgenaugigkeit des YSI liegt zwischen 2 % und 4 %. Da vor der Messung eine manuelle Probenverdunnung erfolgt, ist der Fehler dieser analytischen Methode insgesamt mit 5 % bis 10 % zu schätzen. Alle beobachteten Abweichungen liegen innerhalb dieses Bereiches.

Die dargestellten Experimente zeigen, dass eine Lagerung von Zellkulturproben über einen Zeitraum bis zu 72 Stunden bei 4 °C die Zusammensetzung der Proben nicht signifikant beeinflusst. Die hier betrachteten Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen bleiben in diesem Zeitraum im Rahmen der Messgenaugigkeit konstant. Die Zellkonzentrationen werden nur geringfügig beeinflusst und auch nach drei Tagen bleibt der ursprüngliche Zustand der Kultur nahezu unverändert. Es ist kein Anstieg an toten Zellen oder ein Abfall an lebenden Zellen zu beobachten.

Somit ist der Vorgang der raschen Abkühlung auf eine Temperatur von 4 °C eine geeignete Methode zur Lagerung repräsentativer Proben aus Kultivierungsprozessen. Mit diesen Messwerten ist die Charakterisierung einer Kultivierung über die Zellkonzentration und deren Viabilität gemeinsam mit den gängigen Analyten Glukose, Laktat, Glutamin und Glutamat möglich.

5.2.2 Prozessüberwachung mit der automatischen Probenahme

Im Folgenden wird der experimentelle Einsatz der Automatisierungsplattform dargestellt. Die automatische Probenahme wurde an zwei unterschiedlichen Reaktortypen mit verschiedenen Prozessarten erprobt. Im Folgenden werden Ergebnisse

aus einem Perfusionsprozess im 2 Liter Glasreaktor und aus einem *Feed-Batch*-Prozess im 15 Liter Edelstahlreaktor gezeigt. Hierdurch kann die Funktionsfähigkeit des Systems im Zusammenspiel mit den beiden unterschiedlichen Probenahme-Ports für die Reaktortypen demonstriert werden (siehe Kapitel 4.4).

Die Kultivierungsverläufe werden anhand der etablierten Referenzanalytik der manuell entnommenen Proben im Vergleich zu den automatisch entnommenen und gekühlten Proben dargestellt. Der *SampleTaker* entnimmt alle vier Stunden automatisch die Proben und transportiert diese zum gekühlten Probensammler. Der Ablauf einer Probenahme ist in Kapitel 4.2 erläutert, über den QR-Code in Abbildung 12 (Seite 34) ist ein Video des Ablaufs abrufbar.

5.2.2.1 Perfusionskultivierung mit *Settler*-System im 2 Liter Maßstab

In einem 2 Liter Bioreaktor ist ein Perfusionskultivierungsprozess etabliert worden, welcher als Basis für die Experimente dient. Aus dem Reaktor wird ein kontinuierlicher Strom an zellhaltiger Suspension durch einen Plattensedimenter (im Folgenden auch *Settler* genannt) geleitet. Entlang der darin verbauten schrägen und elektropolierten Platten im 30 Grad Winkel können die Zellen sedimentieren und dem Reaktor wieder zugeführt werden. Eine Vibrationseinheit unterstützt das Herunterrutschen der Zellen an der Oberfläche der Platten. Am höchsten Punkt des *Settlers* erfolgt eine kontinuierliche Entnahme von zellfreiem Medium. Dieses entnommene Volumen wird wiederum automatisch durch frisches Medium direkt in den Reaktor aufgefüllt. Die Zudosierung und somit Kompensation des entnommenen Volumens erfolgt unter Verwendung einer Niveausonde, welche ohne Flüssigkeitskontakt die *Feed*-Pumpe startet.

Ein solcher kontinuierlicher Prozess wird industriell und in der Forschung für verschiedene Anwendungen verwendet. Ein aktuelles Thema hierbei ist der Einsatz in Kombination mit kontinuierlicher transients Transfektion. Neue Ergebnisse haben gezeigt, dass das Medium eine entscheidende Rolle für die Effizienz der Transfektion darstellt. Mit einer solchen Prozessführung kann ein relativ einfacher Medienwechsel für die Transfektions- und Produktionsphasen realisiert werden [44–46]. Eine solche Prozessführung gilt als Schlüsseltechnologie für eine zukünftige Produktion individualisierter Medizin [47–49].

Perfusionsprozesse werden auch für die Herstellung einiger umsatzstarker Pharmazeutika eingesetzt. Hier wird die Kultivierungsdauer auf bis zu sechs Monate verlängert und so eine kontinuierliche Ernte über einen langen Zeitraum ermöglicht [50].

Bei dem hier dargestellten Anwendungsbeispiel dient die kontinuierliche Kultivierung dazu, die Probenahme über einen längeren Zeitraum zu erproben. Weiterhin ist es möglich durch eine hohe Probedichte über lange Dauer sprungartige Veränderungen in der Nährstoff- und Metabolitkonzentration, beispielweise durch das *Feeden*, sowie dynamische Veränderungen der Zellen optimal aufzuzeichnen. Abbildung 22 zeigt die Verläufe der Glukose und Laktatkonzentrationen über der Zeit.

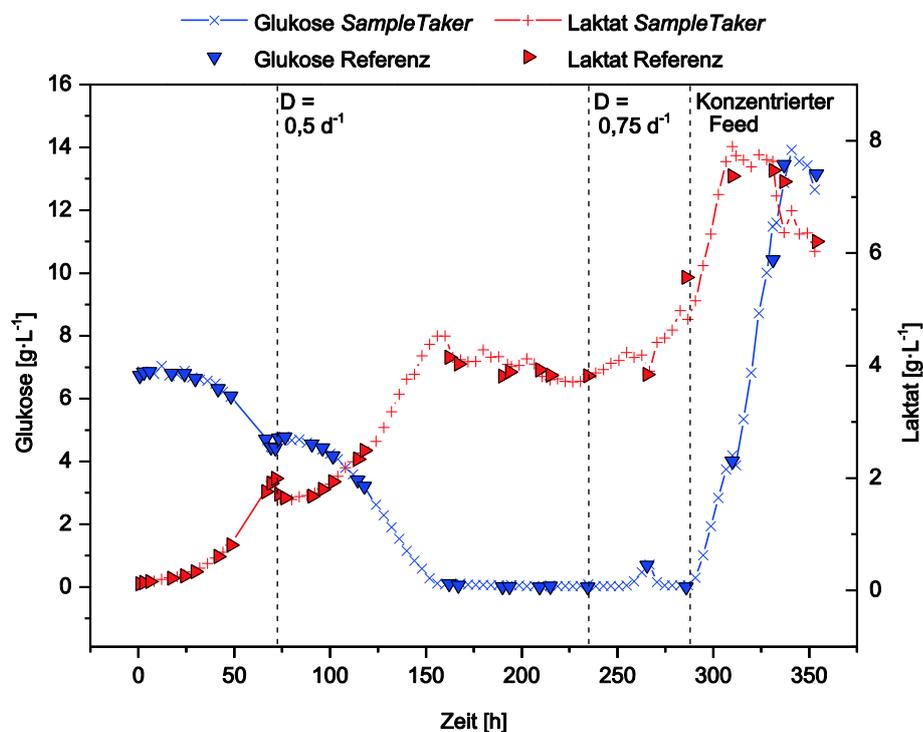


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentrationen einer 2 L *Settler*-Kultivierung. Die erste gestrichelte vertikale Linie zeigt den Übergang von *Batch*-Phase zum Perfusionsprozess, die weiteren Linien zeigen Änderungen im Perfusionsbetrieb.

Nach ungefähr 72 Stunden erfolgte der Übergang einer reinen *Batch*-Wachstumsphase zu der kontinuierlichen Kultivierung. Die *Harvest*-Pumpe, welche zellfreies

Medium aus dem *Settler* entnimmt, wurde auf ein $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$ eingestellt. Der *Feed* erfolgte mit dem Kultivierungsmedium. Nach dem Start der *Feed*- und der *Harvest*-Pumpe ist ein anfängliches Stabilisieren der Glukose- und Laktatkonzentration zu erkennen. Da bereits in der *Batch*-Phase einige Proben entnommen wurden, erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Zugabe einer größeren Menge an frischem Medium, bis das Ausgangsvolumen erreicht war.

Innerhalb der folgenden 80 Stunden wurde Glukose weiterhin verbraucht und Laktat gebildet, bis sich nach 150 Stunden eine konstante Glukosekonzentration von ungefähr $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ einstellte. In diesem Zeitraum erreichte Laktat eine Konzentration von $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Nach 235 Stunden erfolgte eine Änderung der Verdünnungsrate von $D = 0,5 \text{ d}^{-1}$ auf $D = 0,75 \text{ d}^{-1}$. Die dadurch erhöhte verfügbare Glukosemenge wird direkt von den Zellen verstoffwechselt und spiegelt sich nicht in der gemessenen Glukosekonzentration wider. Durch die Verstoffwechslung steigt allerdings die Laktatkonzentration im Reaktor stetig an. Nach 288 Stunden wurde der *Feed* ausgetauscht und anstatt dem Kultivierungsmedium mit $6,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose ein konzentriertes *Feed*-Medium mit $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose verwendet. Diese hohe Konzentration führt zu einem drastischen Anstieg an Glukose im Reaktor, welche in ebenfalls großem Maß zu Laktat verstoffwechselt wird.

Nach 290 h beginnt das Absterben der Zellen, was zu einem stark verminderten Glukoseverbrauch und dadurch resultierender Akkumulation an Glukose führt. Da zu diesem Zeitpunkt auch die Laktatbildung stagniert, beginnt ein Ausspülen des gebildeten Laktats. Dieses wird von $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ reduziert.

Das Erreichen einer geringen Glukosekonzentration über einen längeren Zeitraum während der Wachstumsphase ist eine spezielle Strategie der Prozessführung. Die geringe Glukosekonzentration führt zu einer verringerten Bildung von Laktat unter erhöhtem Sauerstoffverbrauch. Dadurch verwenden die Zellen die vorhandenen Aminosäuren für die Aufrechterhaltung ihres Energiestoffwechsels, wodurch die Akkumulation des toxischen Laktats aus dem Glukosestoffwechsel limitiert wird. [51–53]

Abbildung 23 stellt den Verlauf der Glutamin- und Glutamatkonzentrationen dar.

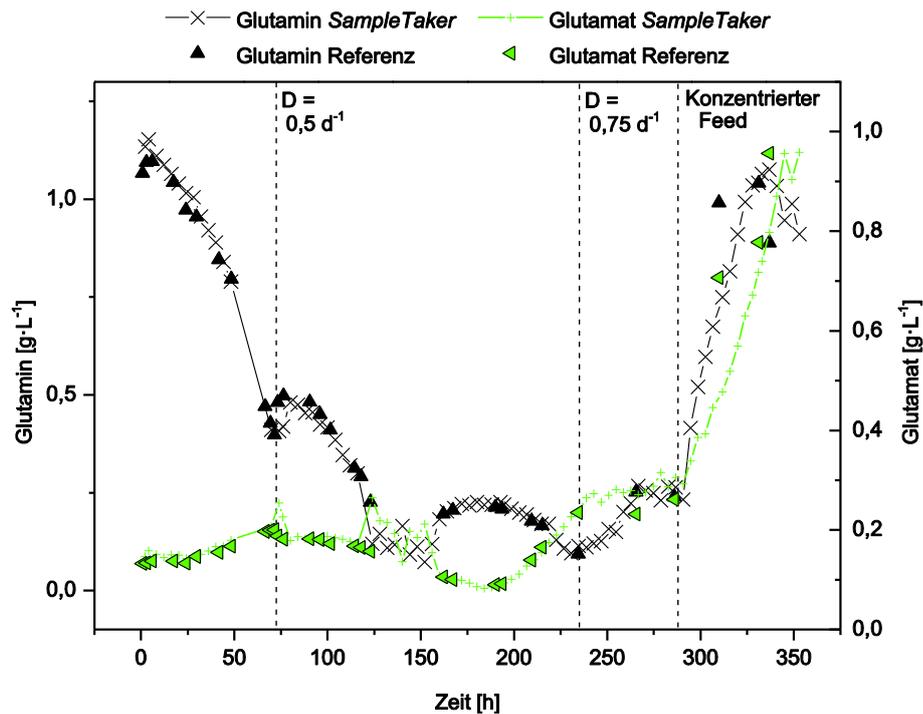


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Glutamin- und Glutamatkonzentrationen. Die erste gestrichelte vertikale Linie zeigt den Übergang von *Batch*-Phase zum Perfusionsprozess, die weiteren Linien zeigen Änderungen im Perfusionsbetrieb.

Auch in diesem Verlauf ist der Übergang vom *Batch*- zum Perfusionsbetrieb ersichtlich. Nach 72 Stunden tritt eine anfängliche Akkumulation des Glutamins auf. Nach weiteren 10 Stunden wird das Glutamin jedoch wieder stärker verbraucht, was in einer Konzentration von ungefähr $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ über einen Zeitraum von 60 Stunden resultiert. Im Glutamat-Verlauf ist lediglich ein kleiner Anstieg nach 72 Stunden erkennbar, der direkt wieder auf sein vorheriges Niveau abfällt. Sobald die Zugabe des konzentrierten *Feeds* nach 288 Stunden erfolgt, beginnt kurz darauf die Absterbephase. Zu diesem Zeitpunkt akkumuliert sowohl Glutamin als auch Glutamat genau wie die Glukose im Medium.

Ein häufiges Problem in der Prozessführung ist die rasche Verstoffwechslung von Glutamin. Bei reinen *Batch*-Prozessen fällt diese Konzentration vor dem kompletten Verbrauch der Glukose auf Null. Oft wird zusammen mit dem aufgebrauchten Glutamin ein Beginn des Laktatverbrauchs beobachtet. Bei dieser Kultivierung ist das Glutamin nie komplett aufgebraucht gewesen, weshalb ebenfalls keine starke

Verstoffwechslung des Laktats auftrat. Diese Beobachtung unterstützt die Theorie, dass der Laktatverbrauch von der Glutaminkonzentration abhängig ist.

Die Verläufe der Zellkonzentration und der Viabilität sind in Abbildung 24 dargestellt.

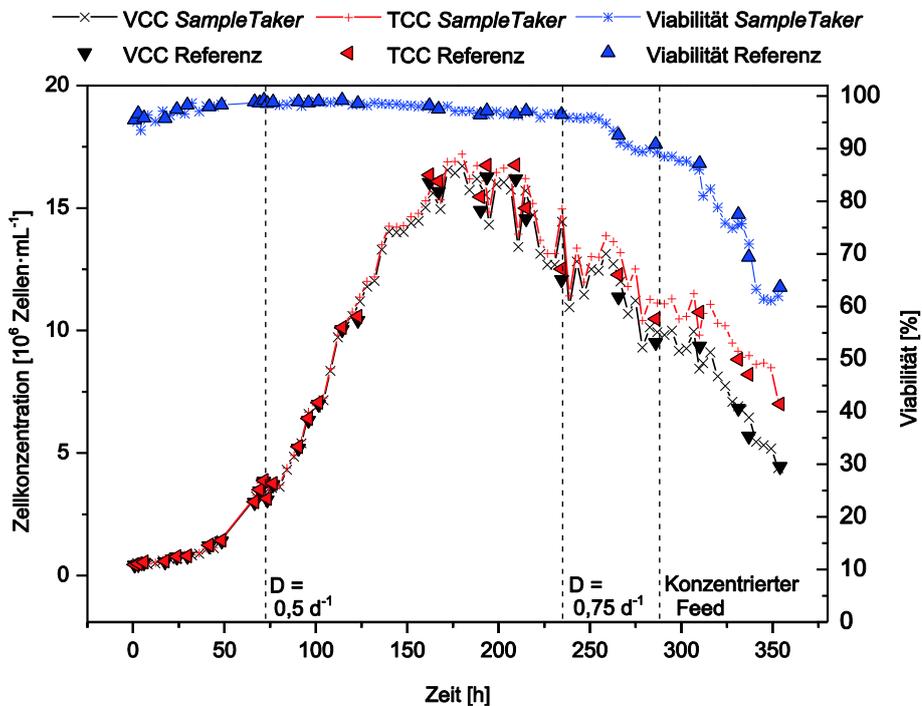


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Lebend (*viable cell concentration* - VCC)- und Gesamtzellkonzentration (*total cell concentration* - TCC) sowie deren entsprechende Viabilität. Die erste gestrichelte vertikale Linie zeigt den Übergang von *Batch*-Phase zum Perfuptionsprozess, die weiteren Linien zeigen Änderungen im Perfuptionsbetrieb.

Der zeitliche Verlauf der Zellkonzentration zeigt beim Übergang von der *Batch*- zu der Perfuptionsphase eine leichte Verdünnung der Zellsuspension, ähnlich der Glukose- und Laktatkonzentrationen. Da sich die Zellen bereits in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, konnte ihr Wachstum ungehindert fortgesetzt werden. Nach ungefähr 190 Stunden erreichten die Zellen ihre maximale Konzentration von $1,6 \cdot 10^7$ Zellen·mL⁻¹.

Das darauffolgende Absterben der Zellen ist nicht auf eine Mangelversorgung durch die Nährstoffe zurückzuführen. Vielmehr ist die stark erhöhte Laktatkonzentration hierfür verantwortlich. Zu dem Zeitpunkt des drastischen Abfalls der

Viabilität beträgt die Laktatkonzentration $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. In diesem Konzentrationsbereich wirkt Laktat stark zelltoxisch und führt somit zum Absterben der Zellen [54].

Dennoch konnte eine detaillierte Überwachung der Perfusionskultivierung über 14 Tage erfolgen und darüber hinaus die Absterbephase über einen längeren Zeitraum beobachtet werden.

Die Schwankungen der Zellzahl nach dem Erreichen des Maximums sind auf Probleme beim Reaktorbetrieb zurückzuführen. Die Abluftfilter sind trotz effektiver Abgaskühlung bei $10 - 13 \text{ }^\circ\text{C}$ im längeren Betrieb verblockt. Auch eine zusätzliche Filterheizung konnte dieses Phänomen nicht verhindern. Durch das Anbringen zusätzlicher Filter und der Möglichkeit weitere Filter steril anzuschweißen, konnten verstopfte Filter regelmäßig ausgetauscht werden. Dennoch traten in diesem Zeitraum starke Druckschwankungen im System auf. Dies wurde zusätzlich durch den höheren Bedarf an CO_2 als Korrekturmittel für den pH-Wert und den erhöhten O_2 -Bedarf für den Zellstoffwechsel aufgrund der Glukoselimitierung verstärkt. Beide Gase wurden submers über einen *Sparger* in die Zellsuspension eingeleitet.

Die Betrachtungen der Kulturverläufe im 2 Liter Reaktor hat eine Diskrepanz zwischen der Zellzahl aus den manuellen und den gelagerten Proben aufgezeigt. Die Auswertung von insgesamt vier unterschiedlichen Kultivierungen im 2 L-Maßstab haben gezeigt, dass die Abweichungen weitestgehend konstant sind. Die aus dem Probensammler ermittelten Zellkonzentrationen liegen um 10 % unter den Messwerten der manuellen Beprobung (siehe Abbildung 42 im Anhang).

Diese Abweichung tritt lediglich bei den Messungen der Zellen auf. Da die Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen nicht anfällig für Scherkräfte sind, der Reaktorinhalt homogen und der Stoffwechsel der Zellen ausreichend langsam ist, tritt keine Verfälschung dieser Analyten durch den Transport zu den gekühlten Probenröhrchen auf.

Die Ergebnisse zur Lagerfähigkeit der Zellsuspension bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zeigen deutlich, dass die Abweichung in der Zellzahl nicht auf den Vorgang des Lagerns zurückzuführen ist (siehe Kapitel 5.2). Vielmehr spielt der Transport durch das Schlauchsystem zum gekühlten Probenrack eine entscheidende Rolle. Fördergeschwindigkeit und Schlauchdurchmesser beeinflussen maßgeblich den Druck im Schlauchsystem

und haben damit einen direkten Einfluss auf die Zellen in der Probe. Durch die undefinierten Druckverhältnisse im Reaktor wurde dieser Effekt deutlich verstärkt.

Solche Druckschwankungen bzw. allgemein unkontrollierte Überdruckzustände stellen eine Schwachstelle der Probenahme dar. Aufgrund des kontaktlosen Proben- transports über eine Spritzenpumpe bedeuten Änderungen des Reaktorinnen- drucks eine veränderte Fördergeschwindigkeit. So führt ein starker Überdruck im Reaktor dazu, dass sich auch im Schlauchsystem ein größerer Druck ausbildet und beim Transport der Probe in den Autosampler ruckartige Änderungen der Geschwindigkeit auftreten.

Bei den Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen ist dies unproblematisch, da der Inhalt des Reaktors weitestgehend homogen durchmischt ist. Zellen besitzen allerdings eine vergleichsweise hohe Masse und verhalten sich gemäß des ersten Newtonschen Gesetzes träge. Ein ruckartiger Transport der Zellsuspension sorgt somit für eine geringere Zellkonzentration im gesamten Schlauchsystem. Zudem entstehen erhöhte Scherkräfte, welche die Zellen schädigen und zur Disruption führen können. Die schwankenden Reaktorinnendrucke führen somit zu den schwankenden Ergebnissen der Zellkonzentrationsbestimmung.

Es wird davon ausgegangen, dass die manuelle Probenahme den wahren Verlauf der Kultivierung beschreibt. Lediglich die Messung der manuellen Probe nach 190 Stunden weicht von diesem Trend ab. Der Messwert wird daher als Ausreißer betrachtet. Die starken Schwankungen der Zellkonzentrationsmessungen treten nur in den automatisch entnommenen Proben auf.

Diese Beobachtungen zeigen einen Vorteil der Automatisierung. Auch wenn eine Abweichung vorhanden ist, so fällt diese bei jeder Wiederholung gleich aus. Die Reproduzierbarkeit ermöglicht es einen Korrekturfaktor zu ermitteln, mit dem die gemessenen Zellkonzentrationen dem Referenzwert angenähert werden können.

Aus diesem Grund müssen für die automatische Beprobung die Reaktoren ausreichend Entlüftet oder besser über eine Überdruckregelung verfügen, um so konstante Druckbedingungen zu gewährleisten. Dies ist im nachfolgend beschriebenen 15 Liter Reaktorsystem möglich.

5.2.2.2 *Fed-Batch*-Kultivierung im 15 Liter Reaktor

Die im Folgenden dargestellte Kultivierung im 15 Liter Reaktor beschreibt einen *Fed-Batch*-Prozess. Durch regelmäßiges Hinzufügen von frischem Medium werden eine Verlängerung des Prozesses sowie eine Steigerung der Zellzahl erreicht.

Prozesse dieser Art werden oft für die industrielle Produktion von biotechnologischen Produkten verwendet, da sie eine deutlich höhere Ausbeute als reine *Batch*-Prozesse liefern [50, 55–57].

Entsprechend der Herstellerangaben wurde ab dem zweiten Tag alle 24 Stunden ein konzentriertes *Feed*-Medium dem Reaktor zugeführt. Das Volumen des *Feeds* betrug anfangs 2 % des Reaktorvolumens ($\cong 150$ mL) bis zu 4 % ($\cong 300$ mL) ab sechs Tagen Kultivierungsdauer. Abbildung 25 zeigt den zeitlichen Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentrationen.

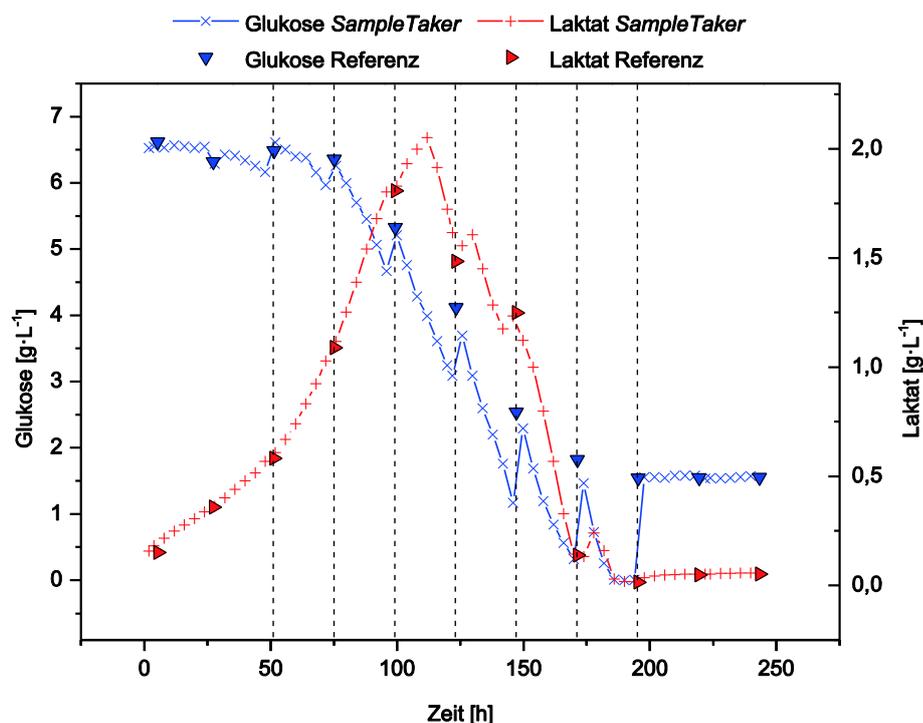


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentrationen der 15 L-*Fed-Batch*-Kultivierung. Die vertikalen gestrichelten Linien zeigen die *Feed*-Zeitpunkte.

Im Verlauf der Glukosekonzentration ist ein zackenförmiges Profil erkennbar, welches auf dem Anstieg der Glukose durch das konzentrierte *Feed*-Medium (dieses

enthält $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose und $5,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glutamin) zurückzuführen ist. Nach ungefähr 150 Stunden ist auch bei der Laktatkonzentration ein solcher Verlauf erkennbar. Dieser tritt zeitlich versetzt zur Erhöhung der Glukose auf und zeigt eine sofortige Verstoffwechslung der Glukose zu Laktat.

Im Gegensatz zu der in Kapitel 5.2.2.1 gezeigten Perfusionskultivierung im 2 L-Maßstab ist hier eine Verstoffwechslung des Laktats erkennbar. Die Theorie, dass der Laktatabbau an die Glukosekonzentration gekoppelt ist, kann mit diesen Daten widerlegt werden [58]. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass der Laktatabbau nach 110 Stunden und einer Glukosekonzentration von $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ beginnt.

Aus den Beobachtungen der vorliegenden Kultivierungen ist auf eine Abhängigkeit zwischen dem Beginn des Laktatabbaus und dem Aufbrauchen des Glutamins zu schließen. Der zeitliche Verlauf der Glutamin- und Glutamatkonzentration ist in Abbildung 26 dargestellt.

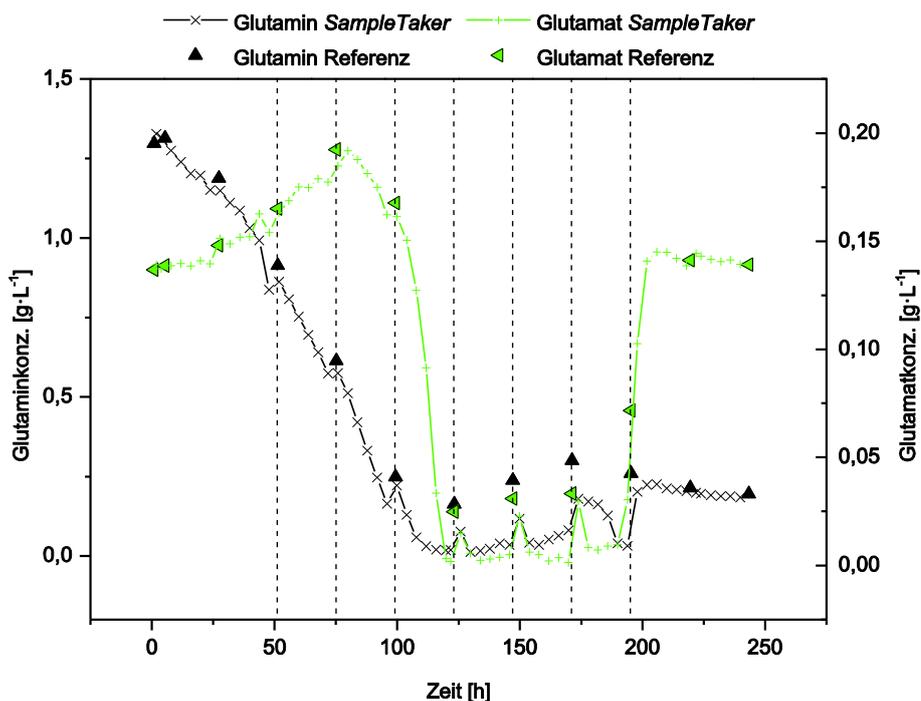


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der Glutamin- und Glutamatkonzentration. Dargestellt sind die manuellen Referenzproben und die aus dem Probennehmer vermessenen Proben.

Im Gegensatz zu der Glukosekonzentration, welche erst nach ungefähr 70 Stunden stärker verbraucht wird, fällt die Glutaminkonzentration direkt nach der Inokulation des Reaktors ab. Dies liegt zum einen an der schnellen Verstoffwechslung dieser

Aminosäure durch die Zellen, zum anderen aber auch an der Instabilität und dem dadurch bedingten spontanen Zerfall zu Ammonium [59].

Bei Beginn des Laktatabbaus nach 110 Stunden beträgt die Glutaminkonzentration $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Somit ist vielmehr eine geringe Glutamin- anstatt eine geringe Glukosekonzentration für den Beginn der Laktatverstoffwechslung ausschlaggebend.

Die Kulturverläufe zeigen eine hohe Übereinstimmung der manuell und automatisch entnommenen Proben. Die Abweichung ist innerhalb der Messgenauigkeit und der Verlauf kann mit einer hohen Probendichte dargestellt werden. Lediglich im Verlauf der Glutaminkonzentration zwischen Stunde 120 und 200 ist eine Konzentrationsdifferenz zu der Referenzmessung zu beobachten. In etwas schwächerer Form kann dieser Unterschied auch bei den Glukosemessungen beobachtet werden. Dieser Effekt beruht auf dem zeitlichen Unterschied von ungefähr 150 Minuten zwischen der manuell und der darauffolgenden automatisch entnommenen Probe. Die manuelle Probenahme erfolgte direkt im Anschluss an die Zugabe des *Feeds*, während die automatische Probenahme ab dem Zeitpunkt der Innokulation die Proben in äquidistanten Abständen von vier Stunden entnommen hat. Der relativ große Unterschied in der Konzentration ist auf einen sehr schnellen Verbrauch durch die Zellen zurückzuführen. Da sich die Zellen in dem genannten Zeitraum in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befanden und zudem eine hohe Zelldichte vorlag, wurde innerhalb dieser Zeit bereits eine deutlich messbare Menge an Nährstoffen verstoffwechselt. Die im Zeitraum vor und nach dieser Beobachtung mit der Referenz übereinstimmenden Konzentrationen belegen, dass die Diskrepanz auf den Verbrauch zurückzuführen ist.

Die Beobachtungen der Nährstoffverläufe veranschaulichen, dass Glutamin einer der Schlüsselfaktoren für die effektive Prozessführung darstellt. Es ist somit erstrebenswert diese Aminosäure über den Kulturverlauf nicht in limitierenden Mengen vorliegen zu haben.

Bereits vor dem letzten *Feed* bei 195 Stunden ist sämtliche Glukose und auch Laktat verstoffwechselt. Zu diesem Zeitpunkt sinkt die Viabilität der Zellkultur drastisch ab, wie in Abbildung 27 ersichtlich ist. Nach diesem Zeitpunkt wird die zugeführte Nährstoffquelle nicht mehr metabolisiert, weshalb ebenfalls kein Anstieg des Laktats erkennbar ist.

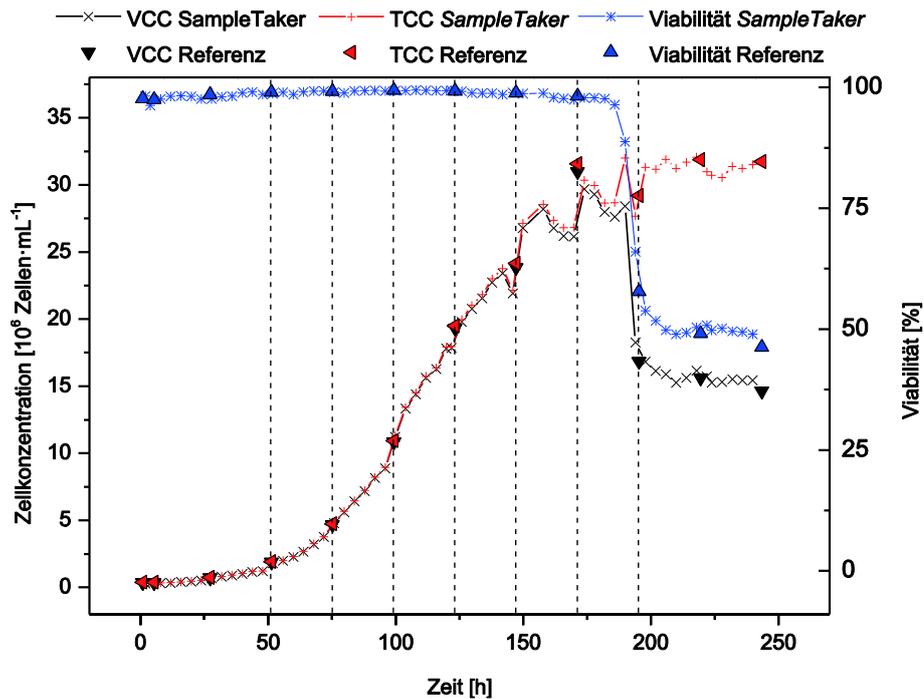


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Lebend (VCC)- sowie Gesamtzellkonzentration (TCC) und der daraus abgeleiteten Viabilität. Die vertikalen gestrichelten Linien zeigen die *Feed*-Zeitpunkte.

Der Verlauf der Viabilität bestätigt den abrupten Abfall nach 185 Stunden Kulturdauer. Eine mögliche Ursache für diesen Abfall kann eine durch den Glutaminmangel verursachte Induktion der Apoptose sein [60, 61].

Während der Kultivierung wird eine maximale Zellkonzentration von ungefähr $3,2 \cdot 10^7 \text{ Zellen} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreicht. Im Vergleich zu vorherigen *Batch*-Kultivierungen entspricht dies eine Steigerung von 40 - 100 %.

Im Gegensatz zu der Überwachung im 2 Liter Reaktor, war bei diesem Reaktorsystem keine nachträgliche Korrektur der Zellkonzentrationsmessung nötig. Der Edelstahlreaktor verfügt über eine Druckregelung, sodass zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung ein Überdruck im Reaktorinneren entstehen kann. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Abweichungen im Glasreaktor auf die Druckschwankungen zurückzuführen sind.

Der zeitliche Verlauf der Nährstoffkonzentrationen zeigt deutlich, dass die gewählte *Feed*-Strategie nicht optimal ausfiel. Idealerweise fällt die Konzentration

über der Zeit nicht kontinuierlich und drastisch ab, sondern wird weitestgehend konstant auf einer bestimmten Konzentration gehalten.

Entsprechend der PAT Initiative, kann die Verwendung von *inline* Analytik zur Messung dieser Nährstoffkonzentrationen genutzt werden. Auf Basis solcher Daten ist es möglich individuell und gezielt auf den aktuellen Zustand des Reaktorinhaltes zu reagieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Überwachung mit Messtechnik für eine effektive *Feed*-Strategie notwendig ist. Die automatische Probenahme ist in der Lage eine hohe Probendichte zur Verfügung zu stellen, allerdings erfolgt die Analytik nur zeitverzögert. Die teilweise bis zu 24 Stunden später verfügbaren Daten sind daher nicht für eine Regelung des Prozesses geeignet.

Die hohe Anzahl an Datenmesspunkten kann allerdings hervorragend für die Etablierung eines auf Messtechnik basierenden Vorhersagemodells eingesetzt werden. So kann beispielsweise anhand der Daten die Kalibration eines chemometrischen Modells aus spektroskopischen Messungen erfolgen (siehe Kapitel 5.3.1). Basierend auf der so etablierten Vorhersage einer Nährstoffkonzentration kann eine Regelung des *Feeds* vollautomatisch erfolgen (siehe Kapitel 5.4).

5.2.2.3 Zusammenfassung und Diskussion der Kulturverläufe

Die dargestellten Kulturverläufe belegen die Machbarkeit, eine Kultivierung mit minimalem Zeitaufwand und in hoher Auflösung zu beobachten. In der Vergangenheit erfolgten manuelle Probenahmen in einem Zeitintervall von drei bis vier Stunden, wobei in der Nachtphase eine längere Pause von ungefähr sechs bis sieben Stunden erfolgte. Jede einzelne Probenahme und mit anschließender Analytik dauerte durchschnittlich 30 bis 60 Minuten. Eine manuelle Überwachung mit sechs Proben am Tag benötigt somit einen zeitlichen Aufwand von drei bis sechs Stunden. Mit der jetzt etablierten Probenahme und Lagerung der Proben bei 4 °C, ist dieser Aufwand drastisch minimiert worden. Bei den gezeigten Kulturverläufen wurden die Proben nur einmal täglich aus dem Probensammler entnommen und anschließend gesammelt analysiert. Durch die Verwendung eines automatisierten Zellzählers und ebenfalls automatisierten biochemischen Analysators beträgt der tägliche manuelle Zeitaufwand im Durchschnitt 30 bis 60 Minuten. Hinzu kommt aufgrund

der sukzessiven Vermessung aller Proben zusätzliche Zeit für den Abschluss der vollständigen Analytik und somit dem Vorliegen aller Messergebnisse.

Die hohe Probendichte ist optimal für die Optimierung von Bioprozessen geeignet, da diese Informationen über Zusammenhänge und Dynamiken in der Kultur liefern. Zudem kann eine entsprechend hohe Probenanzahl in die Erstellung von chemometrischen Modellen auf Basis der während der Kultivierung eingesetzten spektroskopischen Analysatoren einfließen.

Die Experimente haben gezeigt, dass die automatische Probenahme für die Überwachung von Kultivierungen im 15 Liter Reaktor hervorragend geeignet ist. Für den routinemäßigen Betrieb im 2 Liter Reaktor besteht noch Optimierungsbedarf. Insbesondere ist der Systemdruck im Reaktor ein ausschlaggebendes Kriterium für den erfolgreichen Betrieb des *SampleTaker*.

Es muss beachtet werden, dass unterschiedliche Zellsysteme, Nährmedien sowie Zielanalyten gegebenenfalls anders auf die Lagerung und den Transport reagieren. Somit muss eine erneute Betrachtung und Evaluation für veränderte Bedingungen erfolgen.

5.3 Messkammer-Analytik

In die automatische Probenahme können die in Kapitel 3 konstruierten Messkammern für eine Bioprozessbeobachtung integriert werden. Anhand der Beispiele der 2D-Fluoreszenzmessung in einer geschlossenen Kammer und der In situ Mikroskopie in einer Kammer mit Verschlussring wird die Funktionsweise und Optimierung der Messkammer vorgestellt.

In ersten Vorexperimenten wurde die Platzierung der Messkammern in Kombination mit den Schläuchen der automatischen Probenahme optimiert. Die Schlauchstrecke der Probenahme muss für eine möglichst lange Strecke vertikal verlaufen. Richtungsänderungen im Schlauchverlauf, vor allem zu horizontalen Strecken, verursachen ein Abreißen des Flüssigkeitsfilms. Dadurch entstehen Flüssigkeitsansammlungen und Tropfenbildungen in den Schläuchen, welche die Entleerung nach der Messung behindern.

Im ermittelten Aufbau sind die Messkammern auf der Höhe des Reaktorinhalts platziert. Die Befüllung der Kammern erfolgt vertikal beginnend vom unteren Einlass. Auf diese Weise ist eine vollständige Füllung realisierbar. Gleichzeitig fungieren die Messkammern als Blasenfalle im System, sodass am oberen Auslass nur die Zellsuspension ohne eingeschlossene Luftblasen austritt. Dadurch kann der Flüssigkeitssensor am Ausgang störungsfrei arbeiten. Abbildung 28 veranschaulicht diesen Aufbau.

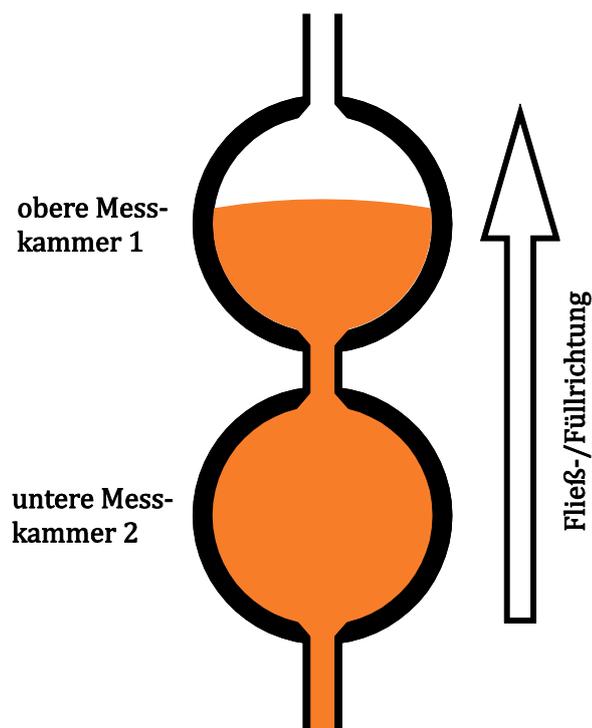


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Messkammer-Befüllung. Abgebildet sind zwei vertikal angeordneten Messkammern. Die obere Messkammer ist zur Hälfte gefüllt. Der Austritt an der höchsten Stelle sorgt für die Entlüftung.

Über die *SampleTaker*-Plattform wird alle zwei Stunden eine Probe aus dem Reaktor in die beiden Kammern transportiert und vermessen. Jede zweite dieser Proben, also alle vier Stunden, ist anschließend nicht zurück in den Reaktor sondern in den über Peltier-Elementen gekühlten Probensammler umgeleitet worden. Somit stehen am Tag sechs Proben zur Verfügung, welche nachträglich vermessen werden konnten. Zu jedem dieser Messpunkte liegt ein Spektrum und Mikroskopbilder vor.

Im Folgenden werden exemplarische Daten der Kultivierungen mit zwei verschiedenen Messkammerkonfigurationen dargestellt und die jeweils daraus resultierenden Daten diskutiert.

5.3.1 BioView-Messungen in einer Messkammer

Das BioView ist ein 2D-Fluoreszenzspektrometer mit dem gleichzeitig verschiedene Exzitations- und Emissionswellenlängenkombinationen gemessen werden. Für die Anregung wird Licht mit einer Wellenlänge von 270 – 550 nm auf die Probe eingestrahlt (20 nm Bandweite). Die zweidimensionale Ergebnismatrix resultiert aus jeweils einem Emissionsspektrum (310 – 590 nm) für jede eingestrahelte Wellenlänge. Mit dem Spektrometer können fluoreszierende Stoffe detektiert werden, wie zum Beispiel Proteine (bzw. die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin), Flavine und NADH/NADPH [62–65].

Zusätzlich zu den Spektren werden Messungen mit sogenannten Neutraldichtefiltern (ND-Filtern) durchgeführt. Diese ND-Filter können sowohl bei der Exzitation als auch bei der Emission verwendet werden. Sie ermöglichen eine Detektion vom wellenlängenunabhängigen Licht. Hierdurch ist eine Streulichtmessung möglich, mit der direkte Informationen über die Zellen erhalten werden [66].

Für eine direkte Messung im Bioprozess kann die BioView-Sonde über einen Stutzen mit Quarzglasfenster im Ingold-Port eingebaut werden. Die eigentliche Messung findet am Ende der Sonde statt. Das Licht wird über einen Lichtwellenleiter in die Probe eingeleitet und die Reflexion über einen zweiten Lichtwellenleiter im 180° Winkel in den BioView-Sensor geleitet.

Für den Einbau der Sonde in die Messkammer muss somit eine geschlossene Ausführung verwendet werden. Um dem Licht eine gewisse Eindringtiefe zu ermöglichen, wurde ein 20 mm hoher Kammerring verwendet. Der Ingold-Stutzen der BioView-Sonde mit montierter Messkammer ist in Abbildung 29 zu sehen. Das Innenvolumen der montierten Kammer beträgt ungefähr 7,4 mL.

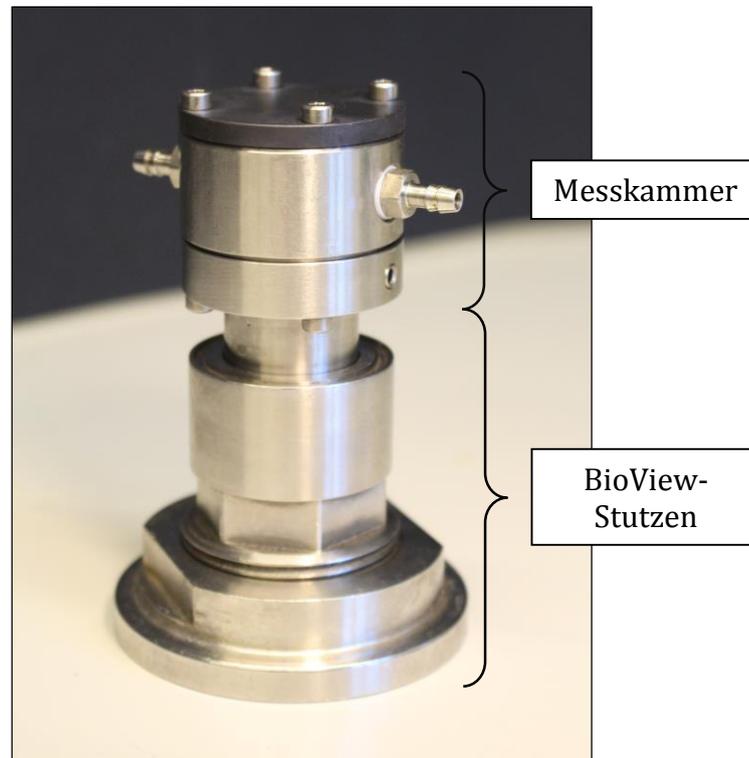


Abbildung 29: BioView-Stutzen mit montierter 20 mm hoher Messkammer.

Die Steuerung des BioViews, hierzu gehört die Einstellungen der Messung, die Aufnahme und das Abspeichern der Spektren wurde in die *ComBox* integriert (siehe Kapitel 4.3.1).

Die Messkammer mit eingebauten BioView wurde sowohl im 2 Liter Reaktor, als auch im 15 Liter Reaktor eingesetzt. Durch die Verwendung der Messkammer sind erstmals Messungen mit dem BioView im 2 L-Glasreaktor möglich. Die Ergebnisse beider Reaktorsysteme werden im Folgenden gemeinsam dargestellt.

5.3.1.1 Trend der Daten bei unterschiedlichen Kultivierungen

Wenn eine Messmethodik erfolgreich verwendet werden soll, müssen die daraus resultierenden Daten reproduzierbar sein. Hierbei erfolgt der Vergleich anhand von vier unterschiedlichen Kultivierungen im 2 Liter Maßstab mit jeweils unterschiedlichen Kultivierungsmethoden. Betrachtet wird eine *Batch*-Kultivierungen (K1), zwei *Fed-Batch*-Kultivierungen (K2, K3) und eine *Perfusions-Settler*-Kultivierung (K4 – hierbei handelt es sich um dieselbe Kultivierung wie in Kapitel 5.2.2.1).

In Abbildung 30 ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA – principal component analysis) graphisch dargestellt.

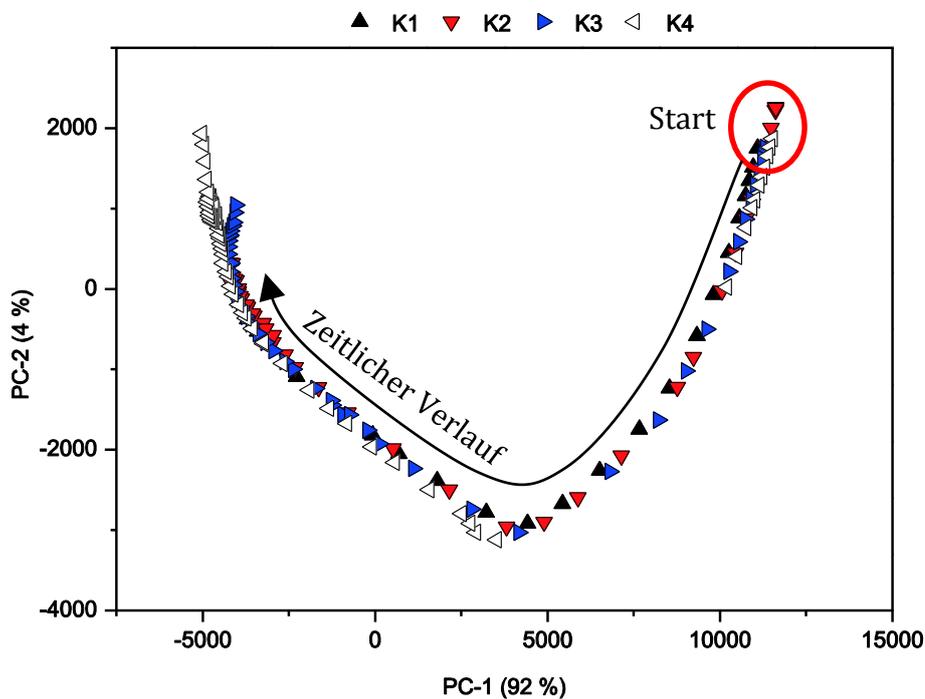


Abbildung 30: Hauptkomponentenanalyse (PCA) von vier unterschiedlichen Kultivierungen im 2 L-Maßstab. Alle Messungen erfolgten im Bypass. K1 ist eine *Batch*-Kultivierung, K2 und K3 jeweils *Fed-Batch*-Kultivierungen und K4 ist eine Perfusionskultivierung. Alle Daten sind *Gain*-Korrigiert.

Die Hauptkomponentenanalyse stellt in einem sogenannten *Score*-Plot die Spektren als Punkte dar. Hierbei werden häufig die ersten beiden Hauptkomponenten (PC-1 und PC-2) gegeneinander aufgetragen, da diese die größten Unterschiede eines Prozesses beschreiben. Spektren hoher Ähnlichkeit liegen in dieser Darstellung nah beieinander. Der *Score*-Plot ermöglicht es eine schnelle Aussage über die Änderungen von Daten und zudem die Ähnlichkeit im zeitlichen Verlauf zu treffen. [67, 68]

Die in Abbildung 30 gezeigten Daten der unterschiedlichen Kultivierungen wurden zum Teil mit verschiedenen *Gain*-Einstellungen des BioView erzeugt. Der *Gain* ist ein Verstärkungsfaktor, mit dem die Intensität eines Signals beeinflusst werden kann. Für eine Vergleichbarkeit der Daten erfolgte eine mathematische Normierung der Daten auf einen gemeinsamen *Gain* von 1000.

Die dargestellten Datenpunkte veranschaulichen, dass aus allen vier Kultivierungen ähnliche spektrale Daten resultieren und auch die zeitliche Veränderung identisch verläuft. Alle Kultivierungen beginnen im *Score*-Plot bei einem ähnlich hohen Wert in der ersten und zweiten Hauptkomponente und verlaufen anschließend in der ersten Hauptkomponente stetig in den negativen Bereich. Die zweite Hauptkomponente bewegt sich anfangs nach unten bis zu einem Tiefpunkt, welcher ebenfalls bei allen Kultivierungen ersichtlich ist. Anschließend bewegen sich die *Score*-Werte der zweiten Hauptkomponente wieder nach oben in den positiven Bereich.

Eine Korrelation des Minimums mit den Rohdaten der dazugehörigen Spektren hat gezeigt, dass zu diesem Zeitpunkt eine Veränderung in den ND-Filtern auftritt. Vor dem Tiefpunkt befinden sich diese Filter in der Sättigung, da die Zellkonzentration zu gering ist und das Licht ausschließlich am Kammerdeckel reflektiert wird. Nach dem Tiefpunkt sind die ND-Filter nicht mehr in der Sättigung, da die Zellkonzentration ansteigt und das Licht vor der Reflektion an den Zellen gestreut wird.

Da der Trend der Kultivierungen im *Score*-Plot vor und nach dem Tiefpunkt übereinander liegen, können zwei Folgerungen daraus geschlossen werden. Zum einen zeigt der Verlauf während der Sättigung der ND-Filter, dass bereits die Änderungen im Fluoreszenzsignal bei allen Kultivierungen vergleichbar sind. Zum anderen zeigen die zusätzlichen Informationen des Streulichts nach dem Tiefpunkt dass auch durch diese zusätzlichen Daten die Verläufe nicht voneinander abweichen.

Die beschriebene Messtechnik kann im Bypass mit hoher Reproduzierbarkeit an unterschiedlichen Kultivierungen betrieben werden. Somit ist es möglich in einem weiteren Schritt mit einem chemometrischen Modell eine Prozessvariable, wie z.B. die Zellzahl, aus den Spektren einer neuen Kultivierung quantitativ vorherzusagen.

Das Auftreten der Signalsättigung in den ND-Filtern sorgt allerdings dafür, dass diese Bereiche nicht für die Modellbildung verwendet werden können. Im folgenden Kapitel wird daher die notwendige Optimierung der Messkammer detaillierter betrachtet und erläutert.

5.3.1.2 Optimierung der Messkammer

Da alle Module der Messkammer komplett aus Edelstahl gefertigt sind, besitzen diese eine metallisch-reflektierende Oberfläche. Aus diesem Grund wird das

eingestrahle Licht am Deckel reflektiert, sofern nicht ausreichend Streulichtzentren (z.B. die Zellen) dieses verhindern. Daher kommt es besonders zu Beginn einer Kultivierung zu einer deutlich erhöhten Streulichtmessung, die nicht von den Kultivierungsbedingungen sondern von der Messtechnik verursacht wird. Die Signale sind durch die Reflektion gesättigt, wodurch die Informationen aus diesen Bereichen im Spektrum verloren gehen. Insbesondere für die Modellbildung zur Bestimmung der Zellkonzentration sind diese Bereiche immens wichtig.

Um die Reflektion zu minimieren, erfolgte eine Modifikation des eingesetzten Kammerdeckels. Dieser ist zuerst durch Sandstrahlen mattiert und anschließend mit Titanaluminiumnitrid (TiAlN) beschichtet worden. Dieser Vorgang sorgt für eine matt-schwarze Oberfläche. Zudem ist TiAlN als biokompatibles und robustes Material bekannt, welches für Implantationszwecke verwendet wird [69–71]. Die Beschichtung des Deckels mit dem Material erfolgte über eine physikalische Gasphasenabscheidung (*physical vapour deposition*, PVD) [72]. Ein Vergleich der Medienspektren mit modifiziertem und unmodifiziertem Deckel ist in Abbildung 31 graphisch dargestellt.

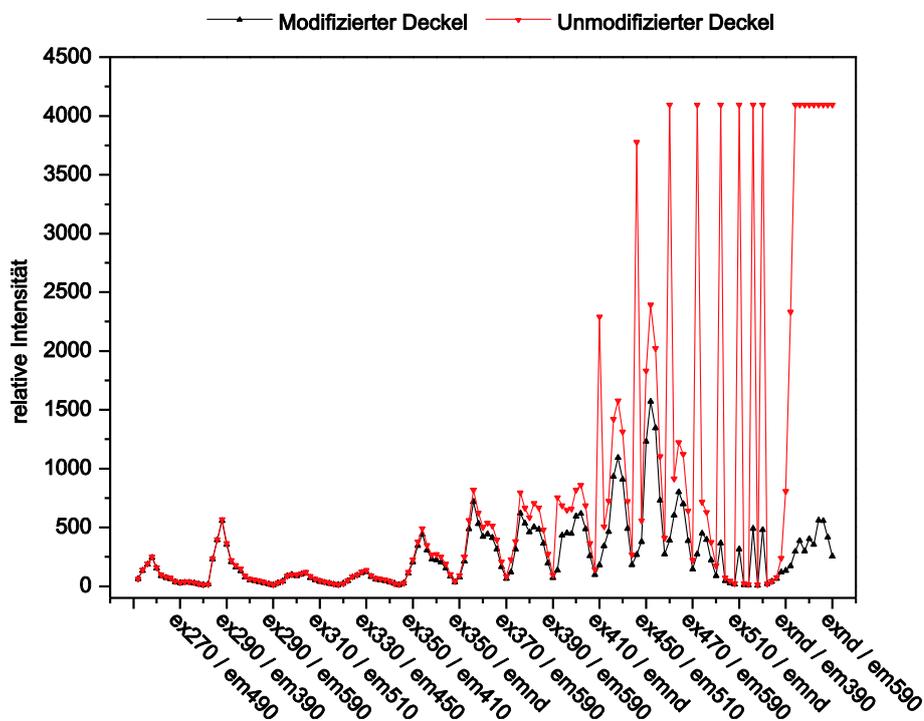


Abbildung 31: Vergleich der resultierenden Medienspektren mit und ohne modifiziertem Deckel

Das in rot dargestellte Spektrum zeigt deutlich eine Sättigung in den ND-Filtern bei der maximalen Signalintensität von 4095. Im direkten Vergleich, besonders im Bereich höherer Wellenlängen, zeigt die Modifikation des Deckels ihre Wirksamkeit. Die Reflektion konnte drastisch vermindert werden und es gehen somit durch die Beschichtung keine Informationen bei der Spektren-Aufnahme verloren. Die Variante mit schwarzem Deckel ermöglicht es Spektren aufzuzeichnen, welche ähnlich zu dem Einbauort direkt im Reaktor sind. Das reflektierte Licht wird nur von den Medienbestandteilen oder Zellen zurückgestrahlt und nicht von dem Messkammerdeckel.

5.3.1.3 Vergleich der Messdaten zwischen Bypass- und *inline* Betrieb

Um die Messkammer für die Beobachtung verschiedener Bioprozesse nutzen zu können, muss festgestellt werden, ob die aufgezeichneten Spektren mit denen aus dem direkten *inline* Betrieb vergleichbar sind. Nur bei einer Ähnlichkeit der Daten ist ein Vergleich der Messdaten zwischen verschiedenen Systemen möglich und somit beispielsweise eine chemometrische Modellerstellung im kleinen Maßstab auf ein anderes System skalierbar.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen erfolgt ein Vergleich der Spektren von zwei 15 Liter Kultivierungen mit *inline* verbauter BioView-Sonde (K6 und K7), mit einer 15 Liter Kultivierung und BioView-Sonde im Bypass (K5). K6 ist eine reine *Batch*-Kultivierung. Bei den Kultivierungen K5 und K7 erfolgte eine regelmäßige Zugabe eines *Feeds*. In Abbildung 32 ist ein *PCA-Score*-Plot der oben genannten Kultivierungen graphisch dargestellt.

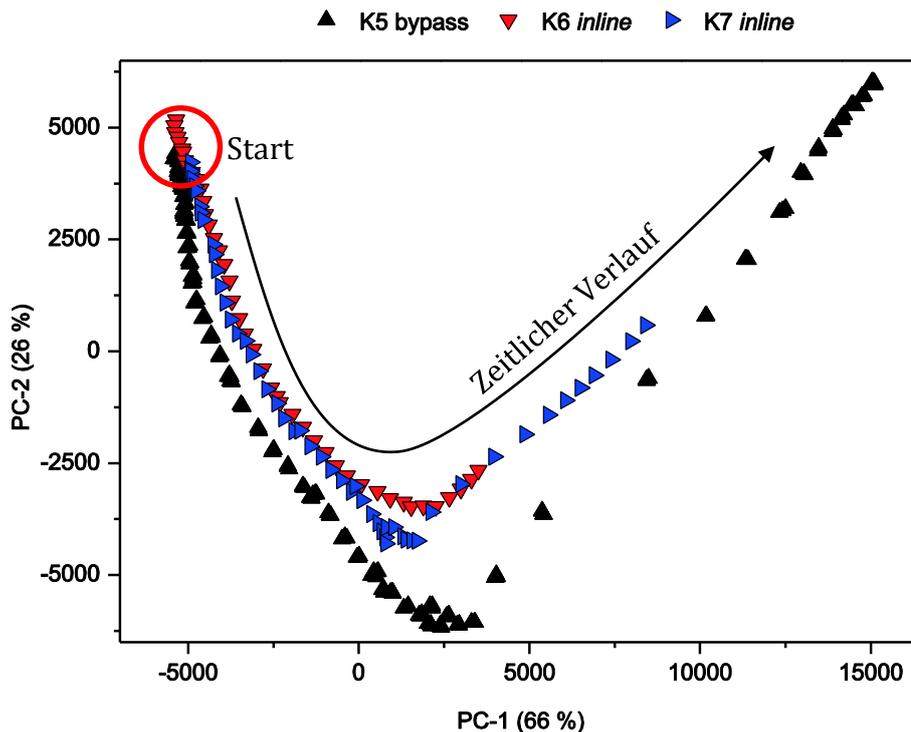


Abbildung 32: Hauptkomponentenanalyse (PCA) dreier unterschiedlichen Kultivierungen. Bei K5 erfolgte die BioView-Messung im Bypass, bei K6 und K7 war die Sonde *inline* verbaut. Alle Daten sind Medienkorrigiert.

Bei diesen Spektren erfolgten alle Messungen mit denselben *Gain*-Einstellungen, weshalb keine Korrektur erfolgen musste. Für die Vergleichbarkeit zwischen dem Bypass und dem *inline* Betrieb, mussten allerdings die Spektren auf das Medium normiert werden (siehe Kapitel 8.2.2.6 im Anhang).

Im gezeigten *Score*-Plot ist ein ähnlicher Verlauf der Kultivierungen anhand der spektroskopischen Daten erkennbar. Alle drei Kultivierungen beginnen mit ähnlichen Spektren und somit ähnlichen *Score*-Werten von -5000 in der ersten und 5000 in der zweiten Hauptkomponente. Anschließend verlaufen die *Score*-Werte zuerst entlang der zweiten Hauptkomponente nach unten und im weiteren Verlauf zudem entlang der ersten Hauptkomponente nach rechts im Diagramm. Die Daten aller Kultivierungen verlaufen nach einem Tiefpunkt wieder in den positiven Bereich der zweiten Hauptkomponente. Weiterhin ist auch zu erkennen, dass die Daten der beiden *inline* betriebenen 2DF-Spektrometer, im Vergleich zu den Messungen im Bypass-Betrieb, eine größere Ähnlichkeit zueinander besitzen.

Die Messpunkte des beobachteten Tiefpunktes korrelieren in allen drei Kultivierungen mit dem Beginn der Absterbephase und einem dadurch bedingten Einbruch in der Viabilität der Kultur. Abbildung 33 zeigt diesen Zusammenhang.

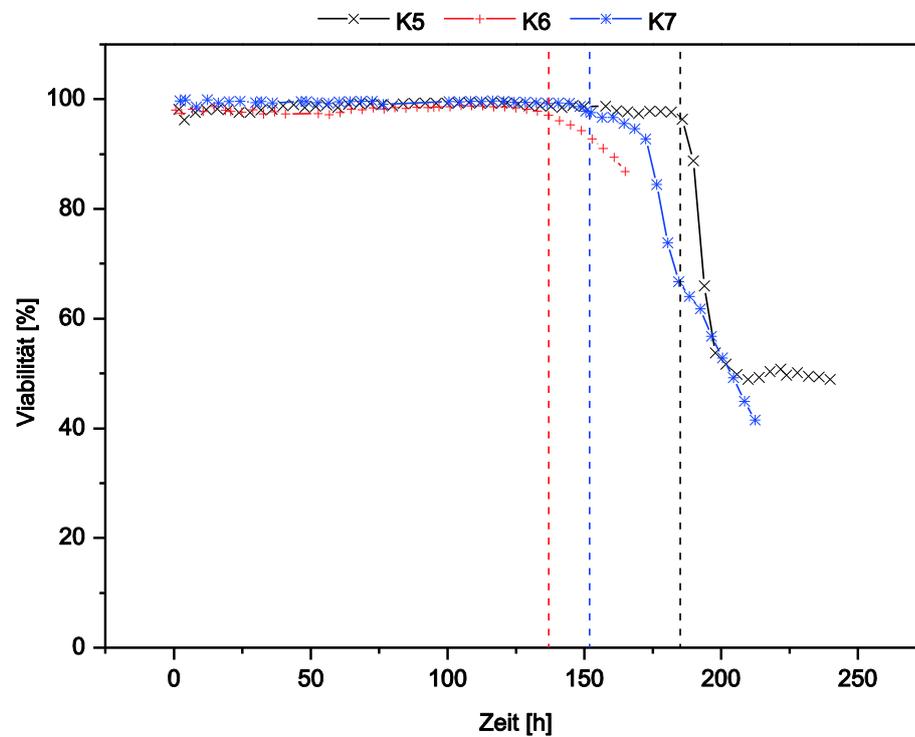


Abbildung 33: Korrelation des PCA-Tiefpunktes der jeweiligen Kultivierung (gestrichelte Linie) mit dem Abfall der Viabilität in den Kultivierungen.

Die Absterbephasen begannen bei K5 nach 185 Stunden, bei K6 nach 137 Stunden und bei K7 nach 152 Stunden. K5 und K7 sind *Fed-Batch*-Prozesse mit längerer Prozessdauer, es wurde regelmäßig frisches Medium den Kulturen zugeführt.

In K6 und K7 liegt der Übergang in die Absterbephase dennoch dicht aneinander, in K7 tritt der Abfall der Viabilität 15 Stunden später auf. Im *Score-Plot* ist dies anhand eines negativeren Tiefpunktes bei K7 ersichtlich. Aufgrund einer höheren *Feed-Frequenz* findet das Absterben bei K5 erst deutlich später statt. In Bezug auf K6 weist die Kultur K5 48 Stunden länger eine hohe Viabilität auf. Dieser Zeitunterschied spiegelt sich im *Score-Plot* in einem deutlich tieferen Minimum wider. Somit zeigt die Lage des Tiefpunktes den Zeitpunkt des Absterbens, wobei ein tieferes Minimum einem späteren Zeitpunkt entspricht.

Der *Score*-Trend der Bypass und *inline* Messungen aller Kultivierungen verlaufen identisch. Allerdings liegen die spektroskopischen Daten der beiden Messorte für eine direkte Modellübertragung zu weit auseinander. Aus diesem Grund muss eine Kombination der Daten und somit eine sukzessive Modellanpassung erfolgen. Dies bedeutet, dass für einen Modelltransfer nach jeder Kultivierung die neuen Messdaten in das Modell integriert werden. Die dadurch erzielte Kombination führt zu einer Verbesserung der chemometrischen Modelle. Dadurch ist ein Modelltransfer zwischen Kultivierungen mit *inline* Messungen und Bypass-Messungen möglich.

Als Beispiel einer solchen sukzessiven Modellanpassung erfolgt eine chemometrische Modellerstellung unter Verwendung der Spektren und dazugehörigen Referenzanalytik der Bypass-überwachten Kultivierung K5 und der *inline*-überwachten Kultivierung K6. Ziel war es die Gesamtzellzahl aus den *inline* Spektraldaten von K7 vorherzusagen. Die resultierende Kalibration besitzt ein R^2 von 0,971 mit einem RMSE von $1,993 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL $^{-1}$.

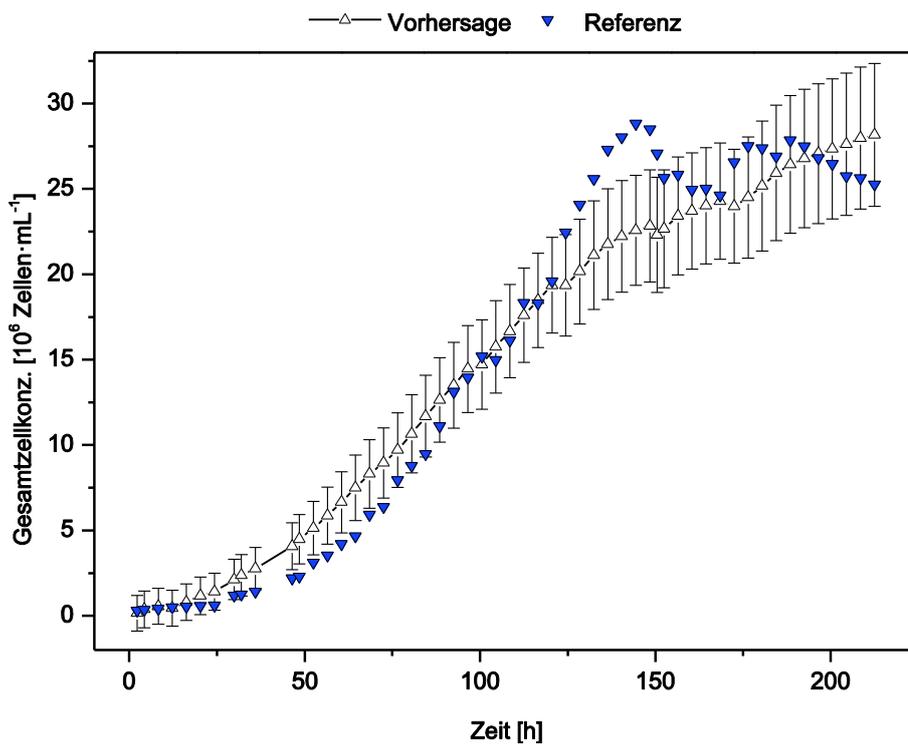


Abbildung 34: Vorhersage der Gesamtzellzahl bei K7 über die 2DF-Spektren. Der dargestellte Fehlerbalken zeigt den Kalibrationsfehler des Modells.

Der Verlauf der vorhergesagten Zellzahl ist bis 120 Stunde weitestgehend identisch mit der Referenz. Dieser Verlauf ist bereits aus dem *Score*-Plot zu erwarten gewesen, da alle drei Kultivierungen einen ähnlichen Verlauf mit nur leichtem Versatz in den anfänglichen *Score*-Werten aufweisen. Ab 130 Stunden ist das Modell nicht mehr in der Lage den Verlauf der Referenz-Zellkonzentration zu folgen.

Das in Abbildung 34 sichtbare Maximum der Referenz-Zellkonzentration fällt schnell wieder ab und steigt daraufhin wieder an. Ein solcher Verlauf ist für eine Kultivierung ungewöhnlich. Es liegt die Vermutung nah, dass die Referenz-Messung nicht der wahren Zellkonzentration entspricht. Der stetige Anstieg der Zellkonzentration in der Vorhersage scheint realistischer zu sein.

Ein weiterer Grund für die Ungenauigkeit des Modells liegt in dem stetig zunehmenden Fehler der Vorhersage zum Ende der Kultivierung. Die beobachteten Unterschiede in den erhaltenen Spektren sind auf den unterschiedlichen Messort zurückzuführen.

Die erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass ein sukzessiver Modelltransfer generell möglich ist, hierfür aber eine höhere Anzahl an Kultivierungen in das Modell einfließen müsste um robustere Vorhersagen treffen zu können.

5.3.2 In situ Mikroskop-Messungen in einer Messkammer

Das am Institut für Technische Chemie entwickelte In situ Mikroskop ist für Messungen im Bioprozess über den Einbau in einen Ingold-Port ausgelegt. Mit dem ISM werden Mikroskopaufnahmen *inline* erstellt und von einem Bildauswertungsalgorithmus ausgewertet. Über eine Bildauswertung können vielseitige Parameter der Zellen wie beispielsweise deren Morphologie, die Zellgröße oder einfach deren Konzentration ermittelt werden [73, 74]. Für die hier dargestellten Experimente wurde das ISM-TT eingesetzt. Das ISM besteht aus einem Mikroskop mit Unendlich-Optik, welche direkt an einem Messspalt endet. Auf der gegenüberliegenden Seite des Spaltes sorgt eine grüne LED für die Beleuchtung des Bildes. Eine CCD-Kamera nimmt das Mikroskopbild auf, welches von einem angeschlossenen Computer gespeichert und analysiert werden kann. Die Einstellung der Messspaltgröße und die Fokussierung erfolgt über computergesteuerte Linearmotoren.

Aufgrund der Messung an einem Messspalt, kann bei dem ISM keine geschlossene Messkammer eingesetzt werden. Daher wird eine 10 mm hohe Kammer mit Verschlussring verwendet. In der nachfolgenden Abbildung 35 ist das ISM mit aufgesetzter 10 mm Messkammer dargestellt. Zusätzlich ist ein gedruckter Querschnitt des Kammerrings sichtbar, welcher die Platzierung am Messspalt veranschaulicht.

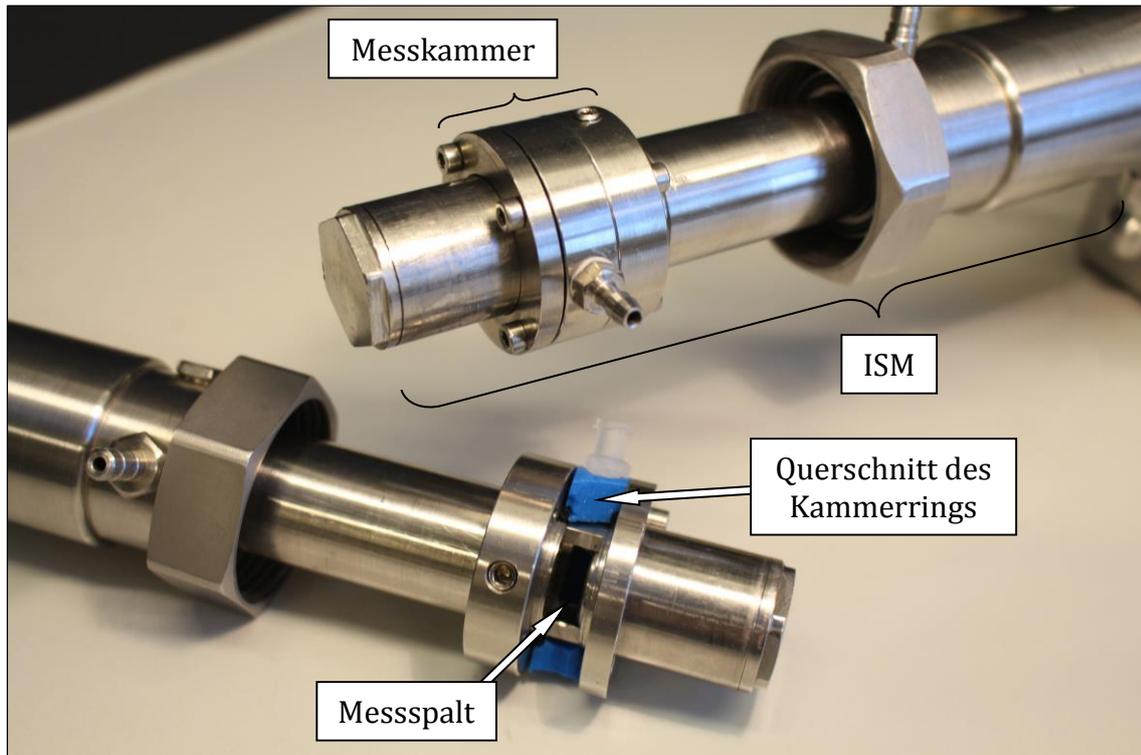


Abbildung 35: In situ Mikroskop mit 10 mm Messkammer-Ausführung. Dargestellt ist eine funktionstüchtige Kammer (oben) und ein 3D-gedruckter Querschnitt des Kammerrings zur Darstellung der Platzierung am Messspalt (unten).

Dieser Aufbau ermöglicht es den Kammerring exakt über dem 7 mm hohen Ein- und Auslass des Messspalts zu platzieren. Vor und nach einer Messung ist der Spalt auf ungefähr 1000 μm geöffnet. Die Probe durchströmt diesen geöffneten Spalt bis die Kammer komplett gefüllt ist. Anschließend wird der Messspalt auf ungefähr 30 μm eingestellt um möglichst nur eine Ebene an Zellen darin aufzunehmen. Eine detaillierte Beschreibung des ISM, des Bilderverarbeitungsalgorithmus und deren Verwendung in Zellkulturprozessen kann der Literatur entnommen werden [75–77].

Die Steuerung des ISM, dies beinhaltet das Verfahren der Motoren, die Aufnahme und das Abspeichern der Bilder ist in die *ComBox* integriert worden. Dadurch kann das ISM über die Automatisierungsplattform während der gesamten Kultivierung gesteuert werden (siehe Kapitel 4.3.1).

5.3.2.1 ISM-Messungen am 2 Liter Reaktor

Im 2 L-Glasreaktor war es zuvor nicht möglich Messungen mit einem ISM durchzuführen. Dies ist erst durch den Einsatz der Messkammer im Bypass möglich geworden. Anhand der in Kapitel 5.2.2.1 diskutierten *Settler*-Kultivierung werden die Ergebnisse der ISM-Messung im Bypass beschrieben. Der zeitliche Verlauf der Referenz- und ISM-Messwerte sind in Abbildung 36 dargestellt.

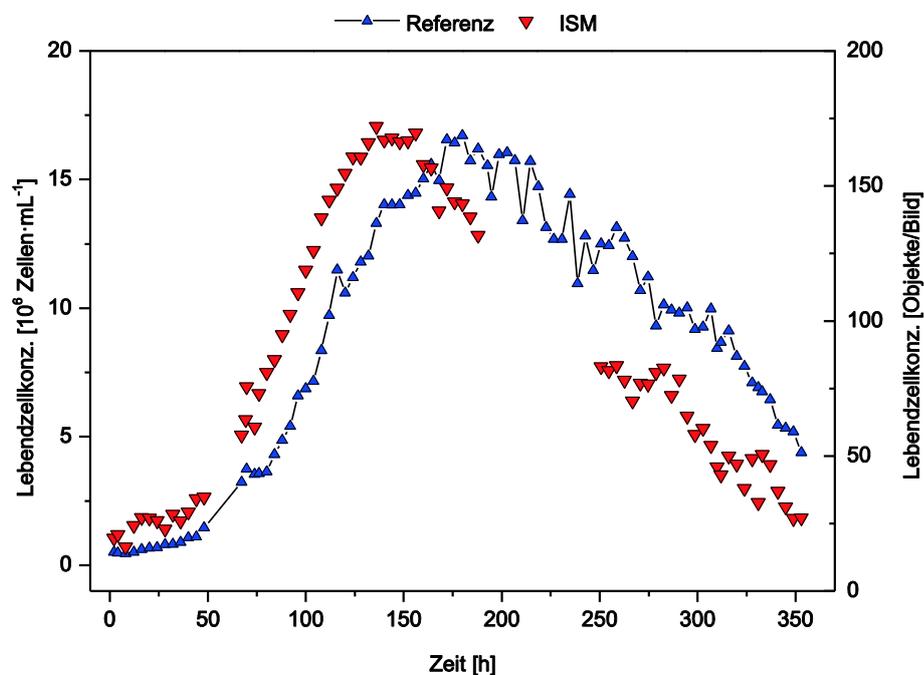


Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf einer 2 L-*Settler*-Kultivierung mit ISM im Bypass-Betrieb. Die Referenzmessung erfolgte mit dem Cedex.

Abbildung 36 zeigt eine ähnliche Zunahme der Zellkonzentration anhand der ISM- und Cedex-Messwerte bis zum Maximum der Zellkonzentration nach 150 Stunden. Es ist in diesem Bereich ein früherer Anstieg der Zellzahl aus den ISM-Messungen zu beobachten, die allerdings parallel zu der Referenz-Konzentration ansteigen. Nach dem Maximum fällt die mit dem ISM bestimmte Zellkonzentration schneller

als die Referenz ab, wonach die *online* Messungen des ISM und die *offline* Messungen des Cedex wieder parallel verlaufen. Es ist somit eine unterschiedliche Abweichung vor und nach der höchsten Zellkonzentration in den Messungen des ISM zu beobachten. Die fehlenden Datenpunkte zwischen 190 Stunden und 250 Stunden sind auf einen Ausfall der ISM-Steuersoftware zurückzuführen.

Aufgrund eines ähnlichen Verlaufs und denselben Beobachtungen vor und nach dem Maximum der Zellkonzentration, werden die Ergebnisse der ISM-Bildauswertung und der Referenzmessungen anhand der Daten aus dem 15 Liter Reaktor im nachfolgenden Abschnitt näher betrachtet.

5.3.2.2 ISM-Messungen am 15 Liter Reaktor

Der Aufbau des ISM in der Messkammer am 15 Liter Reaktor entspricht dem am 2 Liter Reaktor, wodurch die Plattformunabhängigkeit der vorgestellten Messkammer und Automatisierungsplattform demonstriert wird. Abbildung 37 stellt die mit dem Cedex gemessenen Referenz-Zellkonzentrationen gemeinsam mit den ausgewerteten ISM-Bildern dar. Die Kultivierung erfolgte als *Fed-Batch*-Prozess.

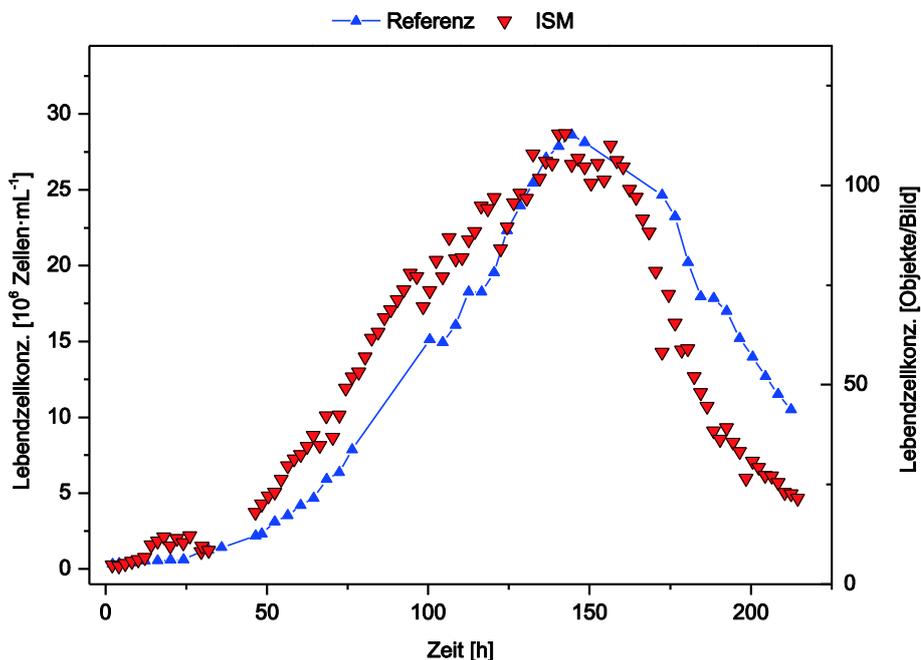


Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der Lebendzellkonzentrationen ermittelt mit dem Cedex und dem ISM.

Die mit einer Bildauswertung automatisch bestimmten Objekte spiegeln den tatsächlichen Verlauf der Lebendzellkonzentration gut wider. Allerdings steigt die Konzentration der Zellen in den Daten des ISM schneller an und verläuft dann parallel zu den Daten des Cedex. Beide Messmethoden erreichen gleichzeitig das Maximum nach ungefähr 140 Stunden. Anschließend fallen die Messwerte des ISM schneller ab und verlaufen erneut nahezu parallel zu den *offline* mit dem Cedex ermittelten Konzentrationen. Dies entspricht denselben Beobachtungen wie im 2 Liter Reaktor (siehe Kapitel 5.3.2.1).

Da der Unterschied vor und nach dem Maximum nicht gleich ausfällt, muss dieser Effekt durch eine Änderung der Zellmorphologie begründet sein. Die Messwerte des Cedex zeigen, dass die durchschnittliche Zellgröße im Verlauf der Kultivierung von ungefähr 15 μm auf 10 μm abnimmt. Die veränderte Größe sorgt gleichzeitig für eine Änderung in der Masse der Zellen. Zu Beginn fällt diese höher aus, wodurch trotz kontinuierlichem Flüssigkeitsstrom eine Ansammlung von Zellen in der Messkammer stattfindet. Da die Aufnahme von 300 Bildern knapp acht Minuten benötigt, führt dies zu einer erhöhten Ansammlung und somit zu einer höheren Schätzung der Zellkonzentration durch den Auswertungsalgorithmus.

Nach dem Maximum der Zellkonzentration resultiert die geringere Zellkonzentrationsmessung des ISM durch die Zunahme an Zellaggregaten und lysierten Zellen in der Absterbephase. Bruchstücke und Aggregate werden von den jeweiligen Messmethoden unterschiedlich behandelt. Besonders das Auftreten von Zellzusammenschlüssen wird von dem ISM-Auswertungsalgorithmus vernachlässigt, da eine Erkennung der Objekte anhand ihrer Größe erfolgt. Wird eine bestimmte Größe überschritten, wird das Objekt nicht mehr als Zelle erkannt. Das Cedex wiederum erkennt Aggregate und versucht anhand ihrer Größe auf die ungefähre Menge an Zellen zu schließen.

5.3.3 Zusammenfassung und Diskussion der Messkammer-Analytik

Es konnte anhand der Fluoreszenzspektroskopie und der In situ Mikroskopie die Funktionsweise der Messkammer demonstriert werden. Die Auswertung der Daten hat gezeigt, dass über die vorgestellten Systeme die Zellkonzentrationen von CHO-Kultivierungen beobachtet werden können.

Der Einsatz der Messkammern hat auch gezeigt, dass für jede gewünschte Analytik-Sonde und der zugrundeliegenden Messtechnik die modularen Bauteile ausgewählt werden müssen. Die Optimierung durch die Verwendung des BioView-Sensors hat gezeigt, dass eine Vielzahl an individuellen Faktoren einen Einfluss auf die Qualität der Daten haben kann. Beliebige Modifikationen der Messkammer, wie eine Oberflächenbeschichtung, sind vergleichsweise einfach zu realisieren. Durch solche Modifikationen wird die flexible Einsetzbarkeit der Messkammer weiter begünstigt.

Je nach Messort können unterschiedliche Faktoren die Aufnahme der Daten beeinflussen, wie beispielsweise eine mögliche Störung durch Luftblasen und Begasung oder eine Lichtreflektion an dem Rührer. Der Einsatz der Messkammer hingegen macht die Messungen untereinander vergleichbarer unabhängig vom Reaktortyp oder der Kultivierungsbedingungen. Die oben genannten Einflüsse kommen bei der Verwendung der Messkammer nicht vor. Lediglich der Einfluss einer Temperaturänderung auf die Messungen ist möglich. Falls die Messsignale sensitiv auf die Temperatur reagieren, kann eine Temperierung der gesamten Messkammer erfolgen.

Die gewonnenen Informationen bei der Verwendung beider Messsysteme haben gezeigt, dass ein Transfer der Daten aus dem Bypass zu den *inline* Messdaten generell möglich ist. Der Messort im Bypass bildet den *inline* Betrieb somit gut nach. Dennoch ist es unumgänglich Referenz-Kultivierungen durchzuführen, um die Korrelation zwischen *inline* und Bypass-Messungen zu überprüfen. Dadurch ist es möglich die Messdaten der unterschiedlichen Einbauorte anzupassen sowie einen sukzessiven Modelltransfer zu realisieren.

Das entwickelte System ist dazu in der Lage unterschiedliche Messtechnik an beliebige Prozesse zu koppeln und darüber hinaus repräsentative Proben für eine beliebige Referenz-Analytik zur Verfügung zu stellen. Dadurch ist die Kombination aus Messkammer und *SampleTaker* ein ideales PAT-Werkzeug mit dem einfach und reproduzierbar eine große Menge an Daten für die Prozessüberwachung und die chemometrische Modellbildung bereitgestellt werden können. Abbildung 38 zeigt eine schematische Darstellung des Aufbaus mit verschiedenen Messkammern und möglicher Referenz-Analytik.

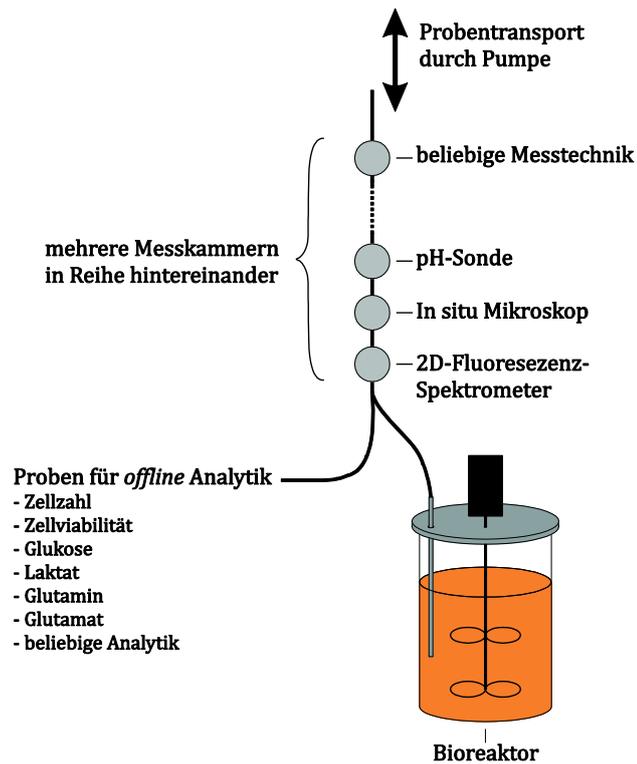


Abbildung 38: Schematische Darstellung verschiedener Messkammern und unterschiedlicher offline Referenz-Analytik für die Erhebung von Daten an einem Bioprozess.

Für neue Analytik-Sonden, die nicht komplett im Autoklav sterilisiert werden können weil beispielsweise die Lichtwellenleiter fest mit der Sonde und dem Spektrometer verbunden sind, muss eine Anpassung für die Durchführung einer SIP-Sterilisation erfolgen. Bei der aktuellen Ausführung der automatischen Probenahme werden für den Flüssigkeitssensor Silikonschläuchen benötigt. Aus diesem Grund kann eine SIP-Sterilisation nicht durchgeführt werden. Der Einsatz von Stahlschläuchen mit einem direkten Dampfanschluss würde dieses ermöglichen, jedoch müsste dadurch auf den Einsatz des Flüssigkeitssensors verzichtet werden.

5.4 Glukose-Regelung im 15 Liter Reaktor durch Einsatz der Automatisierungsplattform

Mit Hilfe von spektroskopischen Messungen, wie sie auch in den Messkammern eingesetzt werden können, ist es möglich chemometrische Modelle zur Vorhersage von Prozessvariablen im Reaktor zu erstellen [76, 78]. Eine solche Vorhersage benötigt eine große Anzahl an Daten aus vorangegangenen Prozessen zur Korrelation der Spektren mit den Referenzmesswerten. Die daraus resultierenden Modelle sind in der Lage z.B. die Konzentration eines Analyten direkt im Bioprozess aus den Spektren vorherzusagen.

Der entwickelte *SampleTaker*, als Automatisierungsplattform wurde dahingehend erweitert, um eine direkte Regelung anhand der Daten zu ermöglichen. Die *ComBox* kann auf die spektralen Ergebnisse zugreifen, diese auswerten und entsprechend einer implementierten Regellogik den Prozess durch beispielsweise Zugabe einer Lösung beeinflussen.

In diesem Beispiel kam ein im Ingold-Port verbautes MIR-Spektrometer (MATRIX-MF, Bruker Optik GmbH, Ettlingen) zum Einsatz. Aus den MIR-Spektren wurde eine Vorhersage der aktuellen Glukosekonzentration im Reaktor ermöglicht. Die Erstellung der Modelle ist nicht Teil dieser Arbeit und wurden von Marko Sandor in vorherigen Arbeiten entwickelt [78]. Basierend auf der aktuellen Vorhersage der Glukosekonzentration anhand der Spektraldaten, ist die entwickelte *ComBox* dazu in der Lage eine Glukoseregung zu realisieren.

5.4.1 Theorie des Glukose-Reglers

Die Regelung der Glukosekonzentration basiert auf einem Zweipunktregler, welcher als Programm auf der *ComBox* ausgeführt wird. Für die Regelung ist an eine der seriellen Schnittstellen des *SampleTaker* eine Peristaltikpumpe (Ismatec IPC 4, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim) angeschlossen, welche eine sterile Glukoselösung aus einer Vorratsflasche in den Reaktor fördert.

Die Aufzeichnung der MIR-Spektren und eine direkte Verarbeitung und Berechnung der aktuellen Glukosekonzentration erfolgt mit der Software SIPAT [79]. Die aktuelle Glukosekonzentration wurde auf einem Netzwerklaufwerk der *ComBox* zur Verfügung gestellt.

Das Regulationsskript greift auf diesen Wert zu und überprüft, ob dieser ober- oder unterhalb der definierten Sollkonzentration liegt. Befindet sich die Konzentration oberhalb des Soll-Wertes werden weitere vier Minuten bis zu einer erneuten Überprüfung und somit dem Vorhandensein eines neuen Messwertes gewartet. Bei einem niedrigeren Messwert wird ebenfalls ein zweites Spektrum nach vier Minuten abgewartet. Nur wenn diese zwei aufeinanderfolgenden Messwerte unterhalb des Soll-Wertes liegen, erfolgt das Ansteuern der Pumpe und somit Zudosieren von Glukose. Dieses Vorgehen verhindert ungewollte Zufütterung aufgrund von Fehlmessungen.

In dem folgenden Experiment beträgt der Glukose-Sollwert $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Die Stammlösung enthält $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose und bei jedem *Feed* erfolgt eine Zugabe von 10 mL der Stammlösung, sodass die Glukosekonzentration im Reaktor um ungefähr $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht wird.

5.4.2 Glukoseverlauf während einer geregelten Kultivierung

Im Folgenden wurde der experimentelle Einsatz des Reglers während einer *Fed-Batch*-Kultivierung mit CHO-Zellen überprüft. In Abbildung 39 ist der zeitliche Glukoseverlauf einer geregelten *Fed-Batch*-Kultivierung zu sehen.

In diesem Experiment erfolgten die MIR-Messungen über ein *inline* verbautes Spektrometer. Es ist ebenfalls möglich die Messtechnik in einer der entwickelten Messkammern zu betreiben und über diese die Daten für die Regelung bereitzustellen.

Die blaue Linie in Abbildung 39 zeigt die vom MIR vorhergesagte Glukosekonzentration, welche aus den jeweiligen Spektren berechnet ist. Die spektroskopische Messung erfolgte alle vier Minuten, wodurch eine sehr hohe Auflösung des Verlaufs möglich war. Bei dieser Kultivierung kam keine automatisierte Beprobung durch den *SampleTaker* zum Einsatz. Die manuelle Probendichte ist deutlich geringer und zeigt zum Teil über einen Zeitraum von 10 Stunden keine Proben (über Nacht).

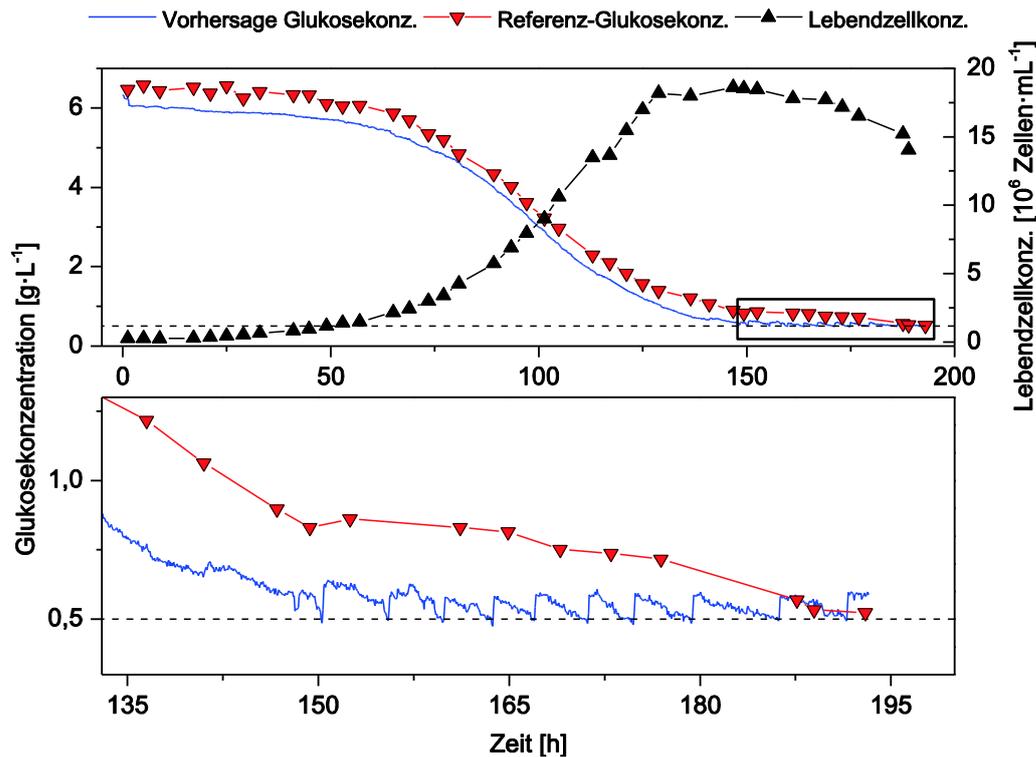


Abbildung 39: Zeitlicher Verlauf der Glukosekonzentration einer Glukose-geregelten Kultivierung zusammen mit der Lebendzellkonzentration (oben) und Detailansicht des geregelten Zeitraums (unten). Die blaue Linie zeigt die über das MIR vorhergesagte Glukosekonzentration, die roten Punkte zeigen die *offline* Referenz Messwerte. Die gestrichelte horizontale Linie symbolisiert den Soll-Wert von $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glukose.

Aus der Detailansicht in Abbildung 39 ist deutlich die aktive Regelung zwischen Stunde 150 und 193 ersichtlich. Sobald die Glukosevorhersage unter den Soll-Wert von $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fällt, wird wie oben erläutert die Pumpe von der *ComBox* gestartet und eine Stammlösung in den Reaktor dosiert. Ab diesem Zeitpunkt tritt ein zackenförmiger Verlauf auf, der die periodische Zufütterung anschaulich belegt.

Die dargestellten Daten zeigen zudem, dass das erstellte und hier verwendete Modell für die Vorhersage nicht ausreichend genau ist. Die *offline* Referenzwerte weichen während des gesamten Verlaufs konstant von der vorhergesagten Konzentration ab. Allerdings ist anhand des zackenförmigen Verlaufs deutlich zu erkennen, dass die Modellvorhersage sensitiv auf die geänderte Glukosekonzentration reagiert.

Die tatsächliche geregelte Konzentration im Reaktor liegt zwischen 0,5 und 0,8 g L⁻¹. Die Machbarkeit und Funktionalität der Regelung ist bewiesen und konnte während der vorliegenden Kultivierung über einen Zeitraum von über 43 Stunden aufrechterhalten werden.

5.4.3 Zusammenfassung und Diskussion der Glukoseregulung

Die Daten zeigen, dass die Automatisierungsplattform ohne große Adaptionen für die direkte Regelung eines Prozesses genutzt werden kann.

Das gezeigte Modell für die Glukosevorhersage besitzt noch keine zufriedenstellende Genauigkeit für eine präzise Regelung. Für die Kalibrierung eines Vorhersagemodells ist eine hohe Probandichte mehrerer Kultivierungen essentiell. Die Verwendung der Automatisierungsplattform für die Probenahme ist in der Lage die Probandichte beliebig zu erhöhen. Dadurch ist es möglich in einer kurzen Zeit und mit geringem Arbeitsaufwand eine umfassende Datengrundlage für die Kalibration von *inline* Messungen zur Verfügung zu stellen.

Für einen effektiveren Einsatz der spektroskopischen Messungen müssen die Modelle weiter optimiert werden. Nur wenn eine robuste und somit unbeeinflussbare Messtechnik vorhanden ist, kann die Regelung über einen weiten Messbereich und Zeitraum realisiert werden. Die Datengrundlage von geregelten Kultivierungen ist bisher nicht vorhanden. Die konstante Menge an Glukose gegen Ende der Kultivierung führt zu veränderten Stoffwechselaktivitäten der Zellen. Eine solche Veränderung innerhalb der Kultivierung muss in Zukunft durch eine sukzessive Modellanpassung erweitert werden. Dadurch wird auch das Modell der Glukosevorhersage verbessert.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Automatisierungsplattform ermöglicht es viele Abläufe rund um einen Tierzellprozess zu automatisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Probenahme geeignet ist, um eine Kultivierung mit minimalem personellem und zeitlichem Aufwand zu überwachen sowie eine hochfrequente Referenzmessung zu ermöglichen. Die Konzentrationen der Zielanalyten Glukose, Laktat, Glutamin, Glutamat sowie die Zellkonzentration und deren Viabilität bleiben über einen Zeitraum von mindestens 72 Stunden bei gekühlter Lagerung konstant. Die Möglichkeit die Proben ausreichend lange gekühlt lagern zu können bildet die Basis um die manuelle Probenahme zu ersetzen.

Die Probenentnahme erfolgt komplett automatisch, die Analytik der Proben kann anschließend in dem genannten Zeitraum gesammelt erfolgen. Dies erleichtert die zeitintensive Beprobung drastisch. Zudem ermöglicht die automatische Probenahme die Messvarianzen zu minimieren, da die Analytik trotz hoher Probendichte von lediglich einer Person erfolgen kann.

Das neu entwickelte Messkammerprinzip integriert sich ideal in den Aufbau des *SampleTaker* und kann gemeinsam mit der automatischen Probenahme betrieben werden. Eine Vielzahl an etablierter Messtechnik kann in die Messkammern eingebaut und so an jeden beliebigen Prozess gekoppelt werden. Hierbei spielt es keine Rolle in welchem Maßstab oder in welchem Reaktor eine Kultivierung durchgeführt wird. Die Verwendung der Probenahme gemeinsam mit mehreren Messkammern bedeutet keine Gefährdung der Sterilität eines Prozesses, da das entwickelte Konzept den Sterilbereich lediglich um den Bypass erweitert. Bei der Konstruktion wurde ein besonderer Fokus auf die korrekte Sterilkonstruktion gelegt, um dadurch die optimale Sterilisierbarkeit zu gewährleisten. Die Sterilität des Systems konnte anhand von insgesamt sieben Kultivierungen mit Betriebszeiten von bis zu 14 Tagen erfolgreich demonstriert werden.

Durch den diskontinuierlichen Betrieb der Probenahme kann eine Probe aus dem Reaktor entnommen, in einer oder mehreren Messkammern analysiert und anschließend wieder steril in den Reaktor zurückgeführt werden. Somit sind volumenverlustfreie Messungen einfach zu realisieren. Auf diese Weise sind auch Überwachungen von kleinvolumigen Kultivierungen möglich. Somit kann das gesamte Spektrum von Reaktoren, vom Schüttelkolben über *Disposable*-Reaktoren und Glasreaktoren bis hin zu Produktionsreaktoren, mit Bypass-Messkammern ausgestattet werden. Aufgrund der Maßstabsunabhängigkeit ist der Einsatz für einen Scale-up geeignet, denn der Modelltransfer zwischen unterschiedlichen Systemen oder dem Bypass und *inline* Betrieb ist mit dem Messkammersystem möglich.

Die Auslagerung komplexer Messtechnik in den Bypass konnte anhand eines 2D-Fluoreszenzspektrometers und eines In situ Mikroskops erfolgreich demonstriert werden. Die spektroskopischen Daten ermöglichten einen qualitativen Vergleich mehrerer Kultivierungen. Darüber hinaus gelang es eine Kalibration mittels chemometrischer Modelle anhand von Daten aus Bypass und *inline* Betrieb miteinander zu kombinieren und eine Vorhersage für die Gesamtzellzahlbestimmung einer unabhängigen Kultivierung zu ermöglichen. Die Mikroskopbilder des ISM ließen eine Beobachtung des Zellwachstums im Bypass-Betrieb zu.

Mit der Automatisierungsplattform konnte darüber hinaus eine Glukose-Regelung realisiert werden. Eine *inline* Vorhersage der aktuellen Glukosekonzentration über ein MIR-Spektrometer lieferte hierfür die Datenbasis. Wie anhand des 2D-Fluoreszenzspektrometers gezeigt werden konnte, ist die Bereitstellung solcher Daten ebenfalls über die Messkammer möglich. Die *ComBox* war in der Lage diese Werte auszulesen und weiter zu verarbeiten. Die entwickelte Regellogik war autark in der Lage bei Bedarf eine entsprechende Menge an Glukoselösung dem Reaktor zuzuführen. Auf diese Art und Weise konnte eine konstante Glukosekonzentration über einen Zeitraum von 43 Stunden aufrecht gehalten werden.

Die universelle Messkammer verbessert die Prozessentwicklung. Besonders in Hinsicht auf einen Scale-up kann durch diese *online* Lösung die Messtechnik von den Reaktorbedingungen und dem Einbauort der Sonden losgelöst werden. Einflüsse wie die Begasungsrate oder die Rührgeschwindigkeit, welche beide durch das

Erzeugen und Verteilen von Luftblasen insbesondere optische Messungen verfälschen können, spielen in diesem Aufbau keine Rolle. Somit können Daten in jeglichen Prozessen unter gleichen Bedingungen aufgezeichnet, miteinander verglichen oder transferiert werden.

Es ist außerdem möglich mit der Messtechnik bereits im kleinen Maßstab, während der Prozessentwicklung, Daten für chemometrische Modelle zu erheben. Durch eine anschließende sukzessive Modellanpassung können diese Daten für den Modellübergang von Bypass zu *inline* Messungen genutzt werden. Somit entsteht eine starke Datengrundlage, welche zusammen mit der Prozessentwicklung wächst und dadurch die Messtechnik schneller im Produktionsmaßstab eingesetzt werden kann.

Dieses innovative Konzept wird dafür sorgen, dass die Auslegung von Prozessen entsprechend der FDA PAT Initiative früher beginnen und auch in bisher nicht einsetzbaren Reaktorkonzepten angewendet werden kann.

Für Weiterentwicklungen der Automatisierungsplattform sollte ein Fokus auf der Anbindung von Analysatoren liegen, welche die automatisch entnommenen Proben direkt vermessen können. Ein Beispiel für eine Integration ist der Einsatz von sequentiellen Injektions Analytik (SIA)-Geräten. Diese kompakten und flexiblen Analysegeräte sind in der Lage eine Vielzahl von beispielsweise optischen Assays zu automatisieren [80–83]. Die Steuerung der Geräte kann dabei ebenfalls über die *ComBox* erfolgen und so die benötigte Menge an Zusatzgeräten minimal halten. Da die Experimente gezeigt haben, dass besonders die Nährstoff- und Metabolitkonzentrationen homogen vermischt sind, kann direkt während der Probenahme eine bestimmte Menge mit dem Autosampler an eine Flüssigkeitsschnittstelle weitergegeben werden. Von dieser könnte der entsprechende Analysator die Probe aufnehmen und sämtliche Analytik durchführen. Neben Messgeräten, die auf optischen Assays basieren, könnten ebenfalls HPLC-Systeme automatisiert und angebunden werden.

Auch neue Zielanalyten für eine Prozessregelung können über die entwickelte Kombination aus Messkammer und Automatisierungsplattform erschlossen werden. Abhängig von den benötigten Messwerten muss eine geeignete Messtechnik in die Messkammern integriert werden. Diese kann, wie bereits mit den MIR-Daten

geschehen, direkt in eine Regelung des Prozesses einfließen. Über ein solches Prinzip kann beispielsweise eine Analytik für Glutamin etabliert werden. Da diese Aminosäure für den Kulturverlauf äußerst kritisch ist, kann eine Regelung der Konzentration den Prozess optimieren.

Neben diesen Weiterentwicklungen kann der Aufbau der Probenahme und Messkammern optimiert werden. In der derzeitigen Konfiguration sind alle Verbindungen mit Silikonschläuchen realisiert da, nur diese die Verwendung eines Flüssigkeitssensors erlauben. Wenn eine Sonde genutzt werden soll, welche nicht direkt im Autoklav sterilisiert werden kann, so muss dieses Konzept angepasst werden. Für diesen Fall können die Silikonschläuche durch Stahlschläuche ersetzt werden. Dadurch ist es möglich, ähnlich dem SIP-Verfahrens der manuellen Probenahme des Edelstahlreaktors, die Messkammern und Schläuche der Probenahme zu sterilisieren.

In einem weiteren Themenbereich wurde der Einsatz des *Additive Manufacturing* im Labor erprobt. *Additive Manufacturing* bzw. *Rapid Prototyping* wird seit Jahren in vielen Industrie- und Forschungszweigen eingesetzt [84]. Die Verwendung in der Biotechnologie ist bisher lediglich im Bereich des *Tissue Engineering* angekommen [85–89]. 3D-Druck wird zukünftig auch in weiteren Bereichen des Labors das Arbeiten revolutionieren. Wissenschaftler werden in der Lage sein individuelle Laborausrüstungen und Verbrauchsmaterialien selbst zu entwerfen und direkt herzustellen.

Diese Technologie ermöglichte es im Rahmen dieser Arbeit die Konstruktion der Messkammer zu beschleunigen und besonders die Sterilkonstruktion zu optimieren. Darüber hinaus wurde die Verwendung des 3D-Drucks für den alltäglichen Laborgebrauch untersucht. In ersten Biokompatibilitäts-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Bauteile aus dem Drucker direkt in Experimenten mit Zellkontakt einsetzbar sind. Der Druck von individuellen Wellplatten sowie anderen Bauteilen wie Kolbendeckel mit Luer-Lock-Anschlüssen zeigten erste Ansätze, die einen hohen Grad an Individualisierung im Labor erlauben. Zudem wurden Experimente für die Bestätigung der Biokompatibilität eines neuen Materials gezeigt.

Die Integration von 3D-Druckern direkt im Labor wird in naher Zukunft eine weitaus zeiteffizientere Entwicklung von neuen Prototypen ermöglichen. Darüber hinaus werden Wissenschaftler dazu in der Lage sein, auch ohne anspruchsvolle Kenntnisse und Fähigkeit im Konstruieren und Fertigen, beinahe jede vorstellbare Geometrie für Modelle herzustellen.

Die Grundlage für eine solche Entwicklung begann mit dem Auslaufen eines der Hauptpatente über das SLS-Verfahren am 28. Januar 2014 [90]. Bis Mitte 2015 laufen viele weitere, thematisch ähnliche Patente aus [91–101]. Mit Wegfall von Patenten werden neue Drucker immer günstiger und die Entwicklung und Verbesserungen der Verfahren immens beschleunigt. Ähnlich der in den Medien als „3D-Druck Revolution“ betitelten Bewegung, die sich nach dem Ablauf der FDM-Patente entwickelte und zu den günstigen Druckern für Privatanwendern führte, wird diese Entwicklung auch für die SLS-Technik erwartet. Die bisher noch sehr teuren Anlagen werden dadurch drastisch im Preis sinken und somit erschwinglich für kleine Unternehmen und besonders Laboratorien werden.

Die Verbrauchsmaterialien von heute wurden zu einer Zeit entwickelt, in der nur eine kleine Menge an Organismen mit geringen bekannten Anforderungen genutzt wurden. Heutzutage sind diese Anforderungen deutlich komplexer geworden. Dennoch erfolgen beispielsweise Kultivierungen immer noch in diesen, vor langer Zeit entwickelten, Gefäßen. Mit Hilfe eines 3D-Druckers kann Verbrauchsmaterial auf ein jeweiliges Experiment oder Organismus angepasst werden, anstatt eine große Bandbreite an Anforderungen mit Standard-Verbrauchsmaterial zu erfüllen.

Diese Entwicklung wird zu einem komplett neuen Ansatz bei der Produktion und Entwicklung von beispielsweise Verbrauchsmaterialien führen und besonders für die Hersteller von heute eine wichtige Thematik, die für die zukünftige Ausrichtung elementar sein wird. Es werden neue Vertriebskonzepte und Serviceangebote nötig sein, um auf den Kunden von morgen bereits heute vorbereitet zu sein. Mit den stetigen Weiterentwicklungen wird es nur eine Frage der Zeit sein, bis 3D-Drucker in biotechnologischen Laboratorien die benötigten Verbrauchsmaterialien bis hin zu kompletten Bioreaktoren herstellen.

Durch den Einsatz der Messkammer ist es möglich dem Ziel der personalisierten Medizin einen weiteren Schritt näher zu kommen. Kultivierungen in den kostengünstigeren *Disposable*-Systemen können durch die Messkammern erstmalig auch mit komplexer Standard-Analytik überwacht und geregelt werden. Diese Kombination aus günstigeren Kultivierungssystemen und einer Automatisierung führt dazu, dass Prozesse im kleinen Maßstab effizienter und dadurch kostengünstiger werden. Genau in dieses Konzept integriert sich auch der 3D-Druck. Die Technologie wird in der Zukunft dazu in der Lage sein ganze Reaktoren zu drucken. Somit kann ein noch höherer Grad an Individualisierung erreicht werden, der ein wichtiger Faktor für die personalisierte Medizin darstellt.

Sowohl anspruchsvolle Messtechnik in allen Kultivierungsprozessen als auch die Möglichkeit günstig und flexibel neue Reaktorkonzepte zu drucken, wird die Menschheit näher an das Ziel der ewigen Gesundheit bringen.

7. Literatur

- [1] Chen, Y. H., Ng, C., Wang, Y., Data reduction in integrated reverse engineering and rapid prototyping, *Int. J. Comput. Integr. Manuf.*, Jan. 1999, 12, pp. 97–103, DOI: 10.1080/095119299130344.
- [2] Chua, C. K., Leong, K. F., Lim, C. C. S., Chu Sing, C., *Rapid Prototyping: Principles and Applications*. Hackensack, NJ: World Scientific, 2010.
- [3] Upcraft, S., Fletcher, R., The rapid prototyping technologies, *Assem. Autom.*, 2003, 23, pp. 318–330, DOI: 10.1108/01445150310698634.
- [4] Cheah, C. M., Chua, C. K., Lee, C. W., Feng, C., et al., Rapid prototyping and tooling techniques: a review of applications for rapid investment casting, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, Aug. 2004, 25, pp. 308–320, DOI: 10.1007/s00170-003-1840-6.
- [5] Gibson, I., Shi, D., Material properties and fabrication parameters in selective laser sintering process, *Rapid Prototyp. J.*, 1997, 3, pp. 129–136, DOI: 10.1108/13552549710191836.
- [6] Wong, K. V., Hernandez, A., A Review of Additive Manufacturing, *ISRN Mech. Eng.*, 2012, 2012, pp. 1–10, DOI: 10.5402/2012/208760.
- [7] Noorani, R. I., *Rapid prototyping: principles and applications*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2006.
- [8] Cooper, K. G., *Rapid Prototyping Technology Selection and Application*. New York, NY: Marcel Dekker, 2001.
- [9] Kruth, P. P., Material Inccress Manufacturing by Rapid Prototyping Techniques, *CIRP Ann. - Manuf. Technol.*, 1991, 40, pp. 603–614, DOI: 10.1016/S0007-8506(07)61136-6.
- [10] Halloran, J. W., Tomeckova, V., Gentry, S., Das, S., et al., Photopolymerization of powder suspensions for shaping ceramics, *J. Eur. Ceram. Soc.*, Nov. 2011, 31, pp. 2613–2619, DOI: 10.1016/j.jeurceramsoc.2010.12.003.
- [11] Bogue, R., 3D printing: the dawn of a new era in manufacturing?, *Assem. Autom.*, 2013, 33, pp. 307–311, DOI: 10.1108/AA-06-2013-055.

- [12] Zhang, X., Zhou, B., Zeng, Y., Gu, P., Model layout optimization for solid ground curing rapid prototyping processes, *Robot. Comput. Integr. Manuf.*, Feb. 2002, 18, pp. 41–51, DOI: 10.1016/S0736-5845(01)00022-9.
- [13] Kruth, J., Mercelis, P., Vaerenbergh, J. Van, Froyen, L., et al., Binding mechanisms in selective laser sintering and selective laser melting, *Rapid Prototyp. J.*, Feb. 2005, 11, pp. 26–36, DOI: 10.1108/13552540510573365.
- [14] Allen, S. D., Laser chemical vapor deposition: A technique for selective area deposition, *J. Appl. Phys.*, 1981, 52, p. 6501, DOI: 10.1063/1.328600.
- [15] Lücking, T. H., Sambale, F., Beutel, S., Scheper, T., 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: A proof of principle, *Eng. Life Sci.*, 2014, pp. 1–6, DOI: 10.1002/elsc.201400093.
- [16] Lücking, T. H., Sambale, F., Schnaars, B., Bulnes-Abundis, D., et al., 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures, *Eng. Life Sci.*, 2014, pp. 1–8, DOI: 10.1002/elsc.201400094.
- [17] Kessler, R. W., Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis, Weinheim: Wiley-VCH, 2006, pp. 14–18.
- [18] Storhas, W., Bioreaktoren und periphere Einrichtungen. Braunschweig; Wiesbaden: Vieweg, 1994.
- [19] Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, *Ingold-Stutzen zum Prozessanschluss von Sensoren oder Armaturen*, 2009.
- [20] Aehle, M., Kuprijanov, A., Schaepe, S., Simutis, R., et al., Simplified off-gas analyses in animal cell cultures for process monitoring and control purposes, *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33, pp. 2103–2110, DOI: 10.1007/s10529-011-0686-5.
- [21] Warikoo, V., Godawat, R., Brower, K., Jain, S., et al., Integrated continuous production of recombinant therapeutic proteins., *Biotechnol. Bioeng.*, Dec. 2012, 109, pp. 3018–29, DOI: 10.1002/bit.24584.
- [22] Rathore, A. S., Agarwal, H., Sharma, A. K., Pathak, M., et al., Continuous Processing for Production of Biopharmaceuticals, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2015, 45, pp. 836–849, DOI: 10.1080/10826068.2014.985834.
- [23] Kroll, P., Sagmeister, P., Reichelt, W., Neutsch, L., et al., Ex situ online monitoring: application, challenges and opportunities for biopharmaceuticals processes, *Pharm. Bioprocess.*, Jun. 2014, 2, pp. 285–300, DOI: 10.4155/pbp.14.22.

- [24] Dünnebieber, G., Tups, H., FDA PAT Initiative – Eine Anwendersicht zu technischen Möglichkeiten und aktueller industrieller Umsetzung, *Chemie Ing. Tech.*, Dec. 2007, 79, pp. 2019–2028, DOI: 10.1002/cite.200700156.
- [25] Chong, L., Saghafi, M., Knappe, C., Steigmiller, S., et al., Robust on-line sampling and analysis during long-term perfusion cultivation of mammalian cells., *J. Biotechnol.*, May 2013, 165, pp. 133–7, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.008.
- [26] Hilmer, J.-M., Scheper, T., A new version of an in situ sampling system for bioprocess analysis, *Acta Biotechnol.*, 1996, 16, pp. 185–192, DOI: 10.1002/abio.370160216.
- [27] Lütkemeyer, D., Poggendorf, I., Scherer, T., Zhang, J., et al., First steps in robot automation of sampling and sample management during cultivation of mammalian cells in pilot scale, *Biotechnol. Prog.*, 2000, 16, pp. 822–828, DOI: 10.1021/bp0001009.
- [28] Sanner, M. F., Python: a programming language for software integration and development., *J. Mol. Graph. Model.*, 1999, 17, pp. 57–61, DOI: 10.1016/S1093-3263(99)99999-0.
- [29] Vyatkin, V. . B., Software engineering in industrial automation: State-of-the-art review, *IEEE Trans. Ind. Informatics*, 2013, 9, pp. 1234–1249.
- [30] NSAI, Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials (ISO 10993-12:2012), 2012.
- [31] Taylor, M. J., Tanna, S., Sahota, T., In vivo study of a polymeric glucose-sensitive insulin delivery system using a rat model., *J. Pharm. Sci.*, 2010, 99, pp. 4215–4227, DOI: 10.1002/jps.
- [32] Kroll, A., Dierker, C., Rommel, C., Hahn, D., et al., Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays., *Part. Fibre Toxicol.*, Jan. 2011, 8, p. 9, DOI: 10.1186/1743-8977-8-9.
- [33] Halliwell, B., Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem?, *FEBS Lett.*, 2003, 540, pp. 3–6, DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00235-7.
- [34] Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B., Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Jan. 2006, 899, pp. 136–147, DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x.
- [35] Halliwell, B., Biochemistry of oxidative stress., *Biochem. Soc. Trans.*, Nov. 2007, 35, pp. 1147–50, DOI: 10.1042/BST0351147.
- [36] Rawlings, B., Pora, H., Environmental impact of single-use and reusable bioprocess systems, *BioProcess Int.*, 2009, 2, p. 18.25.

- [37] Jacobs, G., A review of the effects of gamma radiation on pharmaceutical materials, *J. Biomater. Appl.*, 1995, 10, pp. 59–96, DOI: 10.1177/088532829501000104.
- [38] Hass, V. C., Pörtner, R., Praxis der Bioprozesstechnik. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl., 2011.
- [39] Hu, W.-S., Cell Culture Bioprocess Engineering. 2013.
- [40] Gstraunthaler, G., Lindl, T., Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl., 2013.
- [41] Eagle, H., Barban, S., Levy, M., Schulze, O., et al., The Utilization of Carbohydrates by Human Cell Cultures, *J. Biol. Chem.*, 1958, 233, pp. 551–558.
- [42] Collins, C. L., Wasa, M., Souba, W. W., Abcouwer, S. F., Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines, *J. Cell. Physiol.*, 1998, 176, pp. 166–178, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<166::AID-JCP18>3.0.CO;2-5.
- [43] Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M. M. R., Pithon-Curi, T. C., et al., Glutamine and glutamate - their central role in cell metabolism and function., *Cell Biochem. Funct.*, 2003, 21, pp. 1–9, DOI: 10.1002/cbf.1003.
- [44] Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D. L., et al., A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells., *J. Biotechnol.*, May 2011, 153, pp. 22–6, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.03.001.
- [45] Haldankar, R., Li, D., Saremi, Z., Baikalov, C., et al., Serum-free suspension large-scale transient transfection of CHO cells in WAVE bioreactors., *Mol. Biotechnol.*, Oct. 2006, 34, pp. 191–9.
- [46] Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., et al., Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions., *Nucleic Acids Res.*, Sep. 2008, 36, p. e96, DOI: 10.1093/nar/gkn423.
- [47] Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., Wurm, F. M., Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives., *Biotechnol. Lett.*, May 2007, 29, pp. 677–84, DOI: 10.1007/s10529-006-9297-y.
- [48] Evans, W. E., Relling, M. V., Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics., *Nature*, 2004, 429, pp. 464–468, DOI: 10.1038/nature02626.
- [49] Shastry, B. S., Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine., *Pharmacogenomics J.*, 2006, 6, pp. 16–21, DOI: 10.1038/sj.tpj.6500338.

- [50] Wurm, F. M., Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nat. Biotechnol.*, Nov. 2004, 22, pp. 1393–8, DOI: 10.1038/nbt1026.
- [51] Zhou, W., Rehm, J., Hu, W. S., High viable cell concentration fed-batch cultures of hybridoma cells through on-line nutrient feeding, *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, 46, pp. 579–587, DOI: 10.1002/bit.260460611.
- [52] Lu, S., Sun, X., Zhang, Y., Insight into metabolism of CHO cells at low glucose concentration on the basis of the determination of intracellular metabolites, *Process Biochem.*, 2005, 40, pp. 1917–1921, DOI: 10.1016/j.procbio.2004.07.004.
- [53] Hayter, P. M., Curling, E. M. a, Gould, M. L., Baines, a. J., et al., The effect of the dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-Gamma production in glucose-limited chemostat culture, *Biotechnol. Bioeng.*, 1993, 42, pp. 1077–1085, DOI: 10.1002/bit.260420909.
- [54] Jang, J. D., Barford, J. P., An unstructured kinetic model of macromolecular metabolism in batch and fed-batch cultures of hybridoma cells producing monoclonal antibody, *Biochem. Eng. J.*, 2000, 4, pp. 153–168, DOI: 10.1016/S1369-703X(99)00041-8.
- [55] Chu, L., Robinson, D. K., Industrial choices for protein production by large-scale cell culture, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, 12, pp. 180–187, DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00197-X.
- [56] Butler, M., Animal cell cultures: Recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 68, pp. 283–291, DOI: 10.1007/s00253-005-1980-8.
- [57] Huang, Y.-M., Hu, W., Rustandi, E., Chang, K., et al., Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment., *Biotechnol. Prog.*, 2010, 26, pp. 1400–1410, DOI: 10.1002/btpr.436.
- [58] Mulukutla, B. C., Gramer, M., Hu, W. S., On metabolic shift to lactate consumption in fed-batch culture of mammalian cells, *Metab. Eng.*, 2012, 14, pp. 138–149, DOI: 10.1016/j.ymben.2011.12.006.
- [59] Tritsch, G. L., Moore, G. E., Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media., *Exp. Cell Res.*, 1962, 28, pp. 360–364, DOI: 10.1016/0014-4827(62)90290-2.
- [60] Mercille, S., Massie, B., Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells, *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 44, pp. 1140–1154, DOI: 10.1002/bit.260440916.

- [61] Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., et al., Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells, *J. Cell Biol.*, 2007, 178, pp. 93–105, DOI: 10.1083/jcb.200703099.
- [62] Marose, S., Lindemann, C., Scheper, T., Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring., *Biotechnol. Prog.*, 1998, 14, pp. 63–74, DOI: 10.1021/bp970124o.
- [63] Hantelmann, K., Kollecker, M., Hüll, D., Hitzmann, B., et al., Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a novel approach for controlling fed-batch cultivations., *J. Biotechnol.*, Feb. 2006, 121, pp. 410–7, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.07.016.
- [64] Lindemann, C., Marose, S., Nielsen, H. ., Scheper, T., 2-Dimensional fluorescence spectroscopy for on-line bioprocess monitoring, *Sensors Actuators B Chem.*, Aug. 1998, 51, pp. 273–277, DOI: 10.1016/S0925-4005(98)00195-6.
- [65] Stärk, E., Hitzmann, B., Schügerl, K., Scheper, T., et al., A Useful Tool for Non-invasive Bioprocess Monitoring, 2002, 74.
- [66] Wu, P., Ozturk, S. S., Blackie, J. D., Thrift, J. C., et al., Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, 45, pp. 495–502, DOI: 10.1002/bit.260450606.
- [67] Kessler, R., Multivariate Datenanalyse, I. 2013.
- [68] Wang, L., Mizaikoff, B., Application of multivariate data-analysis techniques to biomedical diagnostics based on mid-infrared spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, pp. 1641–1654, DOI: 10.1007/s00216-008-1989-9.
- [69] Yildiz, F., Yetim, a. F., Alasaran, a., Efeoglu, I., Wear and corrosion behaviour of various surface treated medical grade titanium alloy in bio-simulated environment, *Wear*, 2009, 267, pp. 695–701, DOI: 10.1016/j.wear.2009.01.056.
- [70] Bloyce, a., Qi, P. Y., Dong, H., Bell, T., Surface modification of titanium alloys for combined improvements in corrosion and wear resistance, *Surf. Coatings Technol.*, 1998, 107, pp. 125–132, DOI: 10.1016/S0257-8972(98)00580-5.
- [71] Subramanian, B., Muraleedharan, C. V., Ananthakumar, R., Jayachandran, M., A comparative study of titanium nitride (TiN), titanium oxy nitride (TiON) and titanium aluminum nitride (TiAlN), as surface coatings for bio implants, *Surf. Coatings Technol.*, 2011, 205, pp. 5014–5020, DOI: 10.1016/j.surfcoat.2011.05.004.
- [72] Leyendecker, T., Lemmer, O., Esser, S., Ebberink, J., The development of the PVD coating TiAlN as a commercial coating for cutting tools, *Surf. Coatings Technol.*, 1991, 48, pp. 175–178, DOI: 10.1016/0257-8972(91)90142-J.

- [73] Suhr, H., Wehnert, G., Schneider, K., Bittner, C., et al., In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus, *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, 47, pp. 106–116, DOI: 10.1002/bit.260470113.
- [74] Joeris, K., Frerichs, J. G., Konstantinov, K., Scheper, T., In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures, *Cytotechnology*, 2002, 38, pp. 129–134, DOI: 10.1023/A:1021170502775.
- [75] Bluma, A., Höpfner, T., Lindner, P., Rehbock, C., et al., In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art., *Anal. Bioanal. Chem.*, Nov. 2010, 398, pp. 2429–38, DOI: 10.1007/s00216-010-4181-y.
- [76] Lüder, C., Lindner, P., Bulnes-Abundis, D., Lu, S. M., et al., In situ microscopy and MIR-spectroscopy as non-invasive optical sensors for cell cultivation process monitoring, *Pharm. Bioprocess.*, Sep. 2014, 2, pp. 157–166, DOI: 10.2217/PBP.14.13.
- [77] Akin, M., Prediger, A., Yuksel, M., Höpfner, T., et al., A new set up for multi-analyte sensing: at-line bio-process monitoring., *Biosens. Bioelectron.*, Jul. 2011, 26, pp. 4532–7, DOI: 10.1016/j.bios.2011.05.018.
- [78] Sandor, M., Rüdinger, F., Bienert, R., Grimm, C., et al., Comparative study of non-invasive monitoring via infrared spectroscopy for mammalian cell cultivations, *J. Biotechnol.*, 2013, 168, pp. 636–645, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.002.
- [79] Markl, D., Wahl, P. R., Menezes, J. C., Koller, D. M., et al., Supervisory control system for monitoring a pharmaceutical hot melt extrusion process., *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14, pp. 1034–44, DOI: 10.1208/s12249-013-9992-7.
- [80] Wu, C.-H., Scampavia, L., Ruzicka, J., Zamost, B., Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system, *Analyst*, 2001, 126, pp. 291–297, DOI: 10.1039/b009167g.
- [81] Ruzicka, J., Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection, *Analyst*, 2000, 125, pp. 1053–1060, DOI: 10.1039/b001125h.
- [82] Economou, A., Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment, *Trends Anal. Chem.*, 24, pp. 416–425, 2005.
- [83] Solich, P., Polášek, M., Klimundová, J., Ruzicka, J., Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis, *Trends Anal. Chem.*, 2004, 23, pp. 116–126, DOI: 10.1016/S0165-9936(04)00304-8.

-
- [84] Gross, B. C., Erkal, J. L., Lockwood, S. Y., Chen, C., et al., Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical sciences., *Anal. Chem.*, Apr. 2014, *86*, pp. 3240–53, DOI: 10.1021/ac403397r.
- [85] Williams, J. M., Adewunmi, A., Schek, R. M., Flanagan, C. L., et al., Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering., *Biomaterials*, Aug. 2005, *26*, pp. 4817–27, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.057.
- [86] Landers, R., Pfister, A., Hübner, U., John, H., et al., Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques, *J. Mater. Sci.*, 2002, *37*, pp. 3107–3116, DOI: 10.1023/A:1016189724389.
- [87] Tan, K. H., Chua, C. K., Leong, K. F., Cheah, C. M., et al., Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering, *Biomed. Mater. Eng.*, Jan. 2005, *15*, pp. 113–24.
- [88] Billiet, T., Vandenhaute, M., Schelfhout, J., Van Vlierberghe, S., et al., A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering., *Biomaterials*, Sep. 2012, *33*, pp. 6020–41, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.050.
- [89] Peltola, S. M., Melchels, F. P. W., Grijpma, D. W., Kellomäki, M., A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes., *Ann. Med.*, Jan. 2008, *40*, pp. 268–80, DOI: 10.1080/07853890701881788.
- [90] Deckard, C., *Method for producing parts by selective sintering*, US Patent 5639070, 1997.
- [91] Allison, J., Childers, C., Hull, C., *Method of making a three-dimensional object by stereolithography*, US Patent 5609813, 1993.
- [92] Lewis, M., Little, F., Pitlak, R., *Rapid and accurate production of stereolithographic parts*, US Patent 5610824, 1997.
- [93] Comb, J., Crump, S., *Process of support removal for fused deposition modeling*, US Patent 5503785, 1996.
- [94] Hull, C., Jacobs, P., Schmidt, K., *Method of building three dimensional objects with sheets*, US Patent 5637169, 1997.
- [95] Deckard, C., *Method and apparatus for producing parts by selective sintering*, 1989.
- [96] Anderson, R., Barnes, D., Sitzmann, E., *Increasing the useful range of cationic photoinitiators in stereolithography*, US Patent 5494618, 1996.
- [97] Almquist, T., Cohen, A., Hull, C., *Recoating of stereolithographic layers*, US Patent 5651934, 1997.

- [98] Brown, R., Kirschman, C., Menhennett, H., *Apparatus and method for thermal normalization in three-dimensional article manufacturing*, US Patent 5572431, 1996.
- [99] Khoshevis, B., *Additive fabrication apparatus and method*, US Patent 5529471, 1996.
- [100] Forderhase, P., Ganninger, M., *Selective laser sintering with composite plastic material*, US Patent 5733497, 1998.
- [101] Hull, C., *Method for production of three-dimensional objects by stereolithography*, US Patent 5762856, 1990.
- [102] Guilbault, G. G., Lubrano, G. J., An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose, *Anal. Chim. Acta*, 1973, 64, pp. 439–455, DOI: 10.1016/S0003-2670(01)82476-4.
- [103] Wang, J., Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges, *Electroanalysis*, 2001, 13, pp. 983–988, DOI: 10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::AID-ELAN983>3.0.CO;2-#.
- [104] Brinkmann, M., Lütkemeyer, D., Gudermann, F., Lehmann, J., New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'the Cellscreen,' *Cytotechnology*, 2002, 38, pp. 119–127, DOI: 10.1023/A:1021118501866.

8. Anhang

8.1 Material

In den folgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet.

8.1.1 Materialien für die Reaktorkultivierungen

Bezeichnung	Produkt	Bezugsquelle
15 Liter Edelstahlreaktor	BIOSTAT® Cplus	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
2 Liter Glasreaktor	UniVessel®	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
2D-Fluoreszenzspektrometer	BioView®	DELTA, Hørsholm, Dänemark
Automatischer Zellzähler	Cedex	Roche Innovatis AG, Penzberg
Biochemischer Analysator	YSI 2700 und YSI 2950	YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA
Datenbank Software	SIPAT	SIPAT, Siemens Inc., Brüssel, Belgien
Glasreaktor Probenahme Ventil	Sampling Valve 78200077	DASGIP, Jülich
Glukose für Feed	D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glutamin für Medium	L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin
Hamsterovarienzellen	CHO-K1-HP	AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld
Hypoxanthin/Thymidin für Medium	Gibco® HAT Supplement 100 x	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Ingold-Probenahmeventil	SVC 25, B221610000103	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Konzentriertes Feedmedium	CHOMACS Feed Supplement	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Messkammerdeckel Beschichtung	TiAlN-Beschichtung	Feilen Pieper, Wagenfeld

Bezeichnung	Produkt	Bezugsquelle
NIR-Spektrometer	BioPAT® Spectro NIR	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
pH-Elektrode	EASYFERM Plus	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Plattensedimenter	CS 10	Biotechnology Solutions, Orinda, CA, USA
pO ₂ -Sonde	OXYFERM FDA	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Pumpen für <i>Feed</i> und <i>Settler</i>	IPC 4	IDEX Health & Science GmbH, Wertheim
Reaktorsteuerung für 2 Liter Reaktor	BIOSTAT® Bplus Twin	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Sacova-Ventil	Safe Coupling Valve, DE-1002707	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Schlauch für Schweißgerät	C-Flex Clear 082, 3/16"x5/16"	Saint-Gobain, Courbevoie, Frankreich
Schlauchschweißgerät	BioWelder® Konnektor 16370	Sartorius AG, Göttingen
Schüttelkolben	250 mL	Corning, Tewksbury, MA, USA
Silikonschlauch	Innendurchmesser: 4 mm, Außendurchmesser 8 mm	VWR
Silikonschlauch für Magnetklemmventil	Innendurchmesser: 1,5mm, Außendurchmesser: 3mm	VWR
Software für multivariate Datenanalyse	The Unscrambler® X 10.1	CAMO Software AS, Oslo, Norwegen
Zellkulturmedium	CHOMACS CD	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

8.1.2 Materialien und Bauteile für den *SampleTaker*

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
0,2 µm Luftfilter	Sartolab® P20	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Autosampler	ASX 260	Cetac, Omaha, Nebraska, USA
<i>Embedded System</i> Rechner (<i>ComBox</i>)	PortuxG20	taskit, Berlin
Flüssigkeitssensor	SONOCHECK ABD06.58	SONOTEC, Halle / Saale
Magnetklemmventil	S104-09-Z031A 12V DC	ASCO Numatics Sirai, Bussero, Italy

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
Netzteile für <i>SampleTaker</i>	Schaltnetzteil 76,8 W, 3,2 A, 24 V und 54 W, 6 A, 5/12 V	reichelt elektronik GmbH & Co. KG, Sande
Probenröhrchen für Probensammler	PP 14 mL 100x16 mm	S-prep GmbH, Überlingen
Rückschlagventil	12005	Pieper Filter GmbH, Bad Zwischenahn
<i>SampleTaker</i> Gehäuse	EB E-BOX 300x400x155 RAL 7035	Rittal GmbH & Co. KG, Herborn
Spritzenpumpe	Cavro XLP6K 3P 50 mL	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

8.1.3 Materialien für den 3D-Druck und die Materialtests

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
24er-Wellplatten	Culture Plate Flat Bottom	Sarstedt, Newton, NC, USA
3D-gedruckte Wellplatten und Rohmaterial	PA12 und PA12 UV	Blue Production, Paderborn
CAD-Software	Autodesk Inventor Professional 2014	Autodesk, Inc., San Rafael, CA, USA
Epithelzellen	A549 - DSMZ Nr. ACC 107	DSMZ GmbH, Braunschweig
FDM-Drucker	CubeX Trio	3D Systems, Rock Hill, SC, USA
Fetales Kälberserum	FCS	Biochrom GmbH, Berlin
Fibroblasten	NIH-3T3 - DSMZ Nr. ACC59	DSMZ GmbH, Braunschweig
Fluoreszenz-Wellplatten-Reader	Fluoroskan Acent	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Membranintegritätsassay	CytoTox-ONE™	Promega, Mannheim
Zellkulturmedium	DMEM	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Zellviabilitätsassay	CellTiter-Blue®	Promega, Mannheim
Zentrifuge	5702	Eppendorf AG, Hamburg

8.2 Methoden

8.2.1 Reaktorkultivierungen

8.2.1.1 Vorkultur

Für jede Kultivierung wird eine CHO-K1-HP Kultur (AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) aus der *working cell bank* aufgetaut. Diese Kultur wird anschließend in CHOMACS CD-Medium unter Zugabe von 8 mM L-Glutamin und 1 % HT kultiviert. Nach 3 - 4 Tagen, bei einer Zellkonzentration von ungefähr $1 \cdot 10^7$ Zellen \cdot mL $^{-1}$, erfolgt das Passagieren mit frischem Medium auf eine Zelldichte von $4 - 5 \cdot 10^5$ Zellen \cdot mL $^{-1}$. Nach mindestens zwei Passagen erfolgt eine Expansion der Kultur auf ein ausreichendes Volumen um den jeweiligen Reaktor zu innokulieren.

8.2.1.2 2 Liter Reaktorkultivierung

Der 2 L-Glasreaktor muss vorbereitet und anschließend komplett im Autoklav bei 121 °C, 2 bar für 30 Minuten sterilisiert werden. Alle benötigten Vorlage- und Inokulationsgefäße können zusammen mit dem Reaktor vorbereitet und sterilisiert werden.

Der Reaktor wird mit einem Arbeitsvolumen von 1,8 L betrieben. Das Medium und sämtliche Supplemente werden unter der Sterilwerkbank über einen 0,2 μ m Nutschenfilter in die Vorlageflasche überführt. Die 1,8 L beinhalten 72 mL L-Glutamin, 18 mL HT, sowie die benötigte Menge an Zellsuspension für eine Animpfdichte von $4 - 5 \cdot 10^5$ Zellen \cdot mL $^{-1}$. Vor der Zugabe der Zellen muss das Medium auf 37 °C vortemperiert werden.

Die Kultivierungsbedingungen entsprechen denen in Tabelle 2 aufgelistet Werten. Da kein Durchflussregler im Biostat Bplus-System vorhanden ist, muss die Sparger- und Kopfraumbegasung manuell eingestellt werden. Die O₂- und CO₂-Zugabe über den Ringsparger erfolgt mit 1 - 2 Normliter \cdot h $^{-1}$ (ideal 30 - 50 ccm). Die Luftzugabe über den Kopfraum erfolgt mit 4 Normliter \cdot h $^{-1}$ (200 ccm).

8.2.1.3 15 Liter Reaktorkultivierung

Der 15 L-Edelstahlreaktor verfügt über eine SIP Sterilisationsprozedur. Der Reaktor sowie alle benötigten Vorlage- und Innokulationsgefäße müssen am Tag vor der Innokulation vorbereitet und autoklaviert werden. Der Ablauf der Reaktor-Sterilisation erfolgt automatisiert.

Der Reaktor wird mit einem Arbeitsvolumen von 7,5 L betrieben. Hierfür erfolgt zuerst eine Zugabe von 6 Liter CHOMACS CD Medium, 300 mL L-Glutamin und 75 mL HT. Das Medium und alle Supplemente werden unter der Sterilwerkbank über einen 0,2 µm Nutschenfilter in die Vorlageflasche überführt. Der Reaktorinhalt wird daraufhin auf die Betriebstemperatur von 37 °C aufgeheizt. Sobald das benötigte Innokulationsvolumen für $4 - 5 \cdot 10^5$ Zellen·mL⁻¹ bekannt ist wird die Differenz an Medium dem Reaktor zugeführt. Anschließend erfolgt die Zugabe der Zellen.

Die Aufzeichnung der MIR-Spektren und anschließende Verrechnung für die in Kapitel 5.4 dargestellte Glukoseregulation erfolgte mit der Software SIPAT (Siemens Inc., Brüssel, Belgien).

Das *Feeden* erfolgte über eine mit Pumpschlauch am Sacova-Ventil angeschlossene Flasche. Das Hineinfördern erfolgte entweder manuell mit Kontrolle des entnommenen Volumens über eine Waage, oder bei der Glukoseregulation automatisch über eine von der *ComBox* angesteuerten Pumpe.

Die Kultivierungsbedingungen sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2: Kultivierungsbedingungen im 2 L und 15 L-Maßstab

Parameter	Eigenschaft
Kulturmedium	CHOMACS CD + 8 mM L-Glutamin und 1 % HT
Rührer	100 – 200 rpm (pO ₂ -Regelung)
Rührwerk	Schrägblatt-Rührer nah unterhalb der Flüssigkeitsoberfläche Rushton Turbine oberhalb des Mediums zur Entfernung von Schaum
Temperatur	37 °C
pH-Wert	7,1

Parameter	Eigenschaft
pH-Regelung	Säure: CO ₂ (über Sparger) Base: 1 M Na ₂ CO ₃
Begasung	pO ₂ 40 % Luftsättigung; reine Sauerstoffbegasung nach Bedarf Kaskadenregler: Sauerstoff-Zugabe und Rührerdrehzahl
Überdruck	Kein Überdruck im Kopfraum
Animpfdichte	4 - 5 · 10 ⁵ Zellen · mL ⁻¹

8.2.2 Analytik der Zellkulturproben

8.2.2.1 Lagerstabilität der Zellkulturproben

Für die Bestimmung der Lagerstabilität von Zellkulturproben erfolgte eine Schüttelkolbenkultivierung von CHO-K1-HP-Zellen. Die Zellsuspension wurde aus drei verschiedenen Wachstumsphasen zu je 2 mL in Probenröhrchen überführt und im Kühlrack auf 4 °C heruntergekühlt. Anschließend erfolgte jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Entnahme und Analyse eines Röhrchens. Die Referenzmessung erfolgte direkt nach der Probenahme aus dem Schüttelkolben, die nächsten Analysen faden nach 30 Minuten, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 10 h, 23 h, 35 h, 48 h und 72 h statt.

Die Zellkonzentrationsmessung erfolgte in einer Zweifachbestimmung mit dem Cedex (siehe Kapitel 8.2.2.5), die Messung der Glukose-, Laktat-, Glutamin- und Glutamatkonzentrationen erfolgte in einer Dreifachbestimmung mit dem YSI 2700 (siehe Kapitel 8.2.2.4, der Analysator entspricht dem dort beschriebenen YSI 2950 allerdings ohne den Autosampler).

8.2.2.2 Manuelle Probenahme

Die manuelle Probenahme erfolgt am 2 Liter Reaktor über ein verbautes Steigrohr mit Luer-Lock-Septum mit integriertem Rückschlagventil (DASGIP Sampling Valve 78200077, DASGIP, Jülich). Bei jeder Probenahme werden zwei sterile Spritzen mit Luer-Lock-Anschluss verwendet. Zuerst wird die erste Spritze geöffnet und mit

70 % Isopropanol besprüht. Der Anschluss am Steigrohr wird ebenfalls mit Isopropanol besprüht. Anschließend wird die Spritze aufgesetzt und der erste Vorlauf entnommen. Danach erfolgt ein rascher Wechsel der Spritzen (ohne erneutes Einsprühen mit Isopropanol) und die Entnahme der eigentlichen Probe aus dem Reaktor.

Am 15 Liter Reaktor erfolgt die manuelle Probenahme über ein dampfsterilisierbares Probenahmeventil, welches direkt in einem Ingold-Port verbaut ist. Nach dem dieses für mindestens 15 Minuten mit Dampf sterilisiert wurde, muss es auf Raumtemperatur abkühlen. Die Probenahme erfolgt über langsames Öffnen des Ventils. Die ersten 15 mL werden verworfen, diese enthalten noch Reste des Kondensats von der Sterilisation. Die nächsten 15 mL werden aufgefangen und für die Analytik verwendet. Anschließend wird das Ventil wieder verschlossen und sterilisiert. Das Ventil ist steril und kann bis zur nächsten Probenahme abkühlen.

8.2.2.3 Vorbereitung der automatisch entnommenen Proben

Die automatisch entnommenen Proben im gekühlten Autosampler müssen vor der Analytik resuspendiert werden. Je nach Dauer der Lagerung ist ein Großteil der Zellen absedimentiert. Das Resuspendieren erfolgt gemeinsam mit dem Überführen der Probe in ein 15 mL-Probenröhrchen. Ungefähr 80 % des Überstandes wird in das Probenröhrchen dekantiert. Das Zellpellet wird mit dem verbliebende Medium durch auf- und abpipettieren mit einer 1 mL Eppendorf-Pipette vorsichtig gelöst. Die Suspension wird ebenfalls in das 15 mL-Probenröhrchen überführt. Anschließend wird die gesamte Zellsuspension erneut in das Autosampler-Probenröhrchen überführt, um verbliebende Reste und an der Wand anheftende Zellen zu lösen. Die gesamte Lösung wird wieder in das Probenröhrchen gegeben und kann anschließend der Zellzählung und nach zentrifugieren der Nährstoff- und Metabolitanalytik zugeführt werden.

8.2.2.4 Nährstoff- und Metabolitkonzentrationsmessungen

Die Quantifizierung der Glukose, des Laktats, des Glutamins und des Glutamats erfolgt mit dem Biochemischen Analysator YSI 2950 (KREIENBAUM Wissenschaftliche Meßsysteme e.K., Langenfeld, Deutschland). Dieses System verfügt über die Möglichkeit mehrere Proben gesammelt in einem Autosampler zu platzieren und

automatisiert vermessen zu lassen. Aufgrund der Tatsache das immer nur zwei Analyten-Paare detektiert werden können, werden die Proben für Glutamin und Glutamat gesammelt eingefroren und im Anschluss an die Kultivierung vermessen.

Das zugrunde liegende Messprinzip basiert auf der Oxidation des bei einer chemischen Reaktion freigesetzten Wasserstoffperoxids. Die chemische Reaktion an sich findet an einer analytischspezifischen Membran statt. [102, 103]

Da der theoretische Messfehler der Verdünnung den Messfehler des Gerätes übersteigt, werden Proben für die Glukose- und Laktatbestimmung unverdünnt vermessen. Aufgrund der maximalen Detektierbarkeit des Glutamins von 8 mM ($\sim 1,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) erfolgt bei diesem eine Verdünnung um den Faktor 2 bei allen Proben der ersten 48 Stunden. Um bei den Lagerexperimenten bei 4 °C (siehe Kapitel 5.2) möglichst nah an dem Messpunkt der Ein-Punkt-Kalibrierung zu liegen und dadurch die Messgenauigkeit zu verbessern, wurden diese Proben vor der Messung verdünnt.

Die automatische Kalibrierung des Systems findet alle fünf Proben statt. Jede Probe wird dreifach, jeweils mit einer neuen Kalibrierung, bestimmt.

8.2.2.5 Zellkonzentrationsmessungen

Der automatische Zellzähler verfügt über einen Autosampler indem die Proben aus den Kultivierungen sukzessive vermessen werden. Die Messung basiert auf Mikroskop-Aufnahmen von Zellen innerhalb einer Durchflusszelle. Für eine Unterscheidung der Zellen in viable und nekrotische Zellen erfolgt eine automatisierte Färbung der Suspension mit Trypanblau. Die aufgenommenen Bilder werden von der Steuerungssoftware ausgewertet und so die Zellzahl und deren Viabilität, neben anderen Parametern wie beispielsweise der durchschnittlichen Zellgröße, ausgegeben. [104]

Um möglichst statistisch abgesicherte Ergebnisse zu erzielen, erfolgt die Messung unter der Einstellung „*superior*“ wodurch 30 Bilder je Probe aufgenommen und ausgewertet werden. Zudem erfolgte bei den manuellen Proben eine Dreifach- und bei den automatisch entnommenen Proben eine Zweifachbestimmung. Sobald die Zellkonzentration $1\cdot 10^7 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$ erreicht, erfolgt eine manuelle Verdünnung mit 1x PBS.

8.2.2.6 2D-Fluoreszenz-Spektren

Die Aufnahme der 2DF-Spektren des BioView (DELTA Light & Optics, Hørsholm, Dänemark) erfolgt automatisch über die *ComBox*. Die Daten werden gemeinsam mit einer Probenidentifikationsnummer lokal in einer Datei gespeichert. Die Weiterverarbeitung der Spektren erfolgt mit der Software The Unscrambler® X 10.1 von CAMO Software AS (Oslo, Norwegen).

Die Aufnahme erfolgt mit einem *Gain* von 800. Für Messungen mit anderen Einstellungen kann eine nachträgliche *Gain*-Korrektur für die Normierung erfolgen. Zudem ist eine Medien-Korrektur möglich, bei der das Spektrum des Mediums von den Spektren während einer Kultivierung subtrahiert wird.

8.2.2.7 In situ Mikroskop Aufnahmen

Die Bildaufnahme des ISM erfolgt über die Software In situ control 3.2.0.3 welche um eine Möglichkeit der Netzwerksteuerung über das TCP/IP-Protokoll erweitert wurde. Dadurch können die Steuerung des ISM und die Bildaufnahme ebenfalls über die *ComBox* erfolgen.

Die Auswertung der Bilder erfolgt mit der Software Graphic Analyzer 1.1.0.0. Diese beinhaltet die Bilderkennungs-Algorithmen und gibt nach der Parametrisierung das Ergebnis in Objekte pro Bild aus.

8.2.3 3D-Druck Experimente

8.2.3.1 Modellierung und Druck-Technologie

Alle Modelle für den 3D-Druck wurden mit der CAD-Software Autodesk Inventor Professional 2014 (Autodesk, Inc., San Rafael, CA, USA) erstellt. Für die Konstruktion neuer Prototypen wurden zwei verschiedenen Technologien verwendet. FDM (FDM ist ein Handelsname von Stratasys, Inc.) und SLS.

Die FDM-Modelle wurden mit einem CubeX Trio (3D Systems, Rock Hill, SC, USA) erstellt. Mit diesem wurden die ersten physikalischen Modelle erstellt und optimiert. Aufgrund der nicht vorhandenen geeigneten Materialien für den Laborbedarf, wurde anschließend das finale Modell über das SLS-Verfahren gedruckt.

Der SLS-Druck erfolgte bei der Firma Blue Production (Paderborn, Deutschland). Dort wurde Polyamid als Material eingesetzt.

8.2.3.2 3D-Druck Rohmaterial und Herstellung der Extraktionsmedien

Die über SLS gedruckten Wellplatten und das unverarbeitete PA-Pulver wurden ebenfalls von Blue Production bezogen. Es kamen zwei verschiedenen PA-Varianten zum Einsatz – PA12 und PA12 mit einem unbekanntem UV-Stabilisator.

Für die Biokompatibilitätsexperimente erfolgte die Herstellung eines Extraktionsmediums entsprechend der ISO 10993-12:2012 (Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials) [30]. Hierfür wurde das Pulver im Autoklaven bei 121 °C, 2 bar für 30 Minuten sterilisiert.

Das jeweilige Nährmedium für jede Zelllinie wurde mit dem PA-Pulver gemischt ($0,2 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Diese Medien-Mixturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C für 72 Stunden bei 160 rpm geschüttelt. Um das Pulver anschließend zu entfernen, erfolgte eine Zentrifugation bei $3000 \times g$ für eine Stunde (Centrifuge 5702, Eppendorf AG, Hamburg). Die Überstände wurden mit einem $0,22 \mu\text{m}$ Filter Sterilfiltriert (Filtropur S, Sarstedt, Nuembrecht). Das erhaltene Extraktionsmedium wurde für die Kultivierungs-Experimente eingesetzt. Das Referenz-Medium wurde identisch behandelt.

8.2.3.3 3D-gedruckte Wellplatten

Für die direkten Kultivierungsexperimente, wurden ein exaktes Replica einer kommerziell erhältlichen 24-Wellplatte (Culture Plate Flat Bottom, Sarstedt, Newton, NC, USA) erstellt. Diese wurden mit dem SLS-Verfahren aus PA12- und PA12 UV-Material hergestellt. Die Wellplatte wurde für die Biokompatibilitätsexperimente mit adhärennten tierischen Zellen verwendet.

8.2.3.4 Kultivierung und Testung der adhärennten Zellen

Die Biokompatibilitätstests mit dem Rohmaterial erfolgte in Standard 24er-Wellplatten mit einer Fläche von $1,82 \text{ cm}^2$ und ungefähr 1 mL Arbeitsvolumen (Culture Plate Flat Bottom, Sarstedt, Newton, NC, USA). Zwei verschiedene adhärennte Zelllinien kamen zum Einsatz, zum einen humane Lungenepithelzellen A549

(DSMZ Nr.: ACC 107), zum anderen Mausfibroblasten NIH-3T3 (DSMZ Nr.: ACC 59). Beide wurden in DMEM (Sigma Aldrich, Str. Louis, MO, USA) mit 10 % FCS (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 1 % v/v Penicilin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) kultiviert. A549 und NIH-3T3 Zellen wurden mit einer Zelldichten von $1,5 \cdot 10^4$ Zellen \cdot cm⁻² bei einem Gesamtvolumen von 300 μ L ausgesät und bei 37 °C mit 5 % v/v CO₂ kultiviert.

Das Standard Kulturmedium wurde nach 24 Stunden entfernt und durch das jeweilige Extraktionsmedium ersetzt. Darin wurden die Zellen weitere 24 Stunden kultiviert.

Um die gedruckten Wellplatte direkt zu testen, wurden Zellen in den gedruckten Replicas für 48 Stunden kultiviert. Eine Kultivierung in einer Standard 24er-Wellplatte wurde parallel als Referenz genutzt.

Nach der Kultivierung wurde die Zellzahl bestimmt, der CellTiter-Blue® (CTB) Zellviabilitäts Assay und der CytoTox-ONE™ Membranintegritäts Assay (LDH) durchgeführt.

8.2.3.5 Kultivierung und Testung der Suspensionszellen

An Suspension adaptierte chinesische Hamsterovarien-Zellen CHO-K1-HP (AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) wurden in Schüttelkolben mit CHOMACS CD Medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und L-Glutamin (8 mM, Biochrom, Berlin) kultiviert.

Für die Rohmaterial Biokompatibilitätstests wurden die Zellen in Extraktionsmedium und unbehandeltem Medium als Referenz in 250 mL Schüttelkolben (Corning, Tewksbury, MA, USA) bei 37 °C, 5 % CO₂ v/v und 160 rpm für fünf Tage kultiviert. Die Innokulations-Zellkonzentration betrug $4,5 \cdot 10^5$ Zellen \cdot mL⁻¹.

8.2.3.6 CTB Zellviabilitäts-Assay

Um die Zellviabilität der A549 und NIH-3T3 Zellen zu bestimmen, erfolgte eine Messung mit dem CTB-Assay (Promega, Mannheim). Lebende Zellen sind dazu in der Lage Resazurin in Resorufin, welches Fluoresziert, umzuwandeln. Nekrotische Zellen sind dazu nicht in der Lage und erzeugen somit kein fluoreszierendes Produkt.

Nach der Kultivierung wurde der CTB-Assay entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt, inklusive Hintergrundmessungen und Kontrollgruppen. Zuerst wurde das Medium aus dem jeweiligen Well entfernt, 250 µL frischem Mediums samt 10 % v/v der CTB-Lösung hinzugefügt und dies für 2 Stunden inkubiert. Die entstehende Fluoreszenz wurde anschließend bei 544/590 nm mit einem Fluoreszenz-Wellplaterereader vermessen (Fluoroskan Acent, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

8.2.3.7 CytoTox-ONE™ homogener Membranintegritäts-Assay (LDH)

Der CytoTox-ONE™ Assay (Promega) wurde verwendet um die Membranintegrität der kultivierten Zellen zu messen. Durch den Verlust der Membranintegrität wird das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) in das umgebene Medium freigesetzt. Die Menge an freigesetztem LDH wird gemessen über die Umwandlung von zugegebenen Resazurin in Resorufin über dessen Fluoreszenz bei 544/590 nm. Die Menge an LDH ist proportional zu der Anzahl an nicht-viablen Zellen und kann somit für die Berechnung eines prozentualen zytotoxischen Effektes verwendet werden. Der Assay kann zudem in Kombination mit einer Lysis-Lösung eingesetzt werden, wodurch eine Auskunft über die Gesamtzellzahl resultiert. Der LDH-Assay wurde mit A549 und NIH-3T3 Zellen durchgeführt. Für die Bestimmung der nekrotischen Zellen werden 100 µL Medium von jedem Well entnommen und in eine neue 96er-Wellplatte überführt. Für die Messung der Gesamtzellkonzentration, erfolgt vor der Entnahme eine Zellyse. Beide Varianten des Protokolls, mit und ohne Lyse, wurden für die Experimente verwendet. Anschließend wurde der Assay entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

8.2.3.8 Zellzählung

Bei den adhärennten Zellen erfolgte eine Messung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer. Nach entfernen des Kulturmediums, wurden die Zellen von der Wellplatte mit 0,2 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung abgelöst (Inkubation für ungefähr 5 Minuten bei 37 °C, 5 % v/v CO₂). Die Zellsuspension wird anschließend 1:1 mit 0,2 % Trypanblau angefärbt.

Für die Suspensionszellen, CHO-K1-HP konnte die Zellproliferation und Viabilität mit dem automatischen Zellzähler Cedex (Roche Innovatis AG, Penzberg, Deutschland) vermessen werden (siehe Kapitel 8.2.2.5). Während der fünftägigen Kultivierung erfolgten täglich zwei Messungen.

8.3 Probenahme-Port 15 Liter Reaktor

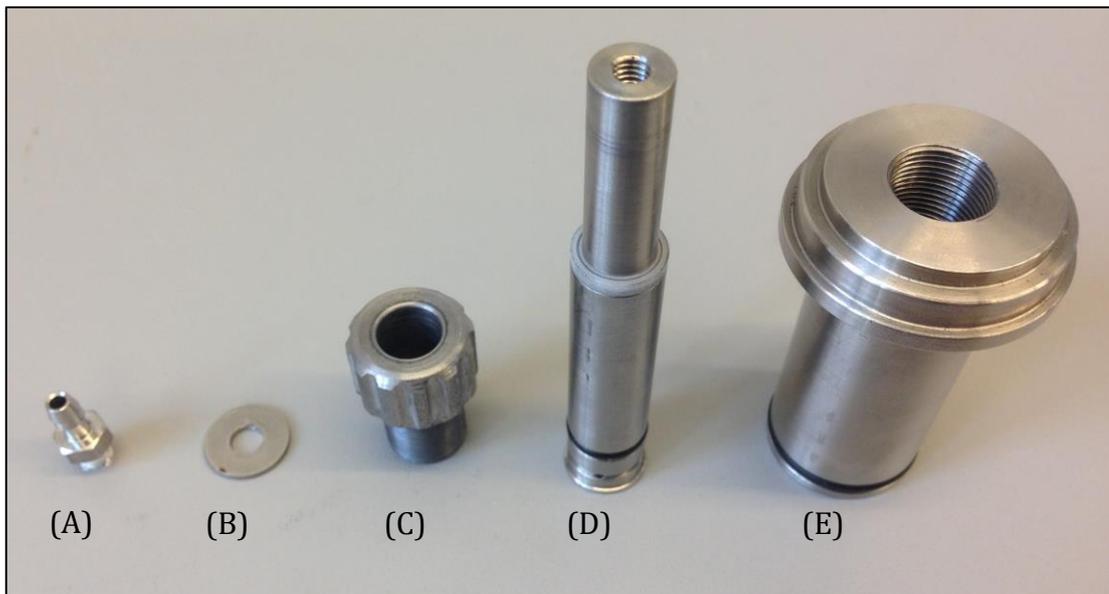
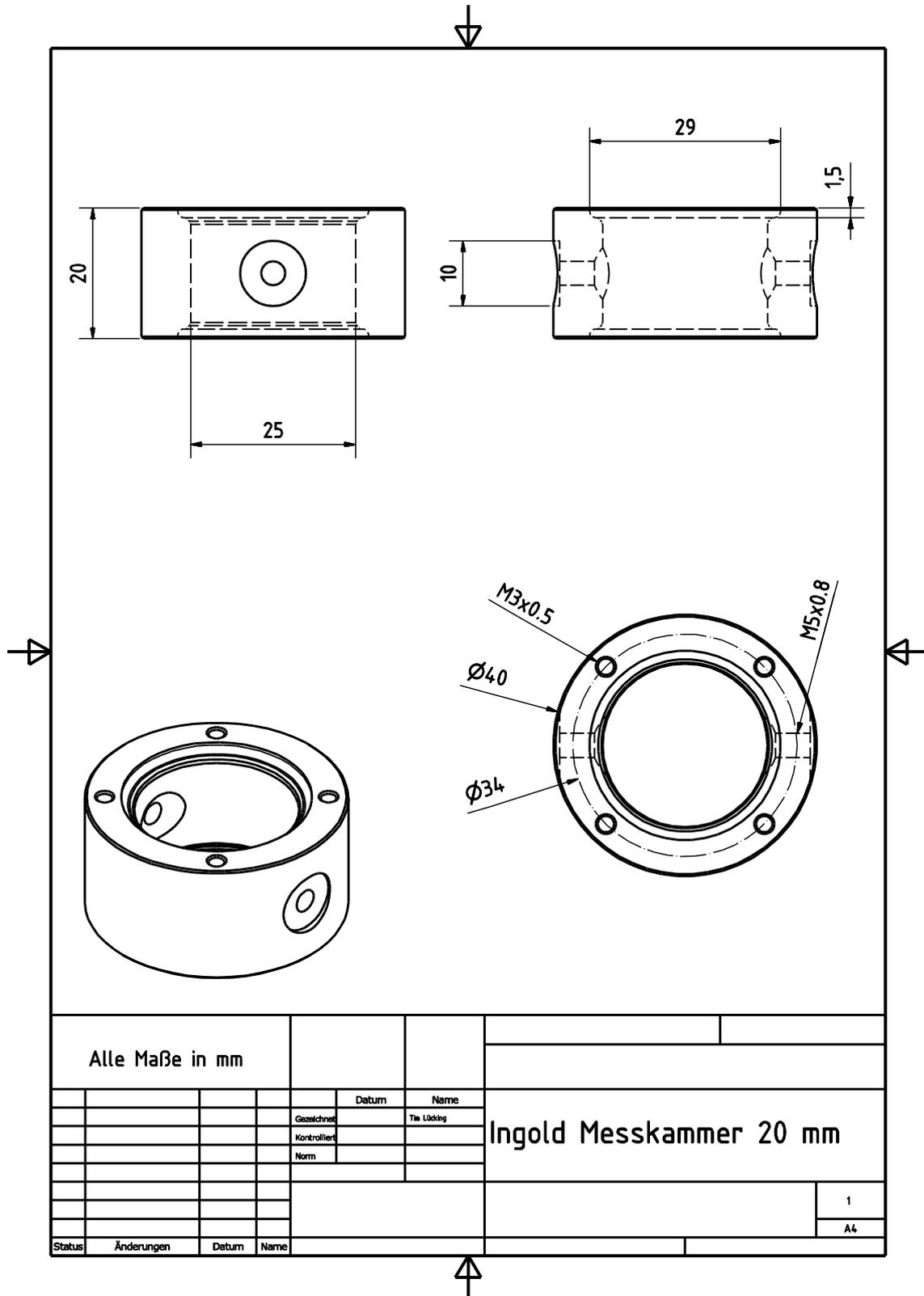
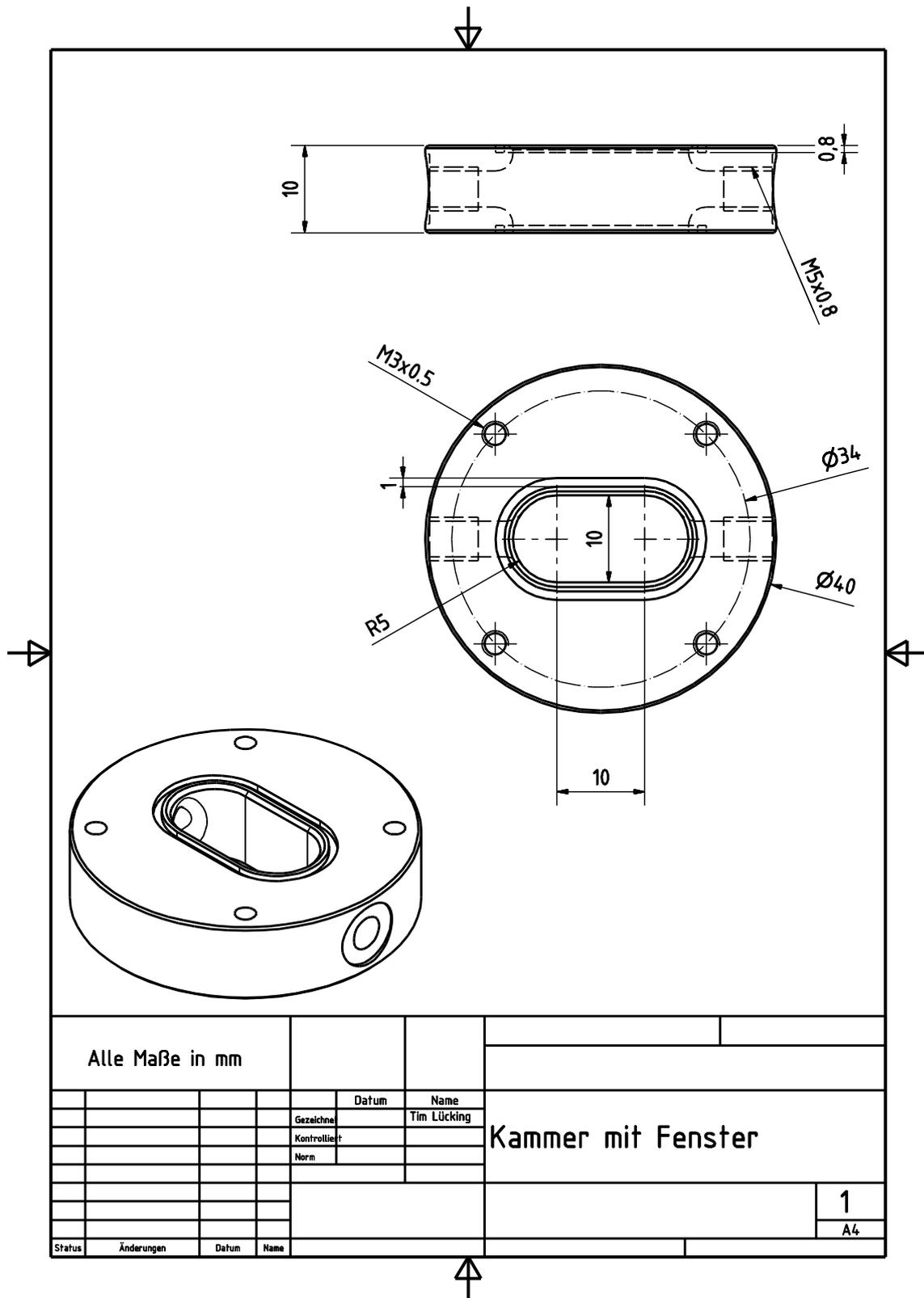
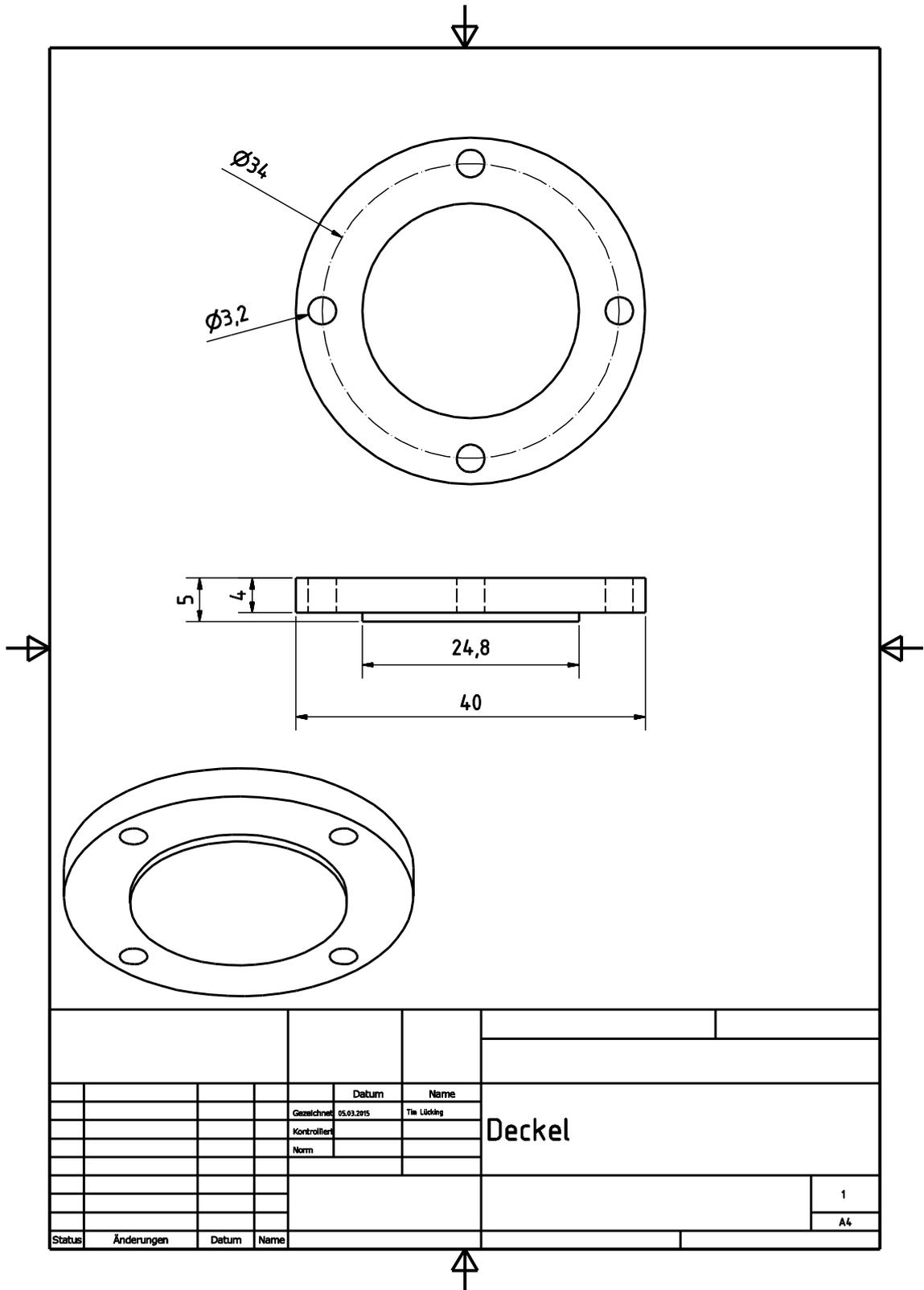


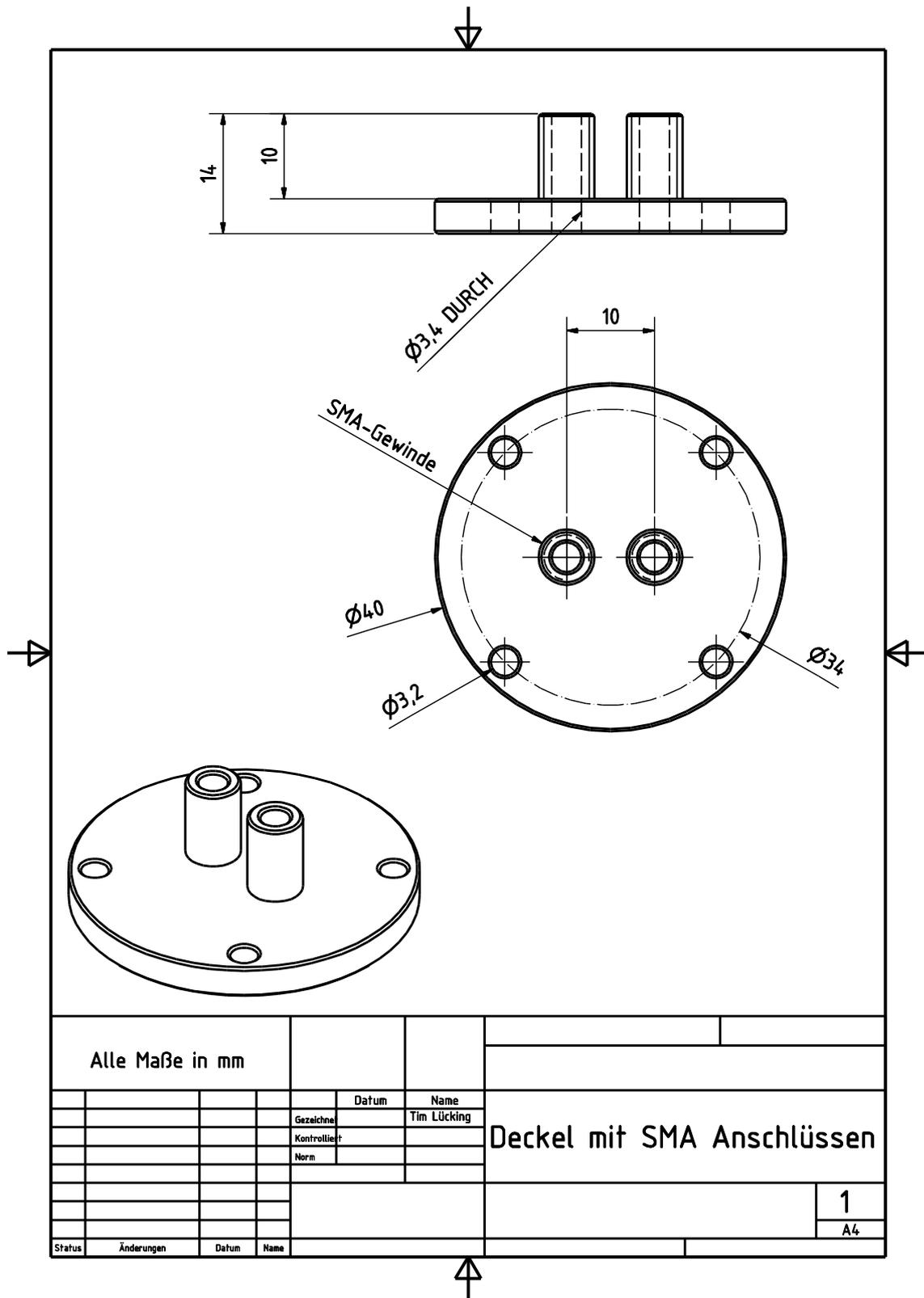
Abbildung 40: Einzelkomponenten des 25 mm Ingold Probenahme-Ventils. (B) Unterlegscheibe zur Verbindung von (C) Einstellschraube und (D) Innenrohr über (A) M4 Verschraubung mit Schlauchtülle. (E) Ingold Adapter mit Aufnahme für Innenrohr.

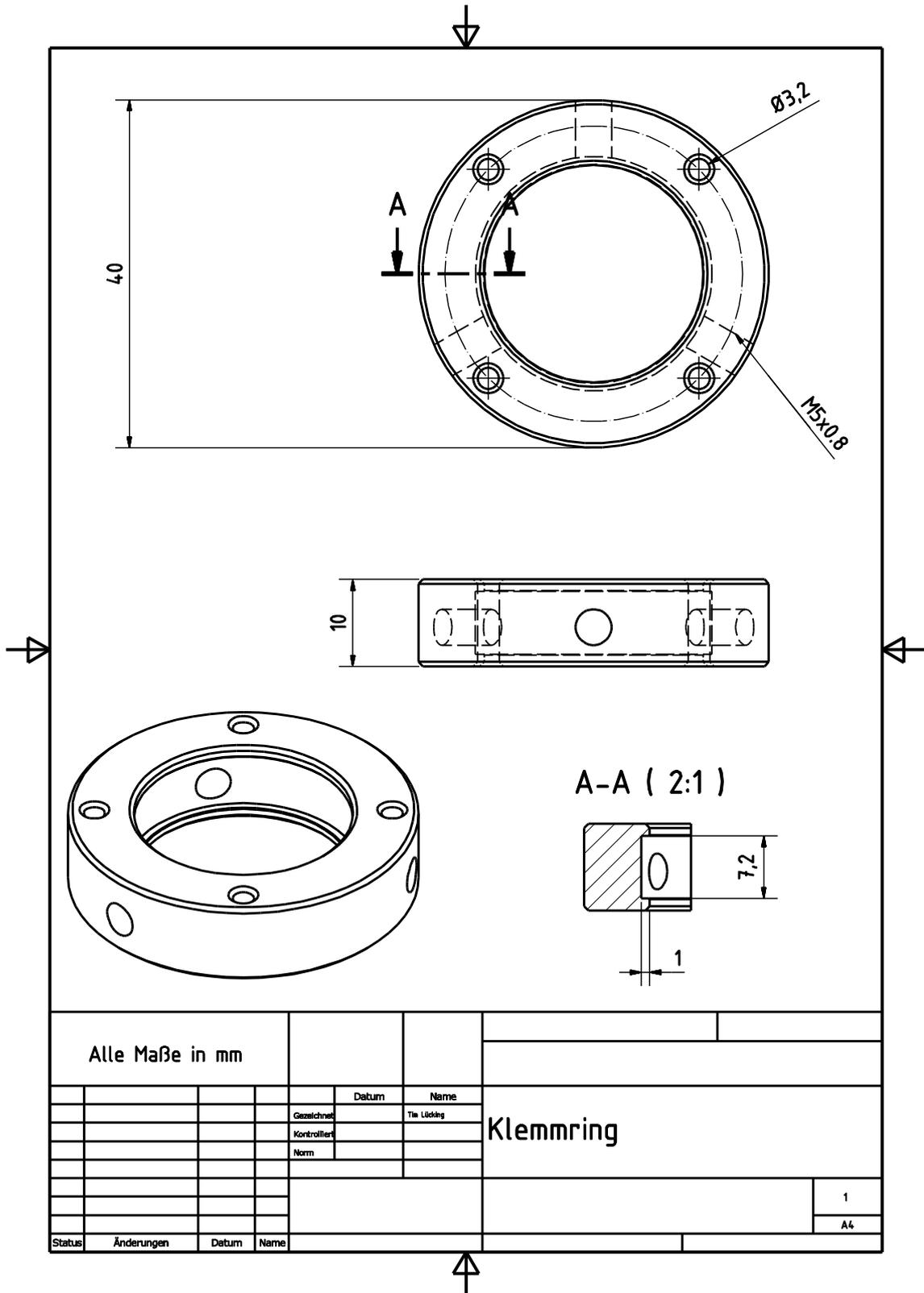
8.4 Technische Zeichnungen der Messkammer-Module











Alle Maße in mm

		Datum		Name	
		Gezeichnet		Titel Lüftung	
		Kontrolliert		Klemmring	
		Norm			
				1	
				A4	
Status	Änderungen	Datum	Name		

8.5 Ergänzende Graphen

8.5.1 Lebend- und Gesamtzellkonzentration der Lagerstabilität

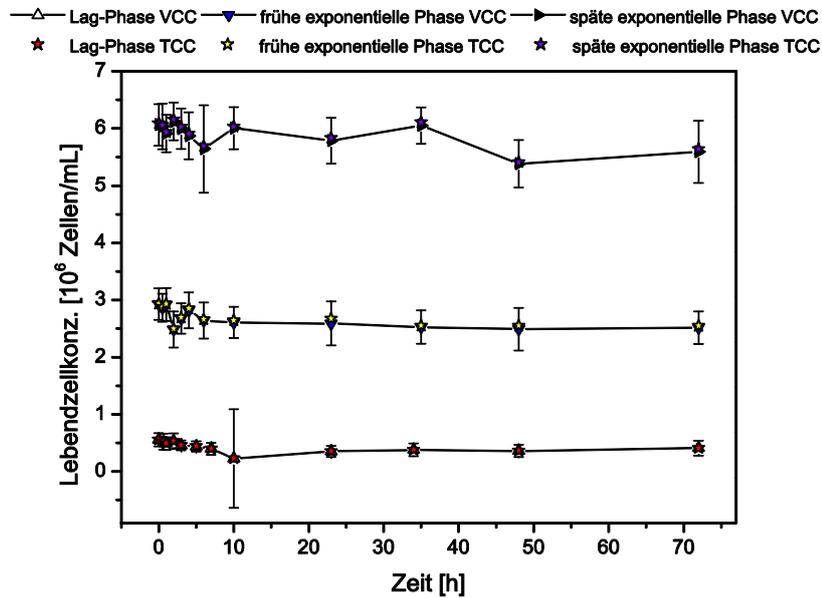


Abbildung 41: Lebend (VCC)- und Gesamtzellkonzentration (TCC) der Lagerstabilitäts-Experimente.

8.5.2 Korrektur der Zellkonzentration 2 Liter Reaktor

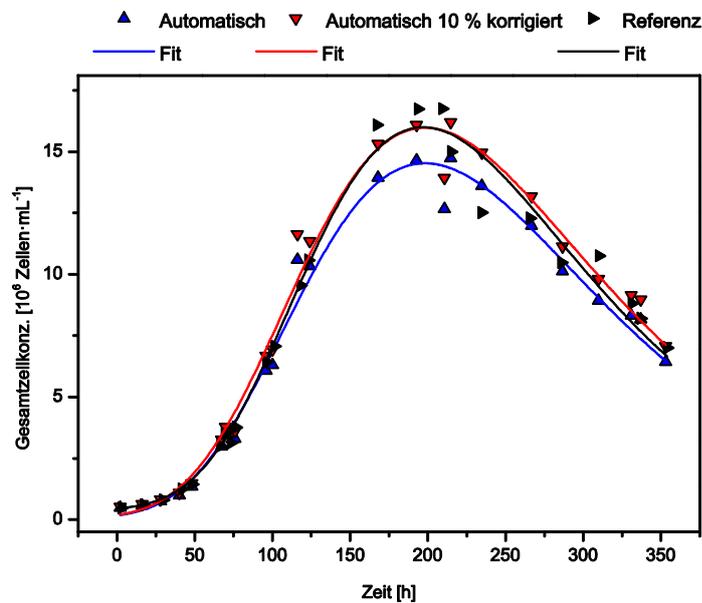


Abbildung 42: Korrektur der Zellkonzentration von automatisch bezogenen Proben im 2 Liter Reaktor. Ein Fitting der Messpunkte zeigt die gute Korrelation einer Erhöhung der Messwerte um 10 %.

Publikationen

Journal Publikationen:

Lücking T. H., Sambale F., Beutel S. & Scheper T. (2015). 3D-printed individual labware in biosciences by *Rapid Prototyping*: A proof of principle. *Engineering in Life Sciences*, 15(1), 51–56. doi:10.1002/elsc.201400093

Lücking T. H., Sambale F., Schnaars B., Bulnes-Abundis D., Beutel S. & Scheper T. (2015). 3D-printed individual labware in biosciences by *Rapid Prototyping*: *in vitro* biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Engineering in Life Sciences*, 15(1), 57–64. doi:10.1002/elsc.201400094

Lüder C., Lindner P., Bulnes-Abundis D., Lu S. M., Lücking T. H., Solle D. & Scheper T. (2014). In situ microscopy and MIR-spectroscopy as non-invasive optical sensors for cell cultivation process monitoring. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2(2), 157–166. doi:10.2217/PBP.14.13

Ude C., Hentrop T., Lindner P., Lücking T.H., Scheper T. & Beutel S. (2015). New Perspectives in Shake Flask Control using a 3D-printed Control Unit in Combination with an *online* Multisensory Platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Eingereicht im April 2015

Poster Präsentationen:

Lücking T.H., Solle D., Beutel S. und Scheper T.
„Neue apparative Konzepte in der Biotechnologie mit Hilfe des *Rapid Prototyping*“
DECHEMA Frühjahrstagung der Biotechnologen, 04. – 05.03.2013, Frankfurt am Main

Lücking T.H., Sandor M., Lüder C., Solle D., Beutel S. und Scheper T.
„At-, In- und *online*-Methoden zur Überwachung von Tierzellkultivierungen“
GVC/DECHEMA Vortrags- und Diskussionstagung – Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie,
06. – 08.05.2013, Bad Wildungen

Lücking T.H., Busse C., Beutel S. und Scheper T.
„3D-Druck-Verfahren für die Herstellung von porösen Festkörperimplantaten“
Im Rahmen der Feierlichkeiten zum Tag der Deutschen Einheit, 02. – 03.10.2014, Hannover

Lücking T.H., Busse C., Lüder C., Bulnes-Abundis D., Solle D. and Scheper T.
„A novel measuring chamber and automation platform for mammalian cell culture processes“
European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting, 31.05. – 03.06.2015, Barcelona, Spanien

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Thomas Scheper dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat an seinem Institut zu promovieren und für seine ausgezeichnete Betreuung während dieser Zeit. Außerdem möchte ich Ihn dafür danken, dass ich mich in meinen Arbeiten frei entfalten konnte und in einem interessanten Nebenprojekt mit dem 3D-Druck arbeiten durfte.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Dirk Lütkemeyer danke ich nicht nur für die Übernahme des weiteren Korreferats, sondern auch dafür mein Interesse an der Biotechnologie während des Bachelorstudiums geprägt zu haben. Mit seiner Beteiligung an meiner Doktorarbeit schließt sich der Kreis vom Beginn meines Studiums in Bielefeld bis zur Beendigung meiner Promotion in Hannover.

Herr PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Ich danke Dr. Dörte Solle für ihre großartige Betreuung und Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Danke auch für die vielen Anregungen und Diskussionen zu meiner Arbeit sowie die Einarbeitung in die Chemometrie.

Dr. Sascha Beutel danke ich ebenfalls für eine gute Zusammenarbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft zu allen Themen.

Für viel Hilfe und Unterstützung bei Fragen und Problemen aller Art möchte ich mich bei Martina Weiss, Martin Pähler, Dr. Ivo Havlik, Dr. Michael Dors, Cornelia Alic und Ulla Dreschel bedanken.

Thorsten Stempel und Friedbert Gellermann gebührt alle Ehre für die fleißige und großartige Arbeit an den schweren Maschinen. Ohne eure Unterstützung und unzähligen schnellen Hilfsaktionen hätte ich oft große Probleme bekommen.

Thorleif Hentrop danke ich für die tatenreiche Unterstützung mit der *ComBox* und der Hilfe bei allen Python-Problemen. Natürlich danke ich auch Andreas Kösterke für die Hilfe bei allen elektrischen Probleme – und vor allem der Rettung unserer Braueule!

Dr. Patrick Lindner und Christian Lüder danke ich für die tatenreiche Unterstützung rund um das Thema ISM und In situ control.

Auch möchte ich Frau Wagner-Scheper für die Schreibwerkstatt danken. Auch wenn mein Schreibstil noch immer nicht der Beste ist, so habe ich in Ihrem Kurs Ira kennenlernen dürfen.

Dem gesamten TCI, den alten und den neuen Generationen, danke ich für die familiäre und schöne Zeit am Institut. Ein solches Institut gibt es nicht oft und das machen vor allem die vielen Charaktere aus. Im speziellen möchte ich meinem Büro für die lustige Zeit und die lockere Atmosphäre danken. Es war eine schöne Zeit in Raum 163.

Ein riesiger Dank geht an das VE_Team und alle ehemaligen Braumeister. Drei Jahre und drei Pokale sprechen für sich! Ich wünsche euch auch weiterhin allzeit gut Sud!

Danke auch an Shaobin Lu, Christoph Busse, Christian Lüder, Dr. David Bulnes-Abundins, Daniel Marquard, Philipp Biechele und Marko Sandor die in den letzten Jahren mit an dem 15 Liter-Prozess gearbeitet haben. Außerdem danke ich Meike Flentje für die Unterstützung am Prozess und der Chemometrie im Rahmen ihrer Masterarbeit.

Ganz besonders möchte ich Christoph Busse danken. Uns verbinden eine lange Geschichte und eine ebenso lange Freundschaft. Ich bin froh, dass du auch den Weg nach Hannover gefunden hast!

Meine unendliche Dankbarkeit gebührt meinen Eltern. Ihr habt es mir erst ermöglicht mein Leben und meine Ausbildung so zu absolvieren wie ich es wollte. Eure bedingungslose Unterstützung war für mich die größte Motivation und ich hoffe ihr seid stolz auf mich!

Auch meinen Schwestern möchte ich für die Motivation, Unterstützung und Prägung in meinem Leben danken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Ira. Danke für deinen Rückhalt, deine Motivation und das du immer für mich da bist. Ich bin glücklich dich im TCI gefunden zu haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Tim Henrik Lücking
Geburtsdatum und -ort : 26.06.1986 in Lübbecke

Akademische und schulische Ausbildung

05.2012 - 04.2015 Promotion am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

10.2009 - 03.2012 Universität Bielefeld
Master-Studiengang „Molekulare Biotechnologie“
Abschluss: M.Sc. (Note 1,2)
Master-Arbeit: „Entwicklung einer optimierten Reinigungsprozedur für die automatisierte Analysenplattform BaychromAT®“

10.2006 - 09.2009 Fachhochschule Bielefeld
Bachelor-Studiengang „Apparative Biotechnologie“
Abschluss: B.Sc. (Note 1,3)
Bachelor-Arbeit: „Etablierung eines Verfahrens zur automatisierten Glukosequantifizierung auf Basis der sequenziellen Injektionsanalytik“

08.1996 - 06.2005 Gesamtschule Hüllhorst
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 2,1)