

# **Evaluierung der Mittel- und Nahinfrarotspektroskopie zur online Überwachung von CHO-Kultivierungen**

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

**Doktor der Naturwissenschaften**

(Dr. rer. nat.)

**genehmigte Dissertation**

von

Dipl.-Chem. Marko Sandor  
geboren am 18.11.1981 in Höxter

**2016**

**Referent**

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover

**Korreferent**

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann  
Fg. Prozessanalytik und Getreidewissenschaft  
Universität Hohenheim

**Tag der Promotion:**

10.10.2016

## Kurzfassung

Ein bedeutender Industriezweig der Biotechnologie beschäftigt sich mit der Herstellung biopharmazeutischer Wirkstoffe. Dazu zählen Impfstoffe und therapeutisch wirksame Proteine, die von Säugetierzellen produziert werden. Bei deren Kultivierung werden verschiedene Messverfahren eingesetzt, um den Bioprozess zu überwachen und zu regeln.

Klassische Messtechniken konzentrieren sich darauf chemische und physikalische Größen, die für die Zellkultur essentiell sind, zu regeln. Dazu zählen der pH-Wert, der gelöste Sauerstoffanteil im Medium oder die Temperatur. Andere kritische Variablen, wie die Konzentration von Glucose oder Lactat werden nur sporadisch bestimmt. Seit Beginn der PAT-Initiative (*engl. process analytical technology*) im Jahr 2004 durch die FDA werden biotechnologische Unternehmen ermutigt, einen Bioprozess genauer zu überwachen und zu verstehen. Eine nahezu lückenlose Überwachung kritischer Prozessvariablen ermöglicht es die Qualität des Produktes sicherzustellen und schneller auf abweichende Prozessverläufe zu reagieren.

Diese Arbeit behandelt die Evaluierung zwei verschiedener Infrarotspektroskopieverfahren zur Echtzeitüberwachung von Bioprocessen. Als Basis für die Evaluierung wurde eine reproduzierbare CHO-Kultivierung im 10-L-Maßstab inklusive Referenzanalytik etabliert. Für diese Arbeit werden die Daten aus insgesamt acht Kultivierungen verwendet. Mittels multivariater Analysen wurden Kalibrationsmodelle für fünf verschiedene Analyten sowie für drei Zellparameter erstellt. Eine Permutationsanalyse wurde entwickelt, um zu ermitteln welche Kultivierungen für die Kalibration und welche Kultivierung für die Validierung eingesetzt werden sollen.

Die Ergebnisse zeigen, dass mittels der Nahinfrarotspektroskopie nicht nur chemische Analyten, sondern auch die Zellvariablen vorhergesagt werden können. Eine direkte Bestimmung der Zellkonzentration ist durch die Mittelinfrarotspektroskopie nicht möglich. Die Vorhersagefehler der Analyten, insbesondere Glucose und Lactat, sind bei der Mittelinfrarotspektroskopie deutlich niedriger als bei der Nahinfrarotspektroskopie.

**Stichwörter:** Nahinfrarotspektroskopie, Mittelinfrarotspektroskopie, CHO-Zellen, Kultivierung, Permutationsanalyse, PAT, Chemometrie

## Abstract

The production of biologics is an important branch of the biotechnological industry. Biologics are therapeutically effective proteins or vaccines produced by mammalian cells. Different measuring methods are applied to monitor and control mammalian cell cultivations.

Typically, measuring methods focus on chemical and physical reactor parameters which are essential for controlling the cultivation such as the pH value, the partially dissolved oxygen concentration of the culture broth or the temperature. Other critical variables such as the glucose or lactate concentration are mostly monitored sporadically.

The PAT initiative was introduced in 2004 to encourage biopharmaceutical companies to monitor their production process more closely and by that learn more about the process itself. By monitoring critical process variables of a cultivation in real-time, it is possible to detect a deviation from the ideal process development and ensure a high-quality product.

The focus of this work is the evaluation of mid and near infrared spectroscopy, as a tool for real-time monitoring of bioprocesses. As a basis for the evaluation a highly reproducible CHO cell cultivation in a 10 L scale as well as the corresponding reference analysis were established. The data of eight cultivations are used in the presentation of this work. Calibration models were developed for five different analytes and three different cell parameters by using multivariate methods. In addition, a permutation analysis was developed to determine which cultivations should be used for the calibration model and which cultivation for the validation set. According to the results shown, it is possible to predict the concentration of analytes as well as the cell parameters by using near infrared spectroscopy. The prediction of cell concentration by near infrared spectroscopy is possible due to light scattering effects. Such a direct determination of cell parameters is not feasible by using mid infrared spectroscopy. But the prediction error of the chemical analytes, especially of glucose and lactate, is much lower when using mid infrared spectroscopy.

**Keywords:** near infrared spectroscopy, mid infrared spectroscopy, CHO cell cultivation, permutation analysis, PAT, chemometrics

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Zielsetzung.....	2
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>3</b>
2.1	IR-Spektroskopie – Grundlagen und Messprinzip .....	3
2.2	IR-Spektroskopie - Bioprozessanalytik.....	6
2.2.1	Process Analytical Technology – PAT .....	6
2.2.2	MIRS – Messprinzip am Bioprozess.....	7
2.2.3	NIRS – Messprinzip am Bioprozess.....	10
2.2.4	Zusammenfassung .....	12
2.3	Multivariate Analyse.....	12
2.3.1	Hauptkomponentenanalyse.....	13
2.3.2	Multivariate Regression – PLS .....	14
2.3.3	LOD und LOQ multivariater Messmethoden .....	15
2.3.4	Zusammenfassung .....	16
<b>3</b>	<b>IR-Messung am Bioreaktor</b> .....	<b>18</b>
3.1	IR-Messung am Bioreaktor.....	18
3.1.1	FT-MIR-Spektrometer .....	19
3.1.2	NIR-Spektrometer .....	21
3.1.3	Zusammenfassung .....	23
3.2	CHO-Kultivierung.....	23
3.2.1	Auswahl der Zelllinie .....	23
3.2.2	Kultivierungsstrategie für die Kalibration .....	24
<b>4</b>	<b>Vorversuche</b> .....	<b>26</b>
4.1	Einflüsse ausgewählter Reaktorparameter auf die IR-Messung .....	26

---

4.1.1	MIR-Auswertung .....	27
4.1.2	NIR-Auswertung.....	30
4.1.3	Zusammenfassung – äußere Einflüsse.....	32
4.2	LOD- und LOQ-Bestimmung der IRS für Glucose.....	33
4.2.1	Planung und Durchführung.....	33
4.2.2	Auswertung und Ergebnisse – LOD/LOQ .....	34
4.2.3	Zusammenfassung – LOD und LOQ.....	36
4.3	Kalibrationsmodelle aus synthetischen Standards.....	36
4.3.1	Entwicklung des Versuchsplanes.....	37
4.3.2	PBS-Standards – MIR-Auswertung.....	39
4.3.3	PBS-Standards – NIR-Auswertung .....	44
<b>5</b>	<b>CHO-Kultivierung und PLS-Vorhersage .....</b>	<b>48</b>
5.1	CHO-Kultivierung im Bioreaktor .....	48
5.1.1	Übersicht der Kultivierungen.....	49
5.1.2	Beispiel – batch Kultivierung.....	50
5.1.3	Beispiel – fed-batch Kultivierung.....	51
5.1.4	Übersicht aller Kultivierungen.....	51
5.1.5	Zusammenfassung – CHO-Kultivierung.....	54
5.2	Qualitative Untersuchung der IR-Spektren .....	54
5.2.1	PCA – MIR.....	54
5.2.2	PCA – NIR.....	56
5.2.3	Zusammenfassung der PCA-Auswertung .....	58
5.3	Permutationsanalyse.....	58
5.4	Kalibrationsmodelle und Vorhersagen – MIR.....	60
5.4.1	Übersicht .....	61
5.4.2	Glucose .....	62
5.4.3	Lactat.....	63
5.4.4	Glutamin .....	65
5.4.5	Gesamtzellkonzentration (GZK).....	66

---

5.4.6	Glutamat .....	67
5.4.7	Ammonium .....	68
5.4.8	Viabilität.....	70
5.4.9	Inline-Vorhersage – Glucose – Lactat.....	72
5.4.10	Zusammenfassung .....	72
5.5	Kalibrationsmodelle und Vorhersagen – NIR .....	73
5.5.1	Übersicht .....	73
5.5.2	GZK.....	74
5.5.3	Glucose .....	75
5.5.4	Lactat.....	77
5.5.5	Viabilität.....	79
5.5.6	Glutamin .....	80
5.5.7	Glutamat .....	82
5.5.8	Ammonium .....	83
5.5.9	Zusammenfassung .....	85
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Diskussion .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>90</b>
7.1	Theorie.....	90
7.1.1	Diodenarray und optisches Gitter .....	90
7.1.2	Mutarotation – Glucose.....	90
7.2	Ergebnisse – Vorversuche .....	92
7.2.1	LOD und LOQ für Glucose – 5 mm NIR.....	92
7.2.2	Reinstspektren .....	93
7.2.3	Versuchsplan – MIR - Reaktorparameter .....	94
7.2.4	Versuchsplan – NIR - Reaktorparameter .....	95
7.3	Ergebnisse - Hauptteil.....	96
7.3.1	Konzentrationsverläufe – Analyten und Zellgrößen .....	96
7.3.2	PCA – MIR.....	98
7.3.3	PCA – NIR.....	99
7.3.4	Permutationsanalyse .....	100

---

7.3.5	PLS-MIR.....	103
7.3.6	PLS-NIR.....	104
7.4	Methoden und Versuchsvorschriften.....	106
7.4.1	Bestimmung von LOD und LOQ – Glucose.....	106
7.4.2	Versuchsvorschrift – synthetische Standards.....	107
7.5	CHO-Kultivierung.....	108
7.5.1	Vorkultur.....	108
7.5.2	Reaktor Kultivierung.....	109
7.6	Referenzanalytik.....	110
7.6.1	Zellkonzentration und Viabilität.....	111
7.6.2	YSI – Glucose, Lactat, Glutamin, Glutamat.....	111
7.6.3	Ammonium.....	112
7.7	Multivariate Methoden.....	112
7.7.1	Fehlerberechnung - RMSE.....	112
7.7.2	Korrelationsanalysen.....	113
7.7.3	Vorverarbeitungsmethoden.....	113
7.8	Material und Geräte.....	115
7.8.1	Chemikalienliste.....	115
7.8.2	Geräte und Materialien.....	116
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>117</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Einteilung des elektromagnetischen Spektrums [2], [3], [61].	3
Abb. 2.2: Verlauf der potentiellen Energie $V(r)$ eines zweiatomigen Moleküls in Abhängigkeit vom Atomabstand $r$ für den harmonischen und anharmonischen Oszillator [4].	4
Abb. 2.3: Prinzip der Abgeschwächten Totalreflexion (ATR) an der Phasengrenze zwischen zwei Medien mit dem Brechungsindex $n_1$ und $n_2$ bei einem Einstrahlwinkel $\vartheta$ ; die effektive Eindringtiefe $d_p$ ist definiert als der Weg, bei dem die Energie auf $1/e$ abgesunken ist (nach [8], [13]).	7
Abb. 2.4: Spiegelsystem als Lichtleiter (bearbeitet) [16].	8
Abb. 2.5: ATR-Sonde mit einem IRE aus Diamant und 25 mm Adapter (links); ATR-Sonde mittels ca. 1 m AgX-Lichtwellenleiter am Bioreaktor angeschlossen (rechts).	9
Abb. 2.6: Drei verschiedene Messprinzipien der NIRS (nach [23]).	10
Abb. 2.7: NIR-Transmissionssonde mit verstellbarer Schichtdicke und LWL (A) [25]; NIR-Transflexionssonde mit Freistrahloptik ohne Lichtwellenleiter (B).	11
Abb. 3.1: Schematische Darstellung des MIR- und NIR-Spektrometers am BIOSTAT® Cplus; nicht dargestellt ist ein Probenahmeventil, welches sich auf gleicher Höhe der beiden Ingold®-Stützen befindet (nicht maßstabsgetreu).	18
Abb. 3.2: Beispiele für MIR Einkanalsspektren von Luft und Kulturmedium und dem daraus resultierenden AB-Spektrum.	20
Abb. 3.3: Verwendetes NIR-Spektrometer mit Freistrahloptik (A) und Großaufnahme der Sonde mit 5 mm Messspalt – Schichtdicke 10 mm (B).	21
Abb. 3.4: NIR-Spektrum von Wasser (AB-Spektrum) bei 5 und 1 mm Messspalt; beim NIR mit 5 mm Messspalt ist eine Sättigung ab $\lambda = 1.450 \text{ nm}$ zu beobachten.	22
Abb. 3.5: Anschluss beider IR-Spektrometer am BIOSTAT® Cplus über 25 mm Stützen.	23
Abb. 4.1: PCA Scores (DT1, $1.800\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$ ) der MIR-Spektren bei unterschiedlichen Reaktorparameter; farblich gruppiert nach der Temperatur.	27
Abb. 4.2: Mittelwerte der MIR Absorptionsspektren (DT1, $1.800 - 950 \text{ cm}^{-1}$ ) für jede Temperaturstufe; der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Absorptionsbande bei $1.635 \text{ cm}^{-1}$ und die Erhöhung der Absorptionsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur.	28
Abb. 4.3: PCA Scores (DT1, $1.800\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$ ) der MIR-Spektren bei konstanter Temperatur.	29
Abb. 4.4: Sämtliche NIR-Spektren ohne Datenvorverarbeitung (A) und SNV vorverarbeitet (B).	30
Abb. 4.5: PCA-Scores (SNV, $1050 - 1650 \text{ nm}$ ) aller NIR-Spektren, farblich gruppiert bezüglich der Temperatur; die Scores der bei maximaler Rührerdrehzahl und Begasungsrate aufgenommene Spektren sind eingekreist.	31
Abb. 4.6: PCA-Scores (SNV, $1050 - 1650 \text{ nm}$ ) der NIR-Spektren bei konstanter Temperatur ( $37 \text{ °C}$ ); Scores bei einer Kombination aus hoher Begasungsrate und Rührerdrehzahl sind eingekreist.	32
Abb. 4.7: Glucose-PLS-Scores für MIR.	35
Abb. 4.8: Glucose-PLS-Scores für das 1 mm NIR.	36
Abb. 4.9: PCA-Scores über sämtliche PBS-Standards (A) und ohne PBS-24 (B); Vorverarbeitung DT1 für den Wellenzahlbereich zwischen $1200 - 950 \text{ cm}^{-1}$ .	39
Abb. 4.10: Glucose – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.-Koeff, Loadings und dem Reinspektrum von Glucose (B).	41
Abb. 4.11: Lactat – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.-Koeff. und Lactat-Referenzspektrum (B).	42

<i>Abb. 4.12: Vergleich zwischen Reg.-Koeff. von Glutamin und den Spektren von Glutamin und Glutamat (A); Vergleich zwischen Reg.-Koeff von Glutamat und den Spektren von Glutamat und Glutamin (B).</i>	42
<i>Abb. 4.13: Ammonium – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.-Koeff. und Ammonium-Referenzspektrum (B).</i>	43
<i>Abb. 4.14: PCA-Scores aller NIR-Spektren ohne (A) und mit SNV (B).</i>	44
<i>Abb. 4.15: Ammonium – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.Koeff und Ammonium-Referenzspektrum (B).</i>	45
<i>Abb. 4.16: Vorhersage aus der Kreuzvalidierung aufgetragen gegen die Referenz für die Temperatur (A), Rührerdrehzahl (B) und Begasung (C); beschriebene Varianzen der Spektren und der Begasung in Abhängigkeit von den eingesetzten PLS-Faktoren (D).</i>	46
<i>Abb. 5.1: Konzentrationsverläufe der Analyten für K02 (links); Zellwachstum und Viabilität für K02 (rechts).</i>	50
<i>Abb. 5.2: Kultivierung inkl. Glucose-Zufütterung; Konzentrationsverläufe der Analyten für K06 (links); Zellwachstum und Viabilität für K06 (rechts).</i>	51
<i>Abb. 5.3: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Glucose für alle Kultivierungen.</i>	52
<i>Abb. 5.4: Übersicht des Zuwachses der LZK für alle Kultivierungen.</i>	53
<i>Abb. 5.5: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Ammonium für alle Kultivierungen.</i>	53
<i>Abb. 5.6: MIR-Spektren (KDV) für K02 und K10</i>	55
<i>Abb. 5.7: MIR-PCA-Scores der Spektren der Kultivierungen K02 bis K10 (DT2, 1200 - 950 cm<sup>-1</sup>).</i>	55
<i>Abb. 5.8: NIR-Spektren von K02 ohne Datenvorverarbeitung; Wasserabsorptionsbanden bei 1.175 sowie 1.450 nm.</i>	56
<i>Abb. 5.9: NIR-PCA-Scores der Spektren der Kultivierungen K02 bis K10; markiert sind spektrale Ausreißer.</i>	57
<i>Abb. 5.10: NIR-PCA-Scores der Spektren der Kultivierungen K02 bis K10 ohne spektrale Ausreißer.</i>	58
<i>Abb. 5.11: Median des RMSEP in Abhängigkeit von der Anzahl der Kultivierungen im MIR Kalibrationsmodell sowie von der Anzahl der PLS-Faktoren für Glucose.</i>	59
<i>Abb. 5.12: Mittels Permutationsanalyse berechneter minimaler RMSEP für Glucose in Abhängigkeit von der Anzahl an Kultivierungen im MIR-Kalibrationsmodell sowie PLS-Faktoren.</i>	60
<i>Abb. 5.13: Glucose-Auswertung mit TC42-Medium als Hintergrundspektrum und DT2 als Datenvorverarbeitung: Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K07 (D).</i>	62
<i>Abb. 5.14: Lactat – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K02 (D).</i>	64
<i>Abb. 5.15: Glutamin - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D).</i>	65
<i>Abb. 5.16: GZK - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D).</i>	67
<i>Abb. 5.17: Glutamat - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D).</i>	68
<i>Abb. 5.18: Ammonium – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K09 (D).</i>	69
<i>Abb. 5.19: Viabilität - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K07 (D).</i>	71
<i>Abb. 5.20: Glucose und Lactat – Inline Vorhersage gegen Referenz aufgetragen für K10.</i>	72
<i>Abb. 5.21: GZK – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K04 (D).</i>	75

Abb. 5.22: Glucose – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K02 (D). _____	76
Abb. 5.23: Lactat – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K06 (D). _____	78
Abb. 5.24: Viabilität – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung mit Ausreißer bei K07 (C); Vorhersage gegen Referenz für K04 (D). _____	79
Abb. 5.25: Glutamin - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K06 (D). _____	81
Abb. 5.26: Glutamat - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K04 (D). _____	82
Abb. 5.27: Ammonium – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D). _____	84
Abb. 7.1: Schema des pn-Übergangs eines Halbleiters [29] _____	90
Abb. 7.2: Mutarotation der D-Glucose und der damit verbundenen Gleichgewichtsreaktion zwischen $\alpha$ - und $\beta$ -D-Glucose [48], [56]. _____	91
Abb. 7.3: MIR-Spektrum Glucose direkt nach Lösungsvorgang und nach Erreichen des Gleichgewichtes (links); zeitliche Änderung der Konzentration einer frisch angesetzten Glucose-Lösung (rechts) _____	91
Abb. 7.4: PLS-Scores des Kalibrationsmodells von Glucose für das 5 mm NIR (SNV). _____	92
Abb. 7.5: MIR-Reinstspektren der Analyten Glucose, Lactat, Ammonium, Glutamat und Glutamin. _____	93
Abb. 7.6: NIR-Reinstspektren der Analyten Glucose, Lactat, Ammonium, Glutamat und Glutamin. _____	94
Abb. 7.7: PLS-Vorhersagen gegen die Referenzwerte aufgetragen für die Temperatur (A), Rührerdrehzahl (B) und Begasung (C); RMSEC und RMSECV des Kalibrationsmodells der Rührerdrehzahl aufgetragen gegen die Anzahl der PLS-Faktoren (D). _____	95
Abb. 7.8: Abbildung 7.A: Glucose – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Verlauf der RMSEs in Abhängigkeit von der verwendeten Zahl an PLS-Faktoren (B). _____	96
Abb. 7.9: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Lactat. _____	96
Abb. 7.10: Übersicht der Verläufe der GZK. _____	97
Abb. 7.11: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Glutamat _____	97
Abb. 7.12: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Glutamin _____	98
Abb. 7.13: Entwicklung der Zellviabilität während der einzelnen Kultivierungen. _____	98
Abb. 7.14: Vergleich – MIR-PCA-Loadings mit Referenzspektren von Glucose und Lactat _____	99
Abb. 7.15: NIR-Loadings der 1. und 2. PC der PCA-Auswertung – KDV (A); PCA-Loadings der SNV vorverarbeiteten Spektren – 3. PC (B). _____	99
Abb. 7.16: NIR-Spektren von K02 – SNV vorverarbeitet (A); 1. PC gegen 3. PC der SNV vorverarbeiteten PCA-Scores aufgetragen (B). _____	100
Abb. 7.17: MIR-PLS-Loadings des 2. und 5. Faktors des Ammonium-Kalibrationsmodells zusammen aufgetragen mit den MIR-Referenzspektren von Glucose und Lactat. _____	103
Abb. 7.18: MIR-PLS-Loadings des 3., 4. und 5. Faktors des Kalibrationsmodells für die Viabilität ist gemeinsam aufgetragen mit dem MIR-Referenzspektrum von Lactat. _____	104
Abb. 7.19: Loadings des 3., 4. und 5. Faktors des NIR-Kalibrationsmodells von Glucose aufgetragen gegen ein Referenzspektrum von Glucose. _____	104
Abb. 7.20: 1. und 2. Faktor der PLS-Scores des Kalibrationsmodells für die Viabilität. K09 zeigt einen potentiellen Ausreißer. Die Scores sind entlang des 2. Faktors hinsichtlich des Zeitpunktes der Inokulation angeordnet (K02, K05, K06, K09 und K10). _____	105

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 3.1: Übersicht der einzelnen Komponenten und Eigenschaften beider Spektrometer</i>	19
<i>Tabelle 4.1: Untersuchte Parameter, die einen Einfluss auf die IR-Spektren haben und deren Bereiche sowie Anzahl von Stufen.</i>	26
<i>Tabelle 4.2: Übersicht der einzelnen Konzentrationsstufen von Glucose.</i>	34
<i>Tabelle 4.3: Übersicht der Glucose PLS-Modelle; RMSEC = root mean square error of calibration; SG1-2-3 = Savitzky-Golay, 1. Ableitung, Glättung mit Polynom 2. Ordnung und Fensterbreite = 3; F = Anzahl Faktoren</i>	34
<i>Tabelle 4.4: LOD und LOQ der beiden IR-Methoden für Glucose.</i>	35
<i>Tabelle 4.5: Übersicht der relevanten Analyten und deren Konzentrationsbereich.</i>	37
<i>Tabelle 4.6: Versuchsplan – DoE; grau hinterlegt sind die Standards bei 18 % und 75 % der Maximalkonzentration.</i>	38
<i>Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem DoE-Plan – MIR.</i>	40
<i>Tabelle 4.8: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem DoE-Plan – NIR.</i>	45
<i>Tabelle 5.1: Übersicht zu den einzelnen Kultivierungen, der maximalen Gesamtzellkonzentration (GZK), Kultivierungsdauer und Bemerkungen.</i>	49
<i>Tabelle 5.2: Ausreißer nach NIR-PCA.</i>	57
<i>Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Kalibration und Validierung der MIR-Daten</i>	61
<i>Tabelle 5.4: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Kalibration und Validierung der NIR-Daten</i>	74
<i>Tabelle 7.1: NIR-Versuchsplan zur Bestimmung des LOD und LOQ für Glucose; Vorgabe und tatsächlich eingewogene Menge angegeben.</i>	106
<i>Tabelle 7.2: MIR-Versuchsplan zur Bestimmung des LOD und LOQ für Glucose; Vorgabe und tatsächlich eingewogene Menge angegeben.</i>	107
<i>Tabelle 7.3: Reaktorkultivierung - Parameter</i>	110
<i>Tabelle 7.4: Übersicht der prozentualen mittleren Standardabweichungen über alle Kultivierungen für jeden Analyten</i>	110
<i>Tabelle 7.5: Liste der bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.</i>	115
<i>Tabelle 7.6: Liste der bei dieser Arbeit verwendeten Geräte.</i>	116

## Symbolverzeichnis

$\rho$	Korrelationskoeffizient
$E$	Energie elektromagnetischer Strahlung [J]
$d$	Schichtdicke einer Messzelle [cm]
$d_p$	effektive Eindringtiefe elektromagnetischer Strahlung [ $\mu\text{m}$ ]
$h$	Planck'sches Wirkungsquantum [J · s]
$c_L$	Lichtgeschwindigkeit [m · s]
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]
$V_{iv}$	Energie des i-ten Schwingungszustands bei der Frequenz $\nu$
$\nu$	Frequenz [ $\text{s}^{-1}$ ]
$\nu_i$	Frequenz der Grundschiwingung [ $\text{s}^{-1}$ ]
$\nu_i$	Quantenzahl der Schwingung des i-ten Schwingungszustandes
$x_i$	anharmonische Konstante der i-ten Schwingung
$I$	Intensität transmittierter Strahlung
$I_0$	Intensität einfallender Strahlung
$c_K$	Konzentration [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ]
$A$	Absorption [rel. AU]
<b>rel. AU</b>	engl. – <i>relative absorption units</i>
$\epsilon$	Absorptionskoeffizient [ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
$d$	Schichtdicke einer Probe [variabel]
$\theta$	Einstrahlwinkel [°]
$n_i$	Brechungsindex des Mediums i
$R^2$	Lineares Bestimmtheitsmaß
$\mu_d$	Dipolmoment [ $\text{A} \cdot \text{s} \cdot \text{m}$ ]
$E$	Energie [J]
<b>N/mL</b>	Zellzahl pro Milliliter

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AG</b>	Aktiengesellschaft
<b>aq.</b>	lat. <i>aqua</i> – in wässriger Lösung
<b>ATR</b>	engl. <i>attenuated total reflection</i> – abgeschwächte Totalreflexion
<b>BR</b>	Begasungsrate
<b>ca.</b>	circa
<b>CHO</b>	engl. <i>Chinese hamster ovary</i>
<b>CIP</b>	engl. <i>cleaning in place</i>
<b>DoE</b>	engl. <i>Design of Experiments</i>
<b>DTi</b>	engl. <i>detrending</i> mit Polynom i-ter Ordnung
<b>engl.</b>	englisch
<b>et al.</b>	lat. <i>et alii</i>
<b>F</b>	Faktoren
<b>FDA</b>	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
<b>ff.</b>	folgende
<b>FIR</b>	Ferninfrarotspektroskopie
<b>FT</b>	Fourier-Transformation
<b>Gl.</b>	Gleichung
<b>GmbH</b>	Gewerbe mit begrenzter Haftung
<b>GZK</b>	Gesamtzellkonzentration
<b>ID</b>	engl. <i>identification number</i>
<b>inkl.</b>	inklusive
<b>IR</b>	Infrarot
<b>IRE</b>	Internes Reflektionselement (engl. – <i>internal reflection element</i> )
<b>IRS</b>	Infrarotspektroskopie
<b>Kal.</b>	Kalibrierung
<b>Kult.</b>	Kultivierung
<b>lat.</b>	lateinisch
<b>LED</b>	engl. <i>light-emitting diode</i>
<b>LOD</b>	engl. <i>limit of detection</i>
<b>LOQ</b>	engl. <i>limit of quantitation</i>
<b>LWL</b>	Lichtwellenleiter
<b>LZK</b>	Lebendzellkonzentration
<b>MCT</b>	engl. <i>mercury cadmium telluride</i>
<b>MIR</b>	Mittelinfrarot oder Abkürzung für Mittelinfrarotspektrometer
<b>MIRS</b>	Mittelinfrarotspektroskopie
<b>MVA</b>	multivariate Analyse

---

<b>NIR</b>	Nahinfrarot oder Abkürzung für Nahinfrarotspektrometer
<b>NIRS</b>	Nahinfrarotspektroskopie
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>PAT</b>	engl. <i>process analytical technology</i>
<b>PBS</b>	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
<b>PC</b>	engl. <i>principal component</i>
<b>PCA</b>	engl. <i>principal component analysis</i>
<b>PLS</b>	engl. <i>partial least squares</i>
<b>pO<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>Reg.-Koeff.</b>	Regressionskoeffizient
<b>RG</b>	Rührergeschwindigkeit
<b>RMSE</b>	engl. <i>root mean square error</i>
<b>RMSEC</b>	engl. <i>root mean square error of calibration</i>
<b>RMSECV</b>	engl. <i>root mean square error of cross validation</i>
<b>RMSEP</b>	engl. <i>root mean square error of prediction</i>
<b>rpm</b>	engl. <i>rounds per minute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.</b>	siehe
<b>s. u.</b>	siehe unten
<b>SG</b>	Savitzky-Golay
<b>SIP</b>	engl. <i>sterilizing in place</i>
<b>SNV</b>	engl. <i>standard normal variate</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Val.</b>	Validierung
<b>VE</b>	voll entsalzt
<b>VK</b>	Vorkultur
<b>z. B.</b>	zum Beispiel

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einleitung

Die Entdeckung des infraroten Lichtes geht auf das Jahr 1800 zurück. Der Astronom Sir Wilhelm Herschel untersuchte in einem Experiment das Sonnenlicht. In dem Experiment wurde das Sonnenlicht mit Hilfe eines Prismas aufgespalten und die Erwärmung eines Thermometers in Abhängigkeit von der Farbe des Lichtes untersucht. Dabei entdeckte Sir Herschel, dass die Erwärmung neben dem roten Licht, durch eine für das menschliche Auge unsichtbare Strahlung, am höchsten war. Die von Sir Herschel entdeckte infrarote (lat. *infra* = darunter, unterhalb) Strahlung wird umgangssprachlich als Wärmestrahlung bezeichnet, die uns im Alltag in vielen Bereichen begegnet. Eine haushaltsübliche Anwendung sind Bewegungsmelder für Außenbeleuchtungen oder Alarmanlagen. Allein die Wärmestrahlung eines Menschen reicht aus, um einen Bewegungsmelder auszulösen.

Trifft Infrarotstrahlung auf Materie wird diese teilweise absorbiert (lat. *absorbere* = verschlucken). Abhängig von der Zusammensetzung der Materie, deren Atome und Moleküle, werden nur bestimmte Anteile des infraroten Lichtes absorbiert. In der chemischen Analytik wird dieses Prinzip genutzt, um ein Spektrum aufzuzeichnen. Ein Spektrum ist eine Zusammensetzung aus den Absorptionen dieser verschiedenen Anteile, die als Wellenlängen bezeichnet werden. Anhand eines Spektrums können chemische Verbindungen identifiziert werden und über die Intensität der Absorption können die Konzentrationen einzelner Stoffe bestimmt werden.

Seit einigen Jahren wird die Infrarotspektroskopie vermehrt in der Biotechnologie zur Prozessanalytik eingesetzt. Die Biotechnologie befasst sich mit der Herstellung von Arzneistoffen aus gentechnisch veränderten Organismen. Dazu zählen spezielle Eiweiße, sogenannte rekombinante Proteine, die beispielsweise in der Krebstherapie eingesetzt werden.

Die Infrarotspektroskopie wird eingesetzt um Herstellungsprozess in der chemischen oder pharmazeutischen Industrie zu überwachen. Gegenüber klassischen chemischen Analysemethoden bietet die moderne Infrarotspektroskopie im Bereich der Prozessanalytik eine Reihe von Vorteilen. Mittels einer Sonde können mehrere Analyten sowie Zellparameter kontinuierlich im Prozess kontakt- und zerstörungsfrei bestimmt werden. Es muss keine Probe entnommen werden, wodurch die Gefahr einer Kontamination verringert wird. Durch die kontinuierliche Echtzeit-Überwachung der wichtigsten Analyten einer Kultivierung können



Abweichungen vom Idealverhalten sofort identifiziert und nach Möglichkeit gegengesteuert werden. Die dabei gewonnenen Messdaten helfen zudem die Prozesse besser zu verstehen und auf unvorhergesehene Geschehnisse schneller reagieren zu können.

So werden eventuelle Totzeiten minimiert und damit wird die Wirtschaftlichkeit des Prozesses wird gesteigert. Neben den ökonomischen Vorteilen bietet eine kontinuierliche Prozessüberwachung gleichzeitig eine verbesserte Qualitätskontrolle und Produktsicherheit, da nicht nur ausschließlich das Produkt, sondern weitere wichtige Analyten überwacht werden können.

## **1.2 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, zwei verschiedene Infrarotspektrometer als Methode zur inline Prozessüberwachung von CHO-Kultivierungen (engl. *chinese hamster ovary*) zu evaluieren. Es wurden fünf für CHO-Kultivierungen signifikante Analyten (Glucose, Glutamin, Lactat, Glutamat, Ammonium) selektiert. Ergänzt werden die fünf Analyten durch die beiden Zellparameter Zellzahl und Viabilität.

Die Infrarotspektrometer liefern multivariate Messdaten, die mit Hilfe von multivariaten Analyseverfahren ausgewertet werden. Im Fokus der Evaluierung steht die Erstellung und Validierung von multivariaten Kalibrationsmodellen. Ein typisches Problem bei Bioprozessen ist der hohe Korrelationsgrad zwischen einzelnen Analyten im Verlauf einer Kultivierung. Dies erschwert die spezifische Vorhersage eines bestimmten Analyten. Es wird untersucht ob mit Hilfe sogenannter Spiking-Experimente diese Korrelationen durchbrochen werden können, um somit robuste Kalibrationsmodelle erstellen zu können.

Um die Aussagefähigkeit eines Kalibrationsmodells auf unbekannte Kultivierungen zu untersuchen, wurden für die Kalibrierung und Validierung separate Kultivierungen verwendet. Anhand der Ergebnisse werden die Möglichkeiten und Grenzen der beiden unterschiedlichen Infrarottechnologien für die Prozessüberwachung untersucht. Gleichzeitig soll die Frage geklärt werden, wie viele Kultivierungen notwendig sind, um ein robustes Kalibrationsmodell für einen komplexen Bioprozess erstellen zu können.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 IR-Spektroskopie – Grundlagen und Messprinzip

In dieser Arbeit wurden die Mittel- und Nahinfrarotspektroskopie (MIRS und NIRS) als Methode zur online Überwachung von CHO-Kultivierungen (*chinese hamster ovary*) evaluiert. In diesem Kapitel werden die theoretischen Grundlagen der Infrarotspektroskopie (IRS) näher erläutert.

Die Entdeckung des infraroten (IR) Lichtes geht auf Sir William Herschel im Jahre 1800 zurück [1], [61]. Sir Herschel hatte mit Hilfe eines Glasprismas und schwarz gefärbten Quecksilberthermometern das Sonnenlicht untersucht. Dabei beobachtete Sir Herschel jenseits des roten sichtbaren Lichtes ein Temperaturmaximum.

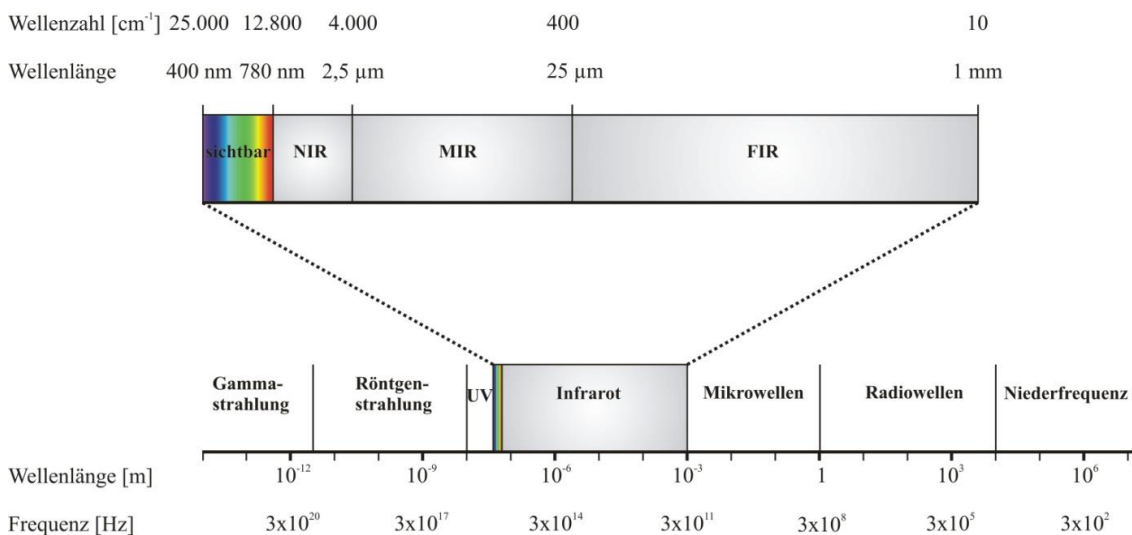


Abb. 2.1: Einteilung des elektromagnetischen Spektrums [2], [3], [61].

Der Wellenlängenbereich des IR Lichtes liegt zwischen 780 nm und 1 mm und grenzt direkt an den für uns Menschen sichtbaren Teil des elektromagnetischen Spektrums (s. Abb. 2.1) [3], [2]. In der IRS wird oft anstelle der Wellenlänge  $\lambda$  oft die Wellenzahl  $\tilde{\nu}$  als Reziprok der Wellenlänge verwendet ( $12.800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ , s. Abb. 2.1). Der IR-Bereich wird in nahes, mittleres und fernes Infrarot (NIR, MIR und FIR) unterteilt.

Das Messprinzip der Infrarotspektroskopie (IRS) beruht auf der Absorption elektromagnetischer Strahlung durch Moleküle, genauer der Molekülbindung [4]. Durch die Absorption von IR-Strahlung werden Moleküle entlang der Molekülbindung in Schwingung versetzt, weswegen die IRS auch als Schwingungsspektroskopie bezeichnet wird. Eine Voraussetzung für die Absorption von IR-

Strahlung ist, dass sich während der Schwingung das Dipolmoment  $\mu_d$  eines Moleküls ändert. Die Energie  $E$  elektromagnetischer Strahlung lässt sich in Abhängigkeit der Frequenz  $\nu$  oder der Wellenlänge  $\lambda$  ( $h$  = Plank'sches Wirkungsquantum,  $c_L$  = Lichtgeschwindigkeit) nach Gl. 2.1 berechnen.

$$E = h\nu = h \cdot \frac{c_L}{\lambda} \quad \text{Gl. 2.1}$$

In einer vereinfachten Annahme lässt sich eine Molekülschwingung anhand eines harmonischen Oszillators beschreiben. Dabei ist die rücktreibende Kraft proportional zu der Auslenkung. Unter dieser Voraussetzung lässt sich der energetische Schwingungszustand  $V_{iv}$  nach Gl. 2.2 beschreiben:

$$V_{iv} = h\nu_i \left( \nu_i + \frac{1}{2} \right) \quad \text{Gl. 2.2}$$

Dabei entspricht  $\nu_i$  der Frequenz der Schwingung beim Zustand  $i$  und  $\nu_i$  der Schwingungsquantenzahl der  $i$ -ten Schwingung. Unter diesen Bedingungen sind nur Übergänge von  $\Delta\nu \pm 1$  erlaubt. Die Differenz der potentiellen Energie zwischen dem Grundzustand ( $\nu_i = 0$ ) und dem ersten angeregten Zustand ( $\nu_i = 1$ ) liegt bei den meisten Verbindungen im MIR Bereich ( $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) [4]. Die Besetzung der einzelnen Energieniveaus ist durch die Boltzmann-Verteilung gegeben. Bei Raumtemperatur ist vorwiegend der Grundzustand ( $\nu_i = 0$ ) besetzt [3].

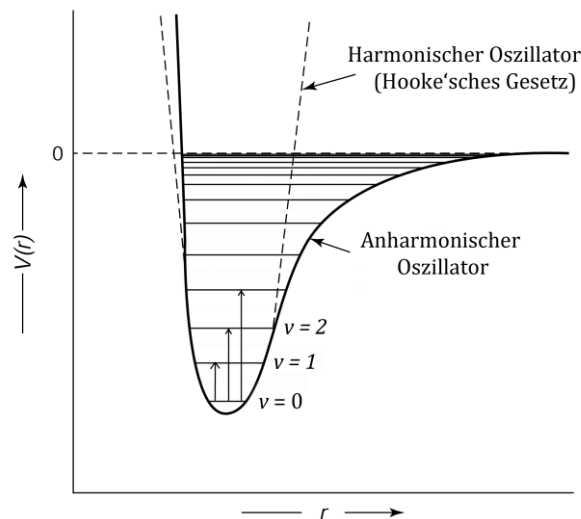


Abb. 2.2: Verlauf der potentiellen Energie  $V(r)$  eines zweiatomigen Moleküls in Abhängigkeit vom Atomabstand  $r$  für den harmonischen und anharmonischen Oszillator [4].

Der Übergang  $\nu = 0 \rightarrow \nu = 1$  wird als Grundschiwingung bezeichnet. Mit Hilfe des harmonischen Oszillators lassen sich nur Übergänge bei kleinen Schwingungsquantenzahlen beschreiben (gestrichelte Linie in Abb. 2.2). Diese vereinfachte Annahme berücksichtigt nicht die zunehmende Abstoßung der Atome bei

Annäherung sowie die Dissoziation bei großer Auslenkung. Diese Einflüsse auf die Schwingung werden durch den anharmonischen Oszillator beachtet (s. Abb. 2.2). Dabei wird die Formel aus Gleichung 2.2 um einen Term erweitert:

$$V_{iv} = h\nu_i \left( \nu_i + \frac{1}{2} \right) + h\nu_i x_i \left( \nu_i + \frac{1}{2} \right)^2 \quad \text{Gl. 2.3}$$

Im zweiten Term ist  $x_i$  die anharmonische Konstante. Bei der Annahme des anharmonischen Oszillators sind Übergänge  $|\Delta\nu| > 1$  sowie Kombinationen unterschiedlicher Schwingungen erlaubt. Diese werden als Ober- und Kombinationschwingungen bezeichnet [4]. Beide Schwingungsarten werden vorwiegend durch die energiereichere NIR-Strahlung verursacht. Die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs  $|\Delta\nu| > 1$  ist deutlich geringer, als die Wahrscheinlichkeit einer Grundschiwingung. Deswegen sind die Absorptionsbanden im NIR-Bereich deutlich schwächer als im MIR-Bereich. Bei welchem  $\lambda$  oder  $\tilde{\nu}$  eine Absorption beobachtet wird, hängt von der Masse der beteiligten Atome und der Stärke der Bindung ab. Daher haben funktionelle Gruppen charakteristische Absorptionsbanden im IR-Spektrum. Von besonderem Interesse ist der sogenannte *fingerprint*-Bereich (1.500 – 500  $\text{cm}^{-1}$  [3], [5]; 1.800 – 800  $\text{cm}^{-1}$  [6]). In diesem Bereich treten die meisten Grundschiwingungen der funktionellen Gruppen auf, die zur Identifikation einzelner Verbindungen genutzt werden können [3], [5]. Neben der Identifikation funktioneller Gruppen und Molekülen ist eine quantitative Messung gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz möglich:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c_K \cdot d \quad \text{Gl. 2.4}$$

$$A = \lg \frac{I_0}{I} \quad \text{Gl. 2.5}$$

Einfallende Strahlung mit der Intensität  $I_0$  passiert eine Probe der Schichtdicke  $d$ , der Konzentration  $c_K$  und dem molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon$ . Danach wird die transmittierte Intensität  $I$  gemessen. Das logarithmische Verhältnis aus  $I_0/I$  ist die Absorption oder Absorbanz einer Probe (s. Gl. 2.5) [3, 4]. Die gemessene Absorption ist somit proportional zur Konzentration. Das Lambert-Beer'sche Gesetz setzt voraus, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Absorption und der Konzentration vorliegt. Luftblasen und andere apparative Einflüsse können die Linearität stören [7].

## 2.2 IR-Spektroskopie - Bioprozessanalytik

Die Bioprozessanalytik dient der Prozess- und Qualitätskontrolle. Im Rahmen der Prozessanalytik bietet die IRS gegenüber den klassischen Analyseverfahren eine Reihe von Vorteilen. Als nicht invasive, kontinuierliche Messmethode kann die IRS inline zur Bioprozessüberwachung eingesetzt werden [5]. Mit Hilfe der multivariaten Datenauswertung können einzelne Komponenten im Spektrum identifiziert und quantifiziert werden. Zusätzlich bietet die IRS die Möglichkeit, anhand von Streulichtmessungen auch Zellparameter zu erfassen.

In der Fachliteratur wird der Begriff online oft als Synonym für inline gebraucht [8]. Beide Begriffe beschreiben eine kontinuierliche Messmethode. Laut Definition beziehen sich die Begriffe online und inline auf die Nähe des Analysators zum Prozess [8]. Inline bedeutet, dass direkt im Reaktor, somit unter Prozessbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Begasungsrate, Rührerdrehzahl), gemessen wird. Eine online Messung findet nicht direkt im Reaktor statt, sondern es wird eine Probe entnommen und außerhalb des Reaktors analysiert.

Sowohl inline als online Analysen können zur Prozesskontrolle und Prozesssteuerung eingesetzt werden. Als Kriterium gilt, dass sich während der Mess- und Analysedauer die Prozesseigenschaften nicht signifikant ändern dürfen [8].

### 2.2.1 *Process Analytical Technology – PAT*

Die PAT-Initiative wurde 2004 durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) ins Leben gerufen. Als Richtlinie soll die PAT-Initiative pharmazeutische Unternehmen ermutigen, Herstellungsprozesse mit den neuesten wissenschaftlichen Methoden zu untersuchen und zu verstehen. Dies beinhaltet die Identifizierung sogenannter kritischer Prozessvariablen, welche die Produktqualität beeinflussen, sowie die kontinuierliche Analyse dieser Größen [9], [8].

Die klassische Vorgehensweise sieht vor, dass ein medizinischer Wirkstoff nach dem Herstellungsprozess untersucht und vom Qualitätsmanagement freigegeben wird. Der Vorteil von PAT und der damit verbundenen wissenschaftlich basierten Vorgehensweise besteht darin, dass ein Prozess kontinuierlich analysiert wird und damit ein detaillierteres Wissen über den Prozessverlauf vorliegt. Abweichungen vom idealen Prozessverlauf können mit Hilfe von PAT sofort erkannt werden und es kann eventuell gegensteuert werden [9], [8]. Es muss nicht mehr zwingend auf eine Endkontrolle gewartet werden, wodurch eine Echtzeitfreigabe möglich wird.

Damit eine Analysetechnik im Sinne von PAT eingesetzt werden kann, müssen verschiedene Anforderungen erfüllt werden. Das Messsystem muss robust und zuverlässig sein, mehrere Variablen gleichzeitig erfassen können, inline oder online in den Prozess eingebunden sein und Messdaten in nahezu Echtzeit liefern. In modernen IR-Spektrometern finden zwei grundlegende Techniken Anwendung.

Die, auf der Fourier-Transformation (FT) basierenden, FT-IR-Spektrometer werden sowohl im MIR- und NIR-Bereich eingesetzt. Eine andere Messtechnik beruht auf der Verwendung eines optischen Gitters und eines Diodenarray-Detektors.

Die Auswertung der komplexen Spektren erfolgt mittels multivariater Methoden, auf die in Kapitel 2.3 (S. 12) näher eingegangen wird. Die Anbindung der MIRS und NIRS an einen Bioprozess unterscheidet sich deutlich voneinander. In den beiden nachfolgenden Kapiteln werden beide Methoden und deren Verwendung in der Biotechnologie vorgestellt.

### 2.2.2 MIRS – Messprinzip am Bioprozess

Die inline Analyse am Bioprozess umfasst die Messung von wässrigen Medien, in denen mikrobielle oder tierische Organismen kultiviert werden. Wird die MIRS zum Messen wässriger Lösungen eingesetzt, muss die hohe Absorption durch Wasser beachtet werden. Transmissionsmessungen wässriger Proben sind durch die starke Absorption der O–H-Schwingung auf Schichtdicken unter 0,1 mm begrenzt [10], [11].

Eine Möglichkeit besteht in dem Einsatz von Durchflusszellen, durch die im Bypass das Kulturmedium gepumpt wird. Ein solches Verfahren wurde 1997 durch Fayolle *et al.* bei der Kultivierung von *Lactobacillus Bulgaricus* beschrieben [12]. In diesem Fall wurde eine temperierte Durchflusszelle mit einer Schichtdicke von 38  $\mu\text{m}$ , durch die das Kulturmedium gepumpt wurde, verwendet. Zur Überwachung industrieller Prozesse ist dieser Messaufbau ungeeignet. Es bestehen die Risiken einer Verstopfung der Durchflusszelle, Ansammlung von Gasblasen in der Messzone oder die Anlagerung biologischen Materials auf dem optischen Fenster, dem sogenannten Fouling, der Durchflusszelle.

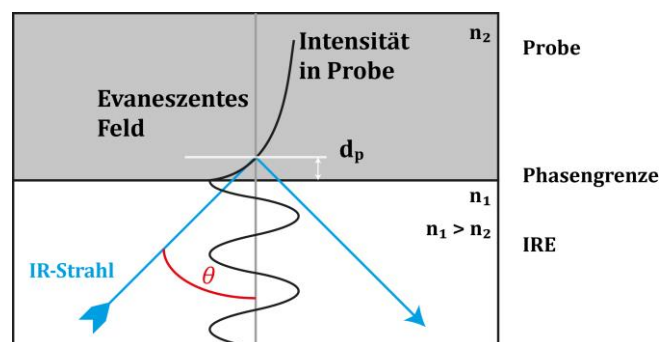


Abb. 2.3: Prinzip der Abgeschwächten Totalreflexion (ATR) an der Phasengrenze zwischen zwei Medien mit dem Brechungsindex  $n_1$  und  $n_2$  bei einem Einstrahlwinkel  $\theta$ ; die effektive Eindringtiefe  $d_p$  ist definiert als der Weg, bei dem die Energie auf  $1/e$  abgesunken ist (nach [8], [13]).

Eine Alternative dazu bietet die von Harrick und Fahrenfort zwischen den Jahren 1960 und 1961 entwickelte Messtechnik, die auf dem Prinzip der abgeschwächten

Totalreflexion (*attenuated total reflection* – ATR) basiert. Das Messprinzip beruht auf der Reflexion von Licht an der Phasengrenze zweier unterschiedlich stark brechender Medien (s. Abb. 2.3). Auf der ATR-Methode beruhen die MIR-Messungen in dieser Arbeit. Dabei hat das interne Reflektionselement (IRE) direkten Kontakt zu dem anderen Medium (Probe). Als IRE werden Materialien mit hohen Brechungsindizes, wie z. B. Zinkselenid oder Diamant, verwendet. Diamant zählt zwar zu den teuersten Werkstoffen, ist dafür aber chemisch und mechanisch sehr beständig sowie ungiftig.

Die Weglänge des MIR-Lichtes durch die Probe wird bei der ATR-Methode durch verschiedene Faktoren bestimmt. Die effektive Eindringtiefe  $d_p$  in die Probe hängt von den Brechungsindizes  $n_1$  und  $n_2$ , dem Einstrahlwinkel  $\theta$  und der Wellenlänge  $\lambda$  ab (s. Gl. 2.6). Wird als IRE Diamant ( $n_1 = 2,39$ ;  $\theta = 45^\circ$ ) verwendet und eine wässrige Probe ( $n_2 = 1,3$ ) vermessen, beträgt  $d_p$  bei  $\tilde{\nu} = 1.000 \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda = 10 \text{ }\mu\text{m}$ ) etwa  $1,5 \text{ }\mu\text{m}$  [14], [11]. Dadurch können auch stark absorbierende wässrige Proben ohne Präparationsaufwand vermessen werden.

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \left[ \sin^2 \theta - \left( \frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{1/2}} \quad \text{Gl. 2.6}$$

Eine der ersten Evaluierungen der ATR Technologie zur Prozesskontrolle gehen auf Alberti *et al.* zurück. [15]. Es wurden Proben einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* offline und ex-situ mittels einer ATR-Durchflusszelle analysiert. Zu dieser Zeit waren noch keine Lichtleiter für den MIR-Bereich verfügbar, weshalb eine ATR-Durchflusszelle direkt im Strahlengang des Spektrometers platziert wurde. Eine ATR-Durchflusszelle kann größer dimensioniert werden, da die Weglänge des IR-Lichtes durch die Probe von der ATR-Technik vorgegeben wird. Dadurch wird das Risiko einer Verstopfung der Durchflusszelle reduziert, die anderen Nachteile der Durchflusszelle bleiben bestehen.

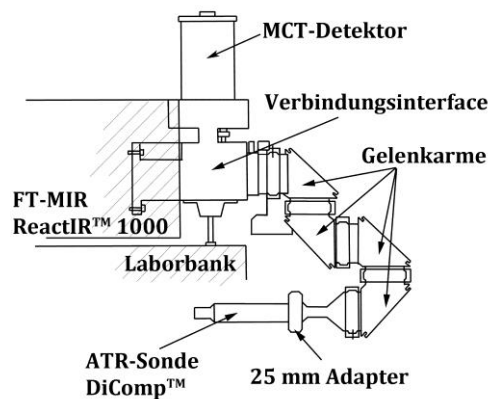


Abb. 2.4: Spiegelsystem als Lichtleiter (bearbeitet) [16].

Die ersten Anwendungsbeispiele von inline Sonden im Bioprozess wurden von Doak *et al.* Anfang der 1990er Jahre beschrieben. Das Spektrometer (ReactIR™ 1000, Mettler Toledo, Schweiz) verfügt über einen Spiegelgelenkarm, der als Lichtleiter dient (s. Abb. 2.4) [16]. Dieser Aufbau hat grundlegende Nachteile. Minimale Änderungen einer der Spiegel können zu Intensitätsänderungen des Signals führen. Auch ein Umbau von einer Messstelle zu einer anderen ist nur unter großem Aufwand möglich, da der Strahlengang neu justiert werden muss.

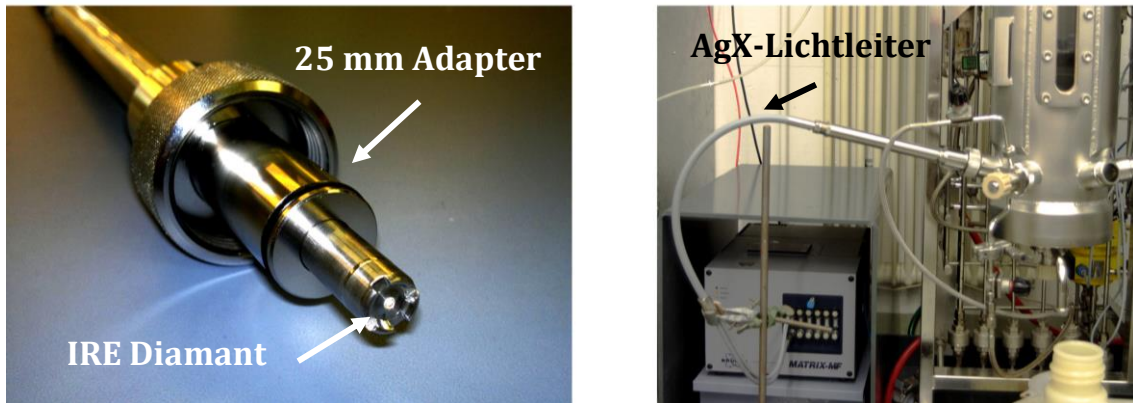


Abb. 2.5: ATR-Sonde mit einem IRE aus Diamant und 25 mm Adapter (links); ATR-Sonde mittels ca. 1 m AgX-Lichtwellenleiter am Bioreaktor angeschlossen (rechts).

Eine alternative dazu bieten faseroptische Lichtwellenleiter (LWL), die aus polykristallinem Silberhalogenid (AgX) bestehen. LWL aus AgX sind seit Ende der 1990er Jahre kommerziell verfügbar und bieten eine vergleichsweise gute Lichtdurchlässigkeit (0,2 – 0,5 dB/m [17], [18]) im MIR-Bereich. Die LWL sind biegsam, ohne dass sich dabei die Signalintensität ändert [18]. Die Länge der AgX-Fasern ist jedoch, aufgrund der Eigenabsorption des Materials, auf wenige Meter begrenzt [18]. Wegen der hohen Flexibilität und der guten Transmissions-eigenschaften im MIR-Bereich, werden heute fast ausschließlich AgX-LWL verwendet. In Abb. 2.5 ist eine ATR-Sonde mit einem 25 mm Adapter für die Bioprozessüberwachung abgebildet. Ein solches System wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Prozessüberwachung eingesetzt und evaluiert.

In den Übersichtsartikeln von Kondepati *et al.* sowie Landgrebe *et al.* wurden eine Vielzahl von Beispielen aufgeführt, bei denen die MIRS in Kombination mit einer ATR-Sonde und LWL zur Prozessüberwachung eingesetzt wurde [5], [19]. Die untersuchten Bioprozesse umfassen Kultivierungen von Mikroorganismen sowie von tierischen oder menschlichen Zellen. Die für die Bioprozesse kritischen Analyten wurden quantitativ mittels der MIRS bestimmt. Dazu gehören die primäre Kohlenstoffquelle (i. d. R. Glucose) sowie die wichtigsten Stoffwechselnebenprodukte. Die Zellparameter zählen nach PAT ebenfalls zu den kritischen Prozessvariablen. Typische optische Messverfahren zur Zellzahlbestimmung basieren auf der Messung von Streulicht. Aufgrund der geringen Eindringtiefe der



MIR-Strahlung in das Medium werden keine Streueffekte, durch die eine direkte Messung der Zellzahl möglich wäre, beobachtet. Deshalb ist die MIRS auf die Messung von chemischen Analyten begrenzt.

### 2.2.3 NIRS – Messprinzip am Bioprozess

Im Unterschied zur MIRS werden in der NIRS Ober- und Kombinationsschwingungen angeregt, deren Absorptionsbanden um den Faktor 10 – 100 schwächer sind als die dazugehörigen Grundschwingungen [20]. Um ein ausreichend starkes Absorptionssignal und damit ein gutes Signal-Rauschverhältnis zu erhalten muss die Schichtdicke angepasst werden. Abhängig von der gemessenen Substanz und deren Absorptionsintensität liegen die Schichtdicken in der NIRS zwischen 0,5 mm ( $\lambda = 2.500 \text{ nm}$ ) und mehreren Zentimetern ( $\lambda = 700 \text{ nm}$ ) [21]. Messzellen mit größeren Schichtdicken neigen weniger dazu zu verstopfen und können einfacher gereinigt werden [22].

In der NIRS haben sich drei verschiedene Messverfahren etabliert (s. Abb. 2.6) [23]. Die Messung flüssiger Proben erfolgt in Transmission oder Transflexion. Bei der Transflexion wird die einfallende Strahlung durch einen Reflektor zurück zum Detektor transmittiert. Befinden sich Partikel oder Zellen in Lösung wird die Strahlung durch diese diffus gestreut. Alle drei Methoden können ex situ oder in situ eingesetzt werden. Dabei profitiert die NIRS im Vergleich zur MIRS von kostengünstigen Materialien für das Probenhandling. Küvetten und optische Fenster bestehen aus chemisch resistentem Quarzglas ( $\text{SiO}_2$ ) oder Saphir ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) [10].

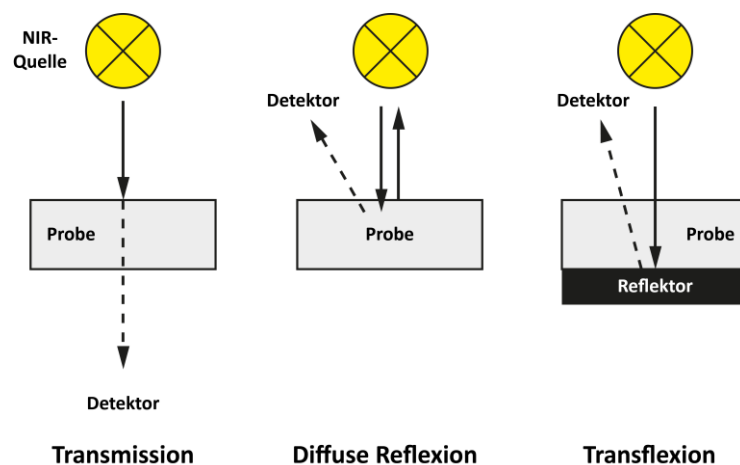


Abb. 2.6: Drei verschiedene Messprinzipien der NIRS (nach [23]).

In der Prozessüberwachung ist eine generelle Trennung zwischen Messstelle und Analysegerät aus Gründen der Sicherheit erwünscht [8], [24]. Durch die Verwendung von LWL für den NIR-Bereich ist diese Trennung möglich. Die Entwicklung von LWL für den NIR-Bereich wurde durch die Telekommunikationsindustrie begünstigt. Seit den 1970er Jahren werden

Glasfaserkabel aus Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) für die Telekommunikation eingesetzt [17]. LWL aus  $\text{SiO}_2$  haben eine sehr gute Transmission im NIR-Bereich (0,2 dB/km bei  $\lambda = 1.500 \text{ nm}$ ) und sind deutlich preiswerter und robuster als LWL aus AgX [17]. Die Länge der eingesetzten LWL kann ohne weiteres über 100 m betragen.

Seit Anfang der 1990er Jahre wird die NIRS zur Analyse biotechnologischer Prozesse eingesetzt [20]. Die ersten Anwendungsbeispiele bezogen sich ausschließlich auf aerobe oder anaerobe mikrobielle Kultivierungen [25]. Cavinato *et al.* haben online die Konzentration von Ethanol bei einer Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* verfolgt. [26]. Ein LWL transmittiert die Strahlung zu einem Sichtfenster ( $\text{SiO}_2$ ) am Bioreaktor. Im Bioreaktor wird die NIR-Strahlung an den Hefezellen diffus reflektiert und gelangt über einen weiteren LWL zu einem Detektor. Bei geringen Zellkonzentrationen ist diese Methode jedoch sehr ungenau, da nur wenig Licht gestreut wird und zum Detektor gelangt.

Anstelle eines Sichtfensters haben Vaccari *et al.* eine Durchflusszelle eingesetzt, mit der eine Kultivierung von *Lactobacillus casei* offline und online überwacht wurde [27]. Für die online Überwachung wurde das zellhaltige Kulturmedium in einem geschlossenen Kreislauf durch die Durchflusszelle gepumpt. Als Nachteil dieser Methode ist ein erhöhtes Kontaminationsrisiko zu nennen.

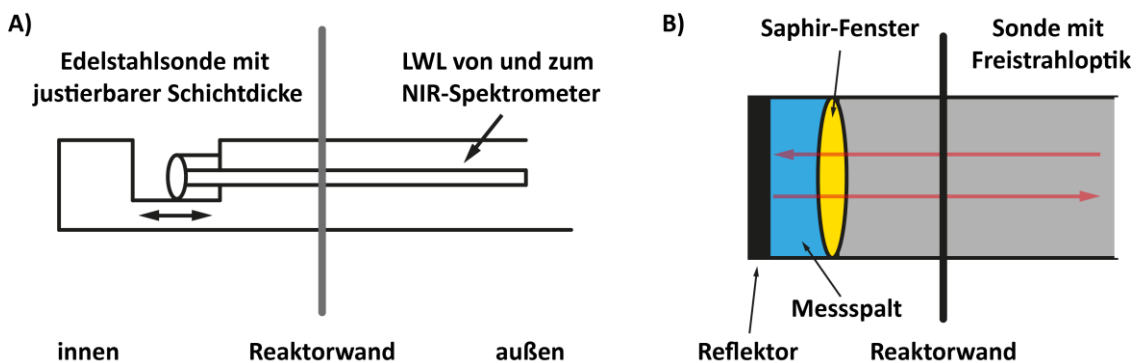


Abb. 2.7: NIR-Transmissionssonde mit verstellbarer Schichtdicke und LWL (A) [25]; NIR-Transflexionssonde mit Freistrahloptik ohne Lichtwellenleiter (B).

Zu Beginn der 2000er Jahre haben Arnold *et al.* in situ NIR-Sonden zur Prozessüberwachung eingesetzt [25], [28]. In der ersten Publikation wurde eine NIR-Transmissionssonde (s. Abb. 2.7 A) zur online Überwachung der Biomasse einer *Escherichia coli* Kultivierung verwendet [25]. Sie konnten zeigen, dass, trotz hoher Rührer- und Begasungsraten (800 rpm, 1 vvm) sowie Temperaturänderungen im Prozessverlauf (30 – 40 °C), die Bestimmung der Biomasse mittels NIRS möglich war [25]. Das Verfahren beruht auf der Korrelation der Biomasse zu einzelnen Peaks im NIR-Spektrum (910 – 920 nm, 1.680 – 1.690 nm und 2.260 – 2.270 nm) [25].

NIR-Sonden können im Vergleich zu Durchflusszellen zusammen mit dem Bioreaktor dampfsterilisiert werden, wodurch die Gefahr einer Kontamination

minimiert wird. Dies ermöglicht den Einsatz der NIRS zur inline Überwachung von Tierzellkultivierung. Arnold *et al.* haben eine CHO-Kultivierung hinsichtlich vier Analyten (Glucose, Lactat, Glutamin und Ammonium) erfolgreich überwacht [28].

In Rahmen dieser Arbeit wird ein NIR-Spektrometer mit einer sogenannten Freistrahloptik eingesetzt (s. Abb. 2.7 B). Die Sonde ist mit dem Prozessanschluss Teil des Spektrometers. Festinstallierte Spiegel transmittieren die NIR-Strahlung zur Sonde. Das Spektrometer wird somit samt Sonde an den Prozess angekoppelt. Um eine hohe Robustheit des Spektrometers zu gewährleisten, werden sogenannten Diodenarray-Detektoren eingesetzt. Anders als bei einem Interferometer wird die NIR-Strahlung durch ein optisches Gitter oder ein Prisma aufgespalten (7, S. 90 ff.) [29]. Die aufgespaltete Strahlung trifft anschließend auf den Diodenarray-Detektor. Im Gegensatz zu einem FT-IR sind Diodenarray-Spektrometer weniger komplex aufgebaut, besitzen keine beweglichen Teile und sind dadurch weniger anfällig gegenüber Vibrationen und Erschütterungen. Zu den Nachteilen zählen ein eingeschränkter Wellenlängenbereich sowie eine, durch die Diodenarray vorgegebene, feste spektrale Auflösung. Teil dieser Arbeit ist die Evaluierung eines Diodenarray-Spektrometers mit einer Freistrahloptik als inline System für die Prozessüberwachung.

#### 2.2.4 Zusammenfassung

Durch die PAT-Initiative aus dem Jahre 2004 ist der Bedarf moderner Analysegeräte für die inline Überwachung biotechnologischer Prozesse gestiegen. Dies hat zu einer Weiterentwicklung im Bereich der MIRS und NIRS geführt mit dem Ziel robuste und einfach zu bedienende Spektrometer anzubieten. Die MIRS und NIRS bieten als moderne Analyseverfahren die Möglichkeit biotechnologische Prozesse inline zu überwachen. Die eingesetzten Sonden können über Standard 25 mm Reaktorstutzen angeschlossen werden sowie am Platz gereinigt und sterilisiert werden (CIP – *cleaning in place*, SIP – *sterilizing in place*).

Um die komplexen Informationen in einem Spektrum zu identifizieren und einzelnen Analyten zuordnen zu können werden multivariate Auswertemethoden herangezogen. Im folgenden Kapitel werden einige Grundlagen der multivariaten Datenanalyse erläutert.

### 2.3 Multivariate Analyse

Ein IR-Spektrum ist zusammengesetzt aus den relativen Absorptionsintensitäten (engl. *relative absorbance units* – rel. AU) bei den entsprechenden Wellenlängen oder Wellenzahlen. In der multivariaten Datenanalyse entspricht jede Wellenlänge oder Wellenzahl einer Variable. Demnach werden IR-Spektren auch als multivariate

Daten bezeichnet. Das Ziel einer multivariaten Analyse (MVA) ist eine Reduktion der komplexen Spektren sowie die Identifizierung signifikanter Variablen. Dabei wird unterschieden zwischen einer qualitativen und quantitativen Analyse der Daten. Die Grundlagen werden im Folgenden beschrieben und dienen dem Verständnis der Auswertung in Kapitel 4 und 5.

### 2.3.1 Hauptkomponentenanalyse

Jedes Spektrum setzt sich aus mehreren Wellenlängen bzw. Wellenzahlen und den dazugehörigen Intensitäten zusammen. Jede Wellenlänge wird als Variable definiert, demzufolge der Überbegriff multivariate Analyse. Eine übersichtliche, qualitative Auswertung multivariater Daten ermöglicht die Hauptkomponentenanalyse (engl. *principal component analysis*) – PCA [30].

Die PCA reduziert den Inhalt komplexer Daten auf die wesentlichen Informationen [30]. Die Spektren werden in einer Matrix  $X$  zusammengefasst, wobei jede Zeile einem Spektrum und jede Spalte einer Variablen entspricht. Die PCA untersucht die Datenmatrix  $X$  hinsichtlich ihrer maximalen Varianz und berechnet sogenannte Hauptkomponenten (engl. *principal component* – PC) oder latente Variablen. Dadurch werden die ursprünglichen Daten in ein neues Koordinatensystem projiziert.

Die erste Hauptkomponente (PC-1) beschreibt den größten Anteil der Varianz in den Daten und jede weitere PC einen geringeren Anteil. Ziel der PCA ist es den ursprünglichen Informationsgehalt mit nur wenigen PCs zu beschreiben. Das Ergebnis einer PCA ist in Gl. 2.7 gegeben [30].

$$X = TP^T + E \quad \text{Gl. 2.7}$$

Die Matrix  $T$  ist die Scorematrix oder Scores [30]. Die Spaltenanzahl der Scorematrix ist gegeben durch die Anzahl der PCs. Jeder Scorewert in der Matrix  $T$  entspricht einem Spektrum. Bei der Matrix  $P$  handelt es sich um die Hauptkomponentenmatrix oder Loadings. Ein Loading gibt den Einfluss einer einzelnen Variablen bezüglich einer bestimmten PC wieder. Die Loadings von spektroskopischen Daten gleichen oft einem Spektrum und die Werte liegen zwischen  $-1$  und  $+1$ . Liegt der Wert bei null, so hat die Variable keinen Einfluss auf die jeweilige PC. Die Anzahl der Zeilen in der Matrix  $P$  wird bestimmt durch die Anzahl der verwendeten PCs, wobei jede Spalte einer Variable entspricht.

Beim letzten Term in Gl. 2.7, Matrix  $E$ , handelt es sich um eine Residuen- oder Fehlermatrix. Diese verfügt über die gleiche Zeilen- und Spaltenanzahl wie die Datenmatrix  $X$ . Die Residuen geben die Abweichung des Produkts aus  $T$  und  $P$  gegenüber  $X$  wieder. Je mehr PCs verwendet werden, desto kleiner wird der Fehler in Matrix  $E$ . Die maximale Anzahl an PCs ist gleich der Anzahl an Variablen in der

Datenmatrix  $X$ . Aus den Matrizen  $T$ ,  $P$  und  $E$  lassen sich die ursprünglichen Daten  $X$  nach Gl. 2.7 berechnen.

Zur Interpretation einer PCA werden die Scorewerte der ersten beiden PCs, die den Großteil der Varianz innerhalb der Spektren wiedergeben, gegeneinander aufgetragen. Jeder Punkt im Score-Diagramm entspricht einem Spektrum. Da die PCA die Daten hinsichtlich der maximalen Varianz untersucht, können anhand der Scores signifikante Unterschiede zwischen den Spektren erkannt werden. Liegen die Punkte nah beieinander sind die Varianzen und somit die Unterschiede zwischen den Spektren gering. Ein weiteres Gütekriterium der PCA ist die erklärte Varianz durch die PCs. Im Idealfall erklären wenige PCs nahezu 100 % der Varianz innerhalb der Daten.

### 2.3.2 Multivariate Regression - PLS

Die PCA wird verwendet, um einen Datensatz qualitativ zu analysieren. Mit Hilfe der multivariaten Regression werden Zusammenhänge zwischen zwei Variablen analysiert. Am Beispiel der IR-Spektroskopie stellt die multivariate Regression einen Zusammenhang zwischen den Spektren (X-Variablen) und den Messwerten eines Analyten (Y-Variable) her [30]. Damit eine Regression möglich ist, muss die Voraussetzung erfüllt sein, dass eine Konzentrationsänderung des Analyten auch eine Änderung im Spektrum nach sich zieht.

Bei einer univariaten Kalibration wird aus einer gemessenen Größe (Absorption) und der dazugehörigen Y-Variable (Konzentration eines Analyten) eine Kalibrationsgerade erstellt. Eine multivariate Regression verfolgt das gleiche Ziel. Es wird ein mathematischer Ausdruck erstellt, mit dem eine Konzentration (Y-Variable) aus einem gemessenen Spektrum (X-Variable) berechnet oder vorhergesagt (engl. *predicted*) werden kann [30].

Als Standardregressionsverfahren hat sich die PLS (engl. *partial least squares*) etabliert. Bei der PLS wird eine PCA sowohl auf die Spektren (s. Gl. 2.7, S. 13) als auch auf die Referenzwerte (s. Gl. 2.8) angewendet. Dabei findet ein Informationsaustausch zwischen den beiden PCAs statt.

$$Y = UQ^T + F \quad \text{Gl. 2.8}$$

Anschließend wird die Kovarianz zwischen den T- und U-Scores maximiert. Ähnlich der PCA werden latente Variablen berechnet, welche im Zusammenhang mit der PLS als Faktoren bezeichnet werden. Über die Regressionsgleichung 2.9 lässt sich aus einem gemessenen Spektrum  $x_i^T$  die Konzentration  $y_i$  eines Analyten bestimmen [30].

$$y_i = b_0 + x_i^T b \quad \text{Gl. 2.9}$$

Die PLS ermittelt den Modelloffset  $b_0$  und den Regressionskoeffizientenvektor  $b$ . Beide hängen von der Zahl der verwendeten Faktoren ab. Die Regressions-Gl. 2.9 entspricht der einer univariaten mit dem Unterschied, dass es sich bei  $x_i^T$  um einen Zeilenvektor und bei  $b$  um einen Spaltenvektor handelt.

Zur Interpretation der PLS werden ähnlich der PCA Scores und Loadings untersucht. Die PLS berechnet sowohl X- als auch Y-Scores. Jeder Faktor beschreibt einen Anteil der Varianz innerhalb der X- und Y-Daten. Anhand der Loadings wird geprüft, welche X-Variablen (Wellenlängen) einen signifikanten Einfluss auf die einzelnen Faktoren haben. Ein starker Einfluss kann auf eine Absorptionsbande des gesuchten Analyten zurückgeführt werden. Durch einen Vergleich der Loadings mit einem Reinspektrum des gesuchten Analyten können die Absorptionsbanden zugeordnet werden. Ein weiteres Validierungskriterium für die Modelle ist die Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers – kurz RMSE (engl. – *root mean square error*).

Die Berechnungsgrundlage für den RMSE und den einzelnen Varianten befindet sich im Anhang (7.7.1, S. 112). Werden alle Referenzwerte für das Modell verwendet und durch dieses vorhergesagt, berechnet sich aus der Abweichung zwischen der Referenz und Vorhersage der RMSEC (engl. *root mean square error of calibration*). Der RMSEC erlaubt keine Aussage darüber, wie gut das Modell auf neue Messwerte, z. B. an einem anderen Messtag, reagiert. Eine etwas bessere Abschätzung darüber, wie genau das Modell unbekannte Messwerte vorhersagen kann, ergibt sich aus der Kreuzvalidierung, dem RMSECV (engl. *root mean square error of cross validation*). Dabei werden einzelne Messwerte aus der Kalibration entnommen und mit den restlichen Messwerten wird ein Kalibrationsmodell erstellt. Dieses Modell wird auf die entnommenen Werte angewendet. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis jeder Messwert einmal nicht Teil des Modells war und vorhergesagt wurde. Der resultierende Mittelwert ergibt den RMSECV.

Werden PLS-Modelle für die Vorhersage von Analyten einer Kultivierung generiert, so ist die Aussagekraft des RMSECV für eine abschließende Validierung nicht ausreichend. Für eine genaue Aussage wird eine externe Validierung durchgeführt. Dazu wird ein Analyt aus einer, dem Modell unbekannte, Kultivierung vorhergesagt. Dieser Fehler wird als RMSEP (engl. *root mean square error of prediction*) bezeichnet und erlaubt eine fundierte Aussage über die Vorhersagegüte und Robustheit des Modells bezüglich weiterer Kultivierungen.

### 2.3.3 LOD und LOQ multivariater Messmethoden

Mit Hilfe der IRS können nach vorheriger Kalibration die Konzentrationen unbekannter Proben vorhergesagt werden. Um Gewissheit zu haben, ab welchem Konzentrationsbereich eine Messmethode verlässliche Vorhersagen liefert, werden die Detektionsgrenzen einer Messmethode hinsichtlich vorhergesagten Analyten ermittelt.

In der Analytik wird zwischen dem LOD (engl. *limit of detection*) und LOQ (engl. *limit of quantification*) unterschieden [31]. Das LOD ist definiert als die unterste Detektionsgrenze einer Messmethode für einen Analyten. Das LOQ wird als die Konzentration, die sicher mit einer Methode bestimmt werden kann, definiert [31]. Aus dem Messsignal einer Blindprobe ( $r_b$ ) und deren Standardabweichung ( $s_b$ ) lassen sich das LOD und LOQ für eine univariate Messmethode wie folgt berechnen [31]:

$$y_{\text{LOD}} = r_b + 3s_b \quad \text{Gl. 2.10}$$

$$y_{\text{LOQ}} = r_b + 10s_b \quad \text{Gl. 2.11}$$

Durch eine Erweiterung der Gl. 2.10 und Gl. 2.11 mit Gl. 2.9 lassen sich das LOD und LOQ für eine multivariate Methode berechnen. Aus den gemittelten Spektren der Blindproben  $r_b^T$ , der dazugehörigen Standardabweichungen  $s_b^T$  hinsichtlich jeder Variable (Wellenzahl bzw. Wellenlänge) und den PLS-Regressionskoeffizienten ( $b_0$  und  $b$ ) wird das LOD und LOQ nach Gl. 2.12 und Gl. 2.13 berechnet [32].

$$y_{\text{LOD}} = b_0 + r_b^T \cdot b + 3 \cdot s_b^T \cdot b \quad \text{Gl. 2.12}$$

$$y_{\text{LOQ}} = b_0 + r_b^T \cdot b + 10 \cdot s_b^T \cdot b \quad \text{Gl. 2.13}$$

Es kann kein allgemeingültiger LOD oder LOQ für die MIRS oder NIRS bezüglich eines Analyten angegeben werden. Das LOD und LOQ hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab. Hierzu zählen die Intensitäten der Absorptionsbanden, Überlagerung der Absorptionsbande durch andere chemische Komponenten, das Spektrometer und die Messparameter [33]. In der Literatur finden sich daher unterschiedliche Angaben.

Für die MIR-Vorhersage von Lactose und Milchsäure gaben Fairbrother *et al.* einen LOD von 0,8 g/L an, für Acetat und Glycerin gaben Schenk *et al.* einen LOD von 0,5 g/L an [34], [35]. In beiden Fällen bezogen sich die Werte auf die Überwachung einer Kultivierung von *S. cerevisiae*. Für die NIRS werden abhängig von der Messmethode verschiedene Angaben gemacht. Für Transmissionsmessungen wird ein LOD zwischen 0,1 bis 0,5 g/L angegeben. Wird über Reflexion gemessen liegt das LOD mit 0,5 bis 1,0 g/L deutlich höher [21].

### 2.3.4 Zusammenfassung

Die in der Zellkultur eingesetzten Medien bestehen neben Wasser aus einer Vielzahl an Komponenten [36]. Ein IR-Spektrum ist das Summensignal der IR-aktiven Einzelkomponenten im Medium. Die MVA wird eingesetzt, um Zusammenhänge

innerhalb der Daten zu erkennen und Kalibrationsmodelle für signifikante Analyten einer Kultivierung zu erstellen. Die Vorhersagen aus den Modellen können zur allgemeinen Prozessüberwachung oder zur Kontrolle von fed-batch Kultivierungen eingesetzt werden [37]. Ebenfalls von Interesse sind sogenannte Batchtrajektorien, die die Gesamtheit des Prozesses darstellen und Abweichungen von einem definierten idealen Prozessverlauf (engl. *golden batch*) darstellen [38], [39].



## 3 IR-Messung am Bioreaktor

In diesem Kapitel werden Einzelheiten zum Messaufbau, den Spektrometern und der Kultivierungsstrategie aufgezeigt. Im Zusammenhang mit dem Messaufbau wird die Methodik der Spektrenaufnahme kurz erläutert. Im zweiten Teil dieses Kapitels wird auf die CHO-Kultivierung eingegangen sowie auf die Methodik zur Erstellung robuster Kalibrationsmodelle.

### 3.1 IR-Messung am Bioreaktor

Zur inline-Überwachung einer CHO-Kultivierung wurden ein FT-MIR- und ein NIR-Spektrometer verwendet. Durch den gleichzeitigen Einsatz ist es möglich, beide IRS-Methoden direkt miteinander zu vergleichen sowie die Vorteile beider Methoden hinsichtlich der Prozessüberwachung zu kombinieren.

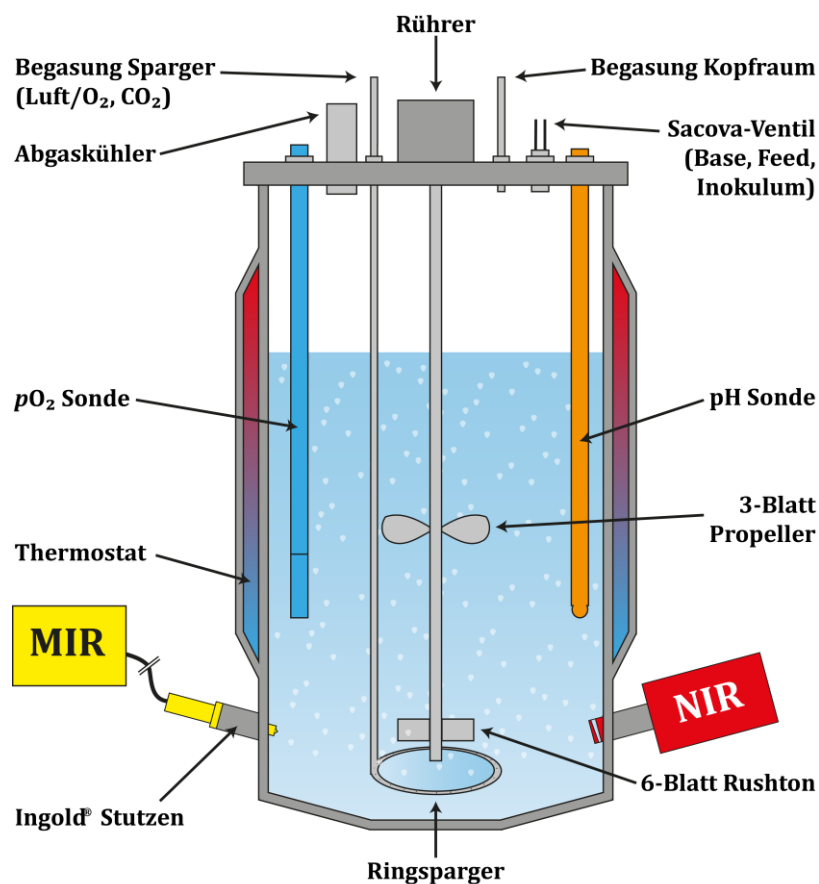


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des MIR- und NIR-Spektrometers am BIOSTAT® Cplus; nicht dargestellt ist ein Probenahmeventil, welches sich auf gleicher Höhe der beiden Ingold®-Stutzen befindet (nicht maßstabsgetreu).

Beide Spektrometer sind für biotechnologische Anwendungen ausgelegt und können über einen Stutzen (25 mm) an den Bioreaktor angeschlossen werden. Eine Reinigung und Sterilisation „vor Ort“ ist ebenfalls möglich (CIP/SIP – *cleaning and sterilizing in place*).

Der Messaufbau für alle Vorversuche entspricht dem der späteren CHO-Kultivierungen im BIOSTAT® Cplus (Sartorius AG, Göttingen). Ein schematischer Querschnitt des Bioreaktors zeigt die Position der Sonden im Reaktor (s. Abb. 3.1, S. 18). Nicht abgebildet ist ein Probenahmeventil, welches sich auf gleicher Höhe der IR-Sonden befindet. Für die Durchmischung sorgen zwei unterschiedliche Rührertypen. Direkt über dem Sparger ist ein 6-Blatt-Rührer (Rusthon-Turbine) angebracht, der effektiv die Gasblasen dispergiert und für eine tangentielle Vermischung sorgt. Ein weiterer 3-Blatt-Propeller dient der axialen Durchmischung, wodurch Zugaben über das Sacova-Ventil (Base, Glucoselösung) im Reaktor schnell verteilt werden. Weitere Details zum Reaktorsetup, besonders in Bezug auf die CHO-Kultivierungen, folgen im Anhang (Kapitel 7.5.2, S. 109).

### 3.1.1 FT-MIR-Spektrometer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein MATRIX-MF (Bruker Optik GmbH, Ettlingen) verwendet und mit der Software OPUS 6.0 (Bruker) betrieben. Eine Übersicht der Gerätespezifikationen ist in Tabelle 3.1 (S. 19) gegeben.

Wenn nicht anders angegeben, wurde das FT-MIR-Spektrometer (kurz – MIR) mit N<sub>2</sub>(g) (5.0, Linde AG) durchspült (20 mL/min). Hierdurch werden Spuren von H<sub>2</sub>O(g) und CO<sub>2</sub> aus dem MIR entfernt.

Tabelle 3.1: Übersicht der einzelnen Komponenten und Eigenschaften beider Spektrometer

	<b>MATRIX-MF</b>	<b>BioPAT® Spectro</b>
Messbereich	3.000 – 750 cm <sup>-1</sup> 3,3 – 13,3 µm	1.050 – 1.650 nm 9.523 – 6.060 cm <sup>-1</sup>
Lichtquelle	SiC	Wolframhalogenlampe
Detektor	MCT (HgCdTe) gekühlt auf -196 °C	InGaAs bei RT
Lichtleiter	Silberhalogenid	Freistrahloptik
Ankopplung	ATR-Sonde (Diamant) 2-fach Reflexion	Durchflusszelle Saphirfenster,
Eindringtiefe	0,5-2 µm	10 mm
Messprinzip	interne Reflexion	Transflexion
Messdauer	2 min	1 min
Besonderheiten	N <sub>2, (g)</sub> -Spülung	

Über einen Lichtleiter ist das MIR mit einer ATR-Sonde (art photonics GmbH, Berlin, Deutschland) verbunden. An der Spitze der ATR-Sonde befindet sich ein IRE (*Internal Reflection Element*) aus Diamant (s. Abb. 2.5, S. 9).

Jedes Spektrum setzt sich aus dem Mittelwert von 1.000 aufgenommen Scans zusammen, bei einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  im Wellenzahlbereich zwischen  $3.000$  und  $750\text{ cm}^{-1}$  ( $3.3$  bis  $13.3\text{ }\mu\text{m}$ ). Die Aufnahmedauer für ein Spektrum beträgt etwa 2 min (Scan-Geschwindigkeit  $80\text{ kHz}$ ). Für sämtliche Auswertungen werden Absorptionsspektren (AB) verwendet. Diese setzen sich nach Gl. 3.1 aus den Einkanalspektren des Hintergrund- oder Referenzspektrums ( $I_{\text{Ref.}}$ ) sowie des Probenspektrums ( $I_{\text{Probe}}$ ) zusammen [3].

$$AB = \lg\left(\frac{I_{\text{Ref.}}}{I_{\text{Probe}}}\right) \quad \text{Gl. 3.1}$$

Auf diese Weise werden überflüssige Informationen, wie die Eigenabsorptionen des Lichtleiters und der ATR-Sonde, aus dem Spektrum entfernt. Viel wichtiger ist jedoch, dass die Absorptionen von unterschiedlichen Spektrometern auf diese Weise vergleichbar werden. Referenzspektren werden vor jeder Versuchsreihe bzw. vor Beginn einer Kultivierung aufgenommen, um Alterungserscheinungen der Hardware zu kompensieren. Als Referenzspektrum kann die Umgebungsluft,  $\text{H}_2\text{O}$  oder das eingesetzte Kulturmedium verwendet werden.

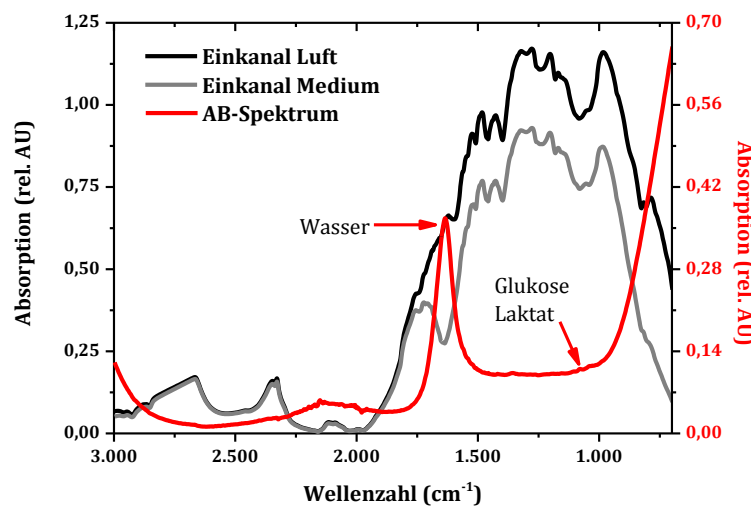


Abb. 3.2: Beispiele für MIR Einkanalspektren von Luft und Kulturmedium und dem daraus resultierenden AB-Spektrum.

In Abb. 3.2 (S. 20) sind zwei verschiedene Einkanalspektren und das daraus resultierende AB-Spektrum dargestellt. Als Referenz wurde Luft und als Probe das Kulturmedium TC-42 (TeutoCell AG, Bielefeld) verwendet. Im Bereich um  $2000\text{ cm}^{-1}$  ist die gemessene Absorption der Einkanalspektren annähernd Null. Dies liegt am verwendeten IRE (Diamant), welches in diesem Spektralbereich selber

stark absorbiert. Der für die quantitativen Messungen relevante *fingerprint*-Bereich (s. Kapitel 2.1, S. 3) liegt zwischen  $1800$  und  $800\text{ cm}^{-1}$ . Die Absorption der Einkanalenspektren liegt in diesem Bereich bei etwa 1 rel. AU (*relative absorption units*). In diesem Bereich des MIR-Spektrums absorbieren funktionelle Gruppen, anhand derer einzelne Verbindungen identifiziert werden können. Bei Messungen von wässrigen Lösungen ist Wasser der Hauptbestandteil. Die O–H-Deformationsbande ( $1.640\text{ cm}^{-1}$ ) zeigt die höchste Intensität im AB-Spektrum (s. Abb. 3.2, S. 20). Um etwa  $1050\text{ cm}^{-1}$  liegen die Absorptionsbanden der C–O-Valenzschwingung cyclischer und aliphatischer Alkoholgruppen. Glucose und Lactat können anhand dieser Absorptionsbanden identifiziert und unterschieden werden.

### 3.1.2 NIR-Spektrometer

Sämtliche NIR-Spektren wurden mit einem BioPat® Spectro (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) aufgenommen. Eine Übersicht der einzelnen Komponenten und Zusammenfassung der Messparameter befindet sich in Tabelle 3.1 (S. 19). Das BioPat® Spectro (kurz - NIR) ist eine Weiterentwicklung des PMD500 (Sartorius AG) und kann direkt über den Standard Stutzen (25 mm Ingold®) am Bioreaktor angeschlossen werden. Zur Steuerung des NIR wird die Software SX-Suite Version 2.10 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) verwendet.

Das NIR ist im Gegensatz zu einem FT-IR-Spektrometer mit einem optischen Gitter und einer Photodiodenarray ausgestattet (s. Kapitel 2.2.3, S. 10). Daraus resultiert eine deutlich kompaktere Bauweise. Somit kann das komplette NIR direkt am Bioreaktor angeschlossen werden (s. Abb. 3.5, S. 23).



Abb. 3.3: Verwendetes NIR-Spektrometer mit Freistrahloptik (A) und Großaufnahme der Sonde mit 5 mm Messspalt – Schichtdicke 10 mm (B).

Ausgehend von einer Halogenlampe wird das NIR-Licht zum Tubus geleitet, in dem eine Durchflusszelle mit festem Messspalt (5 mm) integriert ist. Bei ersten Testversuchen konnte ein weiterer Prototyp mit einem kleineren Messspalt (1 mm) getestet werden. Das Spektrometer mit dem kleineren Messspalt stand nur zeitlich begrenzt zur Verfügung.

Das NIR wird so am Reaktor angebracht, dass der Messspalt parallel zur Strömungsrichtung im Reaktor ausgerichtet ist. Hierdurch werden Totvolumina vermieden. Die Rückseite der Durchflusszelle ist aus Edelstahl gefertigt und dient als Reflektor (s. Abb. 3.3 ). Die Messung beruht daher auf dem Prinzip der Transflexion (s. Abb. 2.6, S. 10), mit einer optischen Weglänge von 10 mm und einem Strahldurchmesser von 20 mm. Damit ist die effektive optische Weglänge beim NIR um etwa das 10.000-fache größer als beim MIR.

Spektren werden kontinuierlich etwa alle 3 s in einem Wellenlängenbereich zwischen 1.050 und 1.650 nm aufgenommen. Für sämtliche Auswertungen werden die NIR-Spektren über 60 s Messdauer gemittelt. Anders als beim MIR, dient hier ein interner Weißstandard als Referenzspektrum. Eine Referenz wird von der Software automatisch nach jedem Initialisieren des Gerätes, sowie zusätzlich bei Temperaturschwankungen aufgenommen. Im Gegensatz zum MIR lässt sich beim NIR die Referenz nicht frei wählen oder nachträglich ändern.

In Abb. 3.4 (S. 22) sind NIR-Spektren von Wasser dargestellt, die im Bioreaktor aufgenommen wurden. Es handelt sich genau wie beim MIR um AB-Spektren. Bei etwa 1.450 nm befindet sich die OH-Kombinationsschwingung von Wasser [40]. Entsprechend der Literatur sollte diese Bande ab 1500 nm deutlich abfallen. Dies ist nur beim NIR-Spektrometer mit 1 mm Messspalt zu beobachten. Das 5 mm Gerät zeigt hier eine Sättigung des Signals mit vollständiger Absorption.

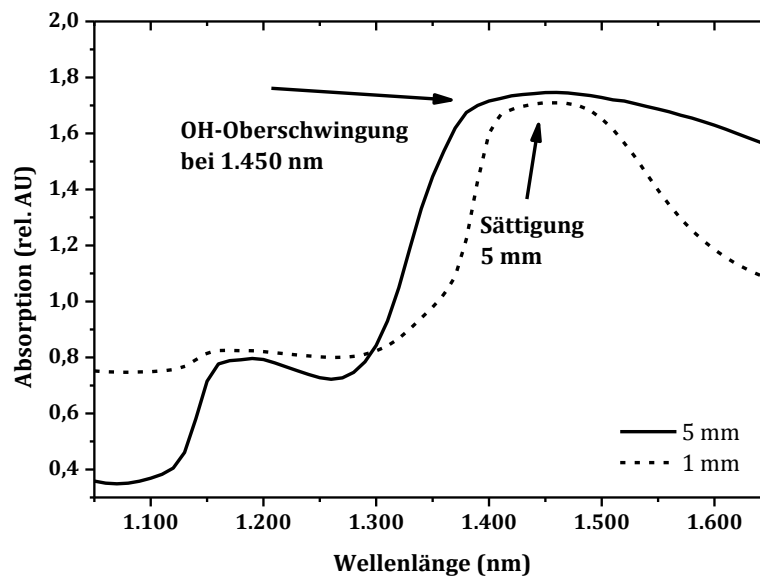


Abb. 3.4: NIR-Spektrum von Wasser (AB-Spektrum) bei 5 und 1 mm Messspalt; beim NIR mit 5 mm Messspalt ist eine Sättigung ab  $\lambda = 1.450$  nm zu beobachten.

In diesem Bereich hat das Lambert Beer'sche Gesetz keine Gültigkeit, da kein linearer Zusammenhang zwischen einer Analytkonzentration und der zugehörigen Absorptionsintensität besteht. Eine Absorption von etwa 1,8 rel. AU bedeutet, dass etwa 1,6 % der einkommenden Strahlung auf den Detektor treffen. Bei der

Auswertung muss deshalb genau untersucht werden, ob der Spektralbereich zwischen  $1.400$  bis  $1.650\text{ cm}^{-1}$  sinnvolle Informationen enthält oder nicht. Eine Begrenzung des Spektralbereichs ist wegen der breiten Absorptionsbanden und dem möglichen Verlust an Informationsgehalt nicht angebracht.

### 3.1.3 Zusammenfassung

In Abb. 3.5 ist der komplette Versuchsaufbau für die inline Überwachung am Bioprozess gezeigt. An dem linken Stutzen ist die ATR-Sonde angebracht und am rechten Stutzen das komplette NIR-Spektrometer. Der gleichzeitige Einsatz am Bioreaktor ermöglicht einen direkten Vergleich beider Spektrometer in Bezug auf die inline Vorhersage chemischer Analyten und Zellvariablen. Anhand des Messaufbaus können außerdem die Einflüsse von Prozessvariablen (Temperatur, Rührerdrehzahl und Begasung) auf die IR-Messung untersucht werden.

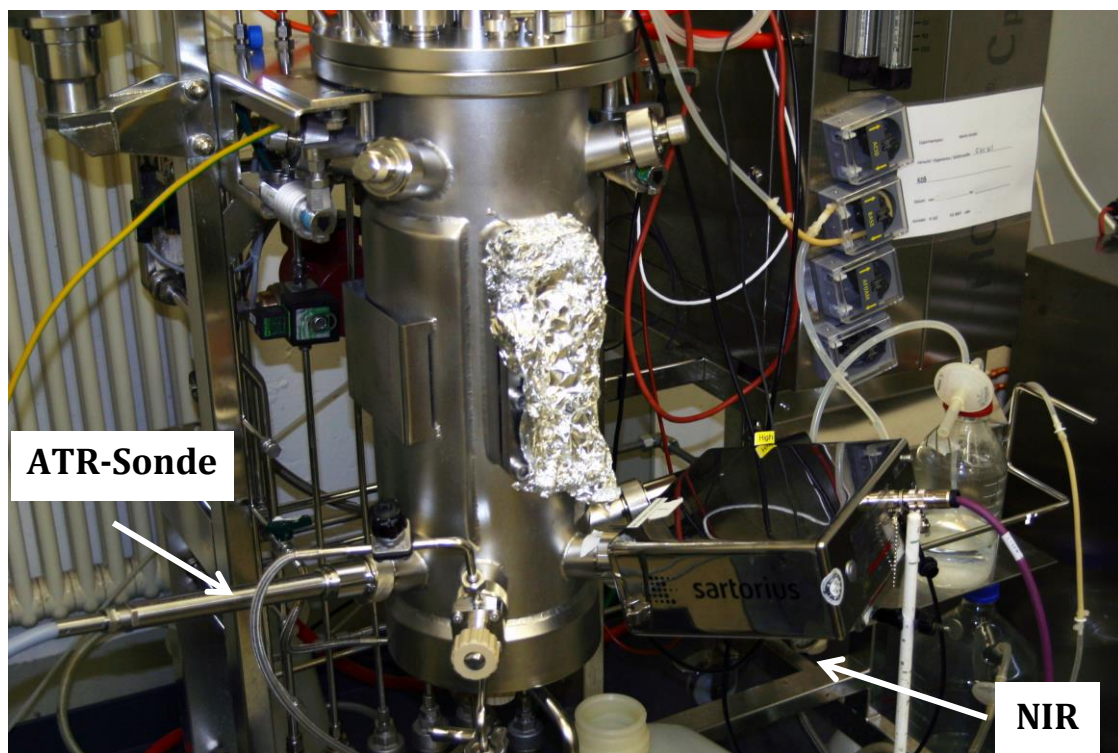


Abb. 3.5: Anschluss beider IR-Spektrometer am BIOSTAT® Cplus über 25 mm Stutzen.

## 3.2 CHO-Kultivierung

### 3.2.1 Auswahl der Zelllinie

Für die Evaluierung der IRS als Methode zur inline Überwachung eines Bioprozesses wurde nach einer repräsentativen Zelllinie, die in der biotechnologischen Industrie zur Herstellung von Biopharmazeutika eingesetzt wird, gesucht.

Die am häufigsten eingesetzten Säugertierzelllinien in der Biotechnologie sind CHO-Zellen. CHO-Zellen werden zur Produktion von Biopharmazeutika verwendet mit bisher mehr als 100 zugelassenen Wirkstoffen [41], [36]. Insbesondere die hohe Resistenz gegenüber Viren und die ähnliche Glykosylierung der produzierten rekombinanten Proteine zu humanen Proteinen zeichnen die CHO-Zelllinie aus [41]. Aufgrund dessen wurde die CHO-Zelllinie als repräsentative Zelllinie für die Evaluierung der IRS ausgewählt.

### 3.2.2 Kultivierungsstrategie für die Kalibration

Ziel ist es möglichst robuste Kalibrationsmodelle für die Vorhersage der Analyten und Zellparameter zu generieren. Der PLS-Algorithmus sucht nach Korrelationen zwischen den spektralen Daten und einem Analyten. Im Verlauf einer Kultivierung treten oft Korrelationen zwischen mehreren Analyten auf. Am Beispiel einer CHO-Kultivierung wird Glucose als Substrat verbraucht und gleichzeitig Lactat als Nebenprodukt gebildet.

Wenn mehrere Analyten gleichzeitig Änderungen im IR-Spektrum hervorrufen, so kann die PLS in diesem Fall kein spezifisches Modell für die einzelnen Analyten erzeugen. In der Literatur wurden verschiedene Verfahren beschrieben robuste Kalibrationsmodelle zu erzeugen, auch wenn Korrelationen zwischen den Analyten vorliegen. Mehrere Autoren haben bei der MIRS die Verwendung von sogenannten synthetischen Standards vorgeschlagen und verwendet [6], [42], [43]. Die Konzentrationsverläufe der synthetischen Standards werden so gewählt, dass keine Korrelationen zwischen den Analyten auftreten. Für ein robustes Kalibrationsmodell werden Daten aus den synthetischen Standards mit denen aus einer Kultivierung kombiniert.

In der NIRS wird oft von einer Komponentenmatrix gesprochen, die durch alle im Kulturmedium befindlichen Komponenten und Zellen hervorgerufen wird. Synthetische Standards geben diese komplexen Zusammenhänge nicht adäquat wider. Wegen der breiten Absorptionsbanden im NIR-Bereich und den damit verbundenen Interaktionen zwischen den einzelnen Komponenten eines Kulturmediums, kann dieses Verfahren in der NIRS nicht angewendet werden.

Als Alternative zu synthetischen Standards wurden sogenannte „Spiking-Experimente“ durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine rudimentäre fed-batch Kultivierung, bei der das Substrat Glucose und/oder Glutamin hochkonzentriert im Verlauf einer Kultivierung hinzugegeben wird. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es sowohl für die MIRS als auch für die NIRS eingesetzt werden kann. Dabei werden Korrelationen zwischen Glucose-Lactat, Glucose-Glutamin und Glucose-Zellzahl durchbrochen.

---

Mit Hilfe der Spiking-Experimente sollen robuste Kalibrationsmodelle erstellt werden. In einem weiteren Schritt werden Spiking-Experimente auch genutzt, um Kalibrationsmodelle zu validieren sowie diese auf ihre Robustheit zu testen.



## 4 Vorversuche

In den Kapiteln 4 und 5 werden die Ergebnisse der praktischen Arbeiten präzise dargestellt und kritisch diskutiert.

In diesem Kapitel werden mehrere Einflussfaktoren, die die Spektrenaufnahme im Bioreaktor beeinträchtigen können, untersucht. Zu den Einflussfaktoren zählen Temperatur, Rührerdrehzahl und die Begasungsrate im Bioreaktor. Im Anschluss wird die Fragestellung untersucht, inwiefern einzelne chemische Verbindungen innerhalb komplexer Standardlösungen mit Hilfe der MIRS und NIRS qualitativ und quantitativ bestimmt werden können. Anhand der Ergebnisse werden die Detektionsgrenzen für jeden Analyten und IR-Methode ermittelt.

Die Ergebnisse aus der inline Überwachung der CHO-Kultivierung folgt in Kapitel 5.

### 4.1 Einflüsse ausgewählter Reaktorparameter auf die IR-Messung

In diesem Kapitel werden drei Reaktorparameter – Temperatur, Begasungsrate und Rührerdrehzahl – und deren Einfluss auf die IR-Messung im Bioreaktor untersucht. Die Ergebnisse sollen zeigen, welchen relativen Einfluss jeder einzelne Parameter auf die MIR- und NIR-Messung hat.

Je nach Situation ist es erforderlich, dass ein oder mehrere Parameter verändert werden. Während des exponentiellen Wachstums von CHO Zellen steigt der Sauerstoffverbrauch ebenfalls exponentiell an. Um den gelösten Sauerstoffanteil ( $pO_2$ ) konstant zu halten, muss die Rührerdrehzahl und/oder die Begasungsrate angepasst werden. Diese Vorversuchsreihe ermöglicht eine Abschätzung darüber, welche Parameteränderung sich weniger kritisch auf die IR-Messungen auswirkt.

Tabelle 4.1: Untersuchte Parameter, die einen Einfluss auf die IR-Spektren haben und deren Bereiche sowie Anzahl von Stufen.

<i>Variable</i>	<i>Bereich</i>	<i>Stufen</i>
Temperatur (°C)	30 - 42	5
Begasungsrate (L/min)	0 - 10	6
Rührergeschwindigkeit (rpm)	0 - 600	6

Für diese Versuche wird der BIOSTAT® Cplus mit 5 L vollentsalztem (VE) Wasser befüllt und für jede der insgesamt 112 Kombinationen der Parameter werden je drei IR-Spektren aufgenommen. In Tabelle 4.1 ist eine Übersicht der untersuchten

Parameter und deren Bereich gegeben. Bei allen Temperaturstufen wurden Spektren bei einer Begasungsrate zwischen 0 – 1 L/min sowie einer Rührerdrehzahl zwischen 0 – 600 rpm aufgenommen. Zusätzlich wurde bei 37,0 °C die Begasungsrate auf 5 L/min und 10 L/min erweitert, um den Einfluss höherer Begasungsraten bei konstanter Temperatur genauer zu untersuchen.

Bei der MIRS wurde als Hintergrund ein direkt zuvor aufgenommenes Luftspektrum verwendet. Bei der NIRS dient der interne Weißstandard als Hintergrund. Sämtliche multivariaten Auswertungen und Vorverarbeitungen wurden mit der Software *The Unscrambler*<sup>®</sup> X (Version 10.1, CAMO Software AS, Oslo, Norwegen) durchgeführt.

#### 4.1.1 MIR-Auswertung

Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse auf alle Spektren angewendet. Die PCA wurde auf den *fingerprint*-Bereich zwischen 1.800 – 950  $\text{cm}^{-1}$  beschränkt. In diesem Bereich liegt die O–H Deformationsbande (bei 1.640  $\text{cm}^{-1}$ ) von Wasser (s. auch Abb. 3.2, S. 20) [13].

Vor der Durchführung einer PCA werden die MIR-Spektren nach Anomalien untersucht. Typisch für die IRS sind Basislinienverschiebungen, die gerätebedingt sind und für zufällige Varianzen innerhalb der Spektren sorgen können. Solche Anomalien können mit verschiedenen Datenvorbehandlungsmethoden entfernt werden. Alle verwendeten Datenvorverarbeitungsmethoden gehören zum Funktionsumfang der *Unscrambler* Software und werden im Kapitel 7.7.3 (S. 113) detailliert beschrieben.

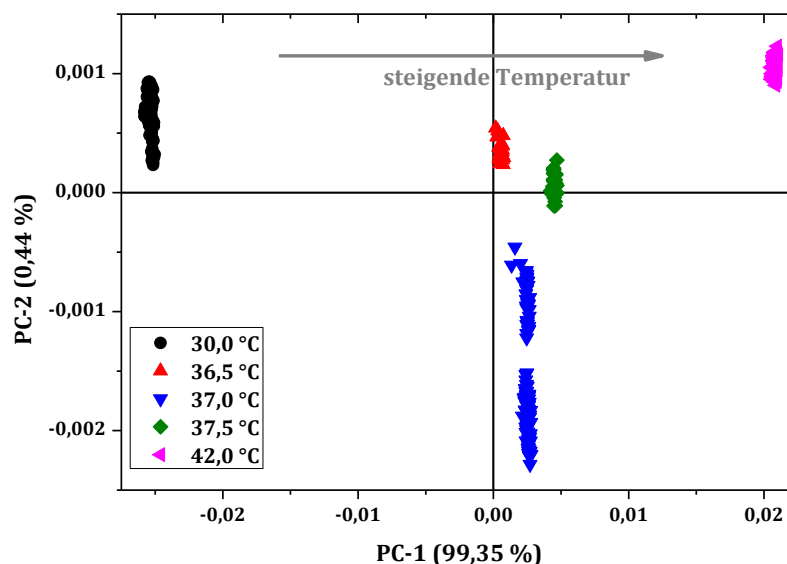


Abb. 4.1: PCA Scores (DT1, 1.800-950  $\text{cm}^{-1}$ ) der MIR-Spektren bei unterschiedlichen Reaktorparameter; farblich gruppiert nach der Temperatur.

Die MIR-Spektren wurden mit der Methode *detrending* vorverarbeitet (s. Kapitel 7.7.3.1, S. 113). Hierzu wird zu jedem Spektrum ein Polynom 1. Ordnung (DT1) berechnet, welches über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate angepasst wird und von jedem Spektrum subtrahiert wird. Dadurch werden die Spektren entlang der y-Achse um den Wert Null zentriert (s. Abb. 4.2, S. 28.).

In Abb. 4.1 sind Scores-Werte der PC-1 gegen PC-2 aufgetragen. In Klammern steht der Anteil der durch die jeweilige Hauptkomponente beschriebenen Varianz. Wie im Theorieteil (Kapitel 2.3.1, S. 13) erwähnt wurde haben Spektren, die sich wenig unterscheiden, ähnliche Scores-Werte und liegen im Diagramm dicht beieinander. Demnach ergeben sich fünf unterschiedliche Gruppierungen. Als nächsten Schritt gilt es, die Unterschiede zwischen diesen fünf Gruppen bzw. die Gemeinsamkeiten innerhalb der Gruppen zu identifizieren.

Eine farbliche Markierung der Scores-Werte macht deutlich, dass die Varianzen in den Spektren entlang der PC-1 auf die Temperatur zurückzuführen sind. Die eingeklammerte Zahl hinter jeder PC im Diagramm gibt an, welcher Anteil der Gesamtvarianz durch die jeweilige PC beschrieben wird. Die PC-1 beschreibt demnach 99,35 % der Gesamtvarianz der Spektren und diese Varianz wird maßgeblich durch die Temperatur hervorgerufen.

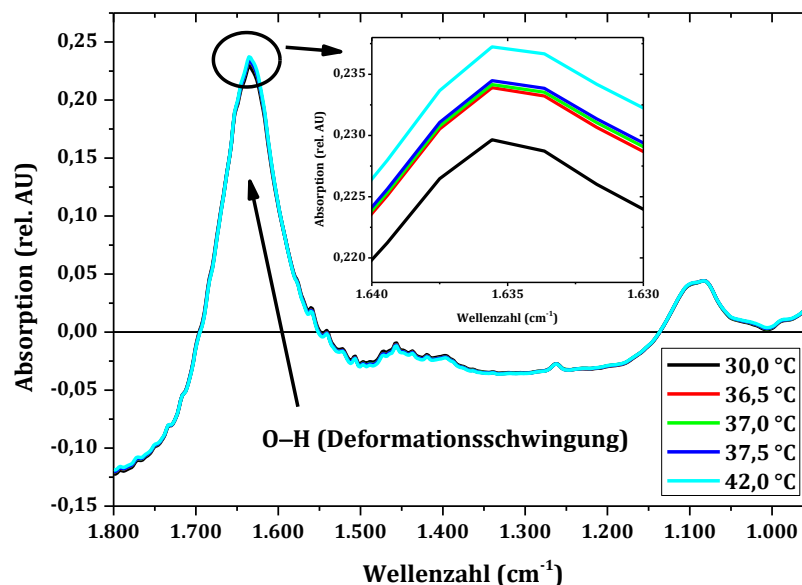


Abb. 4.2: Mittelwerte der MIR Absorptionsspektren (DT1, 1.800 – 950  $\text{cm}^{-1}$ ) für jede Temperaturstufe; der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Absorptionsbande bei  $1.635 \text{ cm}^{-1}$  und die Erhöhung der Absorptionsintensität in Abhängigkeit von der Temperatur.

Das Ergebnis der PCA lässt sich anhand der Spektren bestätigen. Dazu wurde für jede Temperaturstufe ein Mittelwertspektrum gebildet und gemeinsam aufgetragen (s. Abb. 4.2, S. 28). Die O-H-Bande ist vergrößert dargestellt und bestätigt die Abhängigkeit zwischen der Absorption und der Temperatur.

Mittels einer Korrelationsanalyse (s. Anhang 7.7.2, S. 113) lässt sich dieser Zusammenhang mathematisch zeigen. Aus den Scores-Werten der PC-1 und der Temperatur berechnet sich ein Korrelationskoeffizient  $\rho \approx 1$ . Das bedeutet, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den Scores der PC-1 und der Temperatur vorliegt. Die Loadings, welche den Einfluss der einzelnen Wellenzahlen auf jede PC wiedergeben, entsprechen für PC-1 einem Wasserspektrum. Weitere 0,44 % spektraler Varianz werden durch PC-2 beschrieben. Diese Varianz wird aufgrund der Loadings der PC-2 auf Messrauschen zurückgeführt.

Die MIR-Messung wird demnach primär durch die Temperatur der Probe beeinflusst. Temperaturdifferenzen von 0,5 K haben einen größeren Einfluss auf die Messung als die maximale Begasungsrate und Rührerdrehzahl. Um den Einfluss der beiden anderen Faktoren getrennt von der Temperatur zu betrachten, wurden für eine weitere PCA nur die Spektren bei konstanter Temperatur (37 °C) einbezogen (s. Abb. 4.3, S. 29).

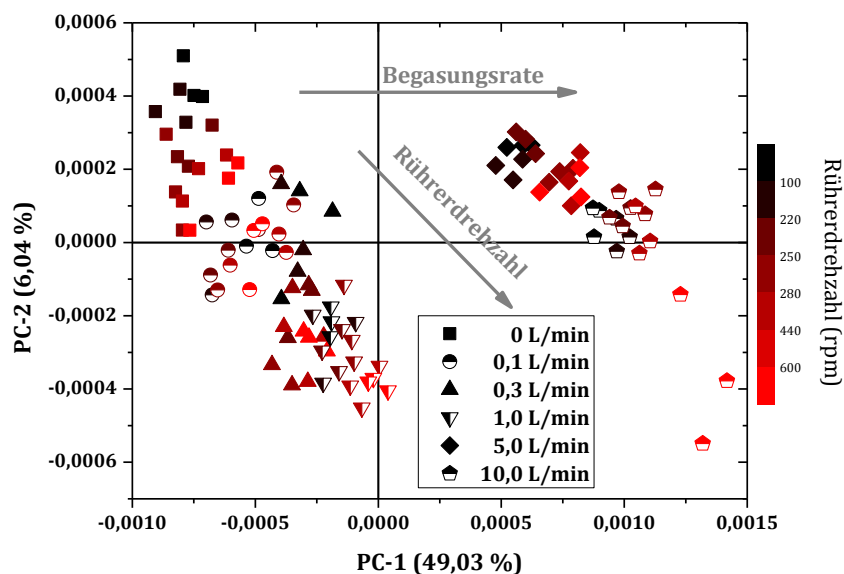


Abb. 4.3: PCA Scores (DT1, 1.800-950  $\text{cm}^{-1}$ ) der MIR-Spektren bei konstanter Temperatur.

Demnach hat die Begasungsrate in Relation zur Rührerdrehzahl einen größeren Einfluss auf die MIR-Messung und bestimmt maßgeblich die Varianz entlang PC-1. Mit einem  $\rho = 0,94$  deutet dies auf einen starken linearen Zusammenhang zwischen PC-1 und der Begasungsrate hin. Der Einfluss der Rührerdrehzahl lässt sich nicht eindeutig auf ein PC reduzieren, sondern tritt eher entlang der ersten beiden PCs auf. Die Ursache liegt vermutlich darin, dass bei höheren Rührerdrehzahlen Luftblasen stärker dispergiert und nach außen getrieben werden. Befinden sich Luftblasen innerhalb der Messzone, wird das MIR-Licht an den Luftblasen gestreut und die effektive Eindringtiefe verändert sich. Innerhalb einer Luftblase kommt  $\text{H}_2\text{O}$

gasförmig vor, was wiederum ein feines Rotationsspektrum erzeugt. Dies wird bestätigt durch die Loadings der PC-1.

Als Zwischenfazit bleibt festzuhalten, dass von den drei untersuchten Parametern die Temperatur den größten Einfluss auf MIR-Messung hat. Temperaturunterschiede von 0,5 K haben bereits eine signifikante Auswirkung auf das MIR Spektrum. In Relation zur Temperatur beeinflussen die Begasungsrate und Rührerdrehzahl die MIR-Messung kaum.

#### 4.1.2 NIR-Auswertung

Das Messprinzip des verwendeten NIR-Spektrometers beruht auf der Transflexion (s. Abb. 2.6, S. 10). Das Licht passiert den Messspalt und wird reflektiert. Die Weglänge von 10 mm ist im Vergleich zum MIR um den Faktor 10.000 größer. Gelangen Luftblasen oder Zellen in die Messzone, so wird das NIR-Licht an diesen gestreut. Infolgedessen ändert sich die effektive Weglänge des NIR-Lichtes durch die Probe und somit ändern sich auch die Absorptionsintensitäten. Dies macht sich im NIR-Spektrum als Verschiebung der Basislinie bemerkbar.

Durch die Vorverarbeitungsmethode SNV (*Standard Normal Variate*) werden die Effekte kompensiert (s. Kapitel 7.7.3, S. 113 ff.). In Abb. 4.4 (S. 30) sind NIR-Spektren ohne (A) und mit SNV (B) gezeigt. Die starke Absorption ab 1.400 nm ist, wie bereits in Kapitel 3.1.2 erwähnt, auf den großen Messspalt zurückzuführen. Ohne eine SNV variieren die Absorptionsintensitäten stark (Abb. 4.4 A). Wie in Abb. 4.4 B (S. 30) ersichtlich ist, verringert eine SNV die Varianzen zwischen den Spektren. Varianzen, die durch die Streuung überlagert wurden, werden so sichtbar.

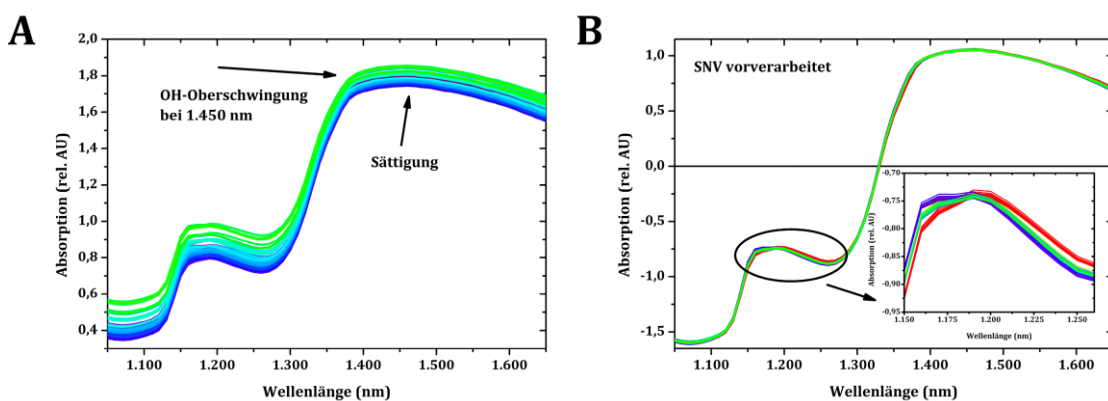


Abb. 4.4: Sämtliche NIR-Spektren ohne Datenvorverarbeitung (A) und SNV vorverarbeitet (B).

In Abb. 4.5 (S. 31) sind die Scores der PC-1 und PC-2 der kompletten Versuchsreihe dargestellt. Das Scores-Diagramm hat Ähnlichkeiten zu dem aus der MIR-

Auswertung (s. Abb. 4.1, S. 27). Mit etwa 90 % beschreibt PC-1 den Großteil der Varianz innerhalb der NIR-Spektren. Eine farbliche Gruppierung nach der Temperatur zeigt, dass die Temperatur für die Varianz der PC-1 mit einem  $\rho \approx 1$  verantwortlich ist. Weitere 7,7 % der Gesamtvarianz entfallen auf die PC 2 und diese korreliert negativ mit der Rührerdrehzahl ( $\rho = -0,58$ ). Die durch die 2. PC beschriebene Varianz wird daher nicht ausschließlich durch die unterschiedliche Rührerdrehzahl hervorgerufen, sondern ist eine Kombination aus den Effekten der Rührerdrehzahl und Begasungsrate. Dies wird bestätigt durch die abdriftenden Scores-Werte bei hohen Rührerdrehzahlen und Begasungsraten (eingekreist, Abb. 4.5).

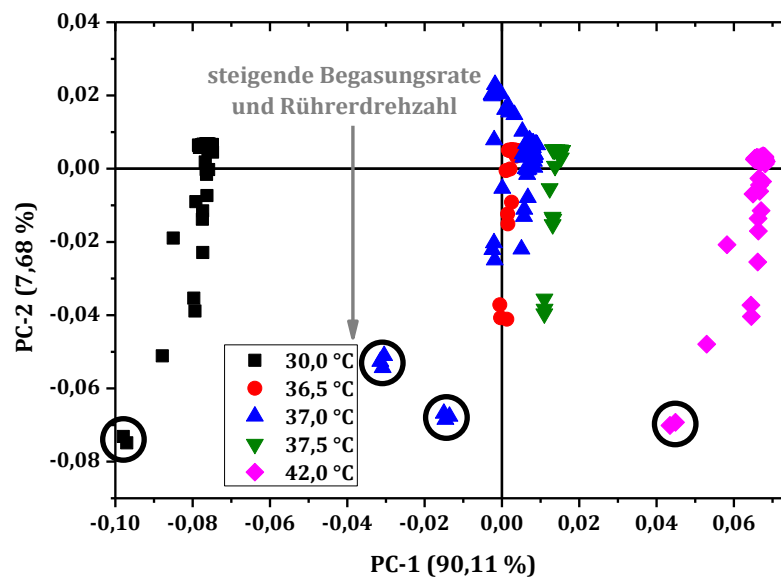


Abb. 4.5: PCA-Scores (SNV, 1050 - 1650 nm) aller NIR-Spektren, farblich gruppiert bezüglich der Temperatur; die Scores der bei maximaler Rührerdrehzahl und Begasungsrate aufgenommene Spektren sind eingekreist.

Eine getrennte Analyse der Einflüsse durch die Begasungsrate und Rührerdrehzahl ist durch die PCA bei konstanter Temperatur (37 °C) in Abb. 4.6 (S. 32) gezeigt. Die Verteilung der NIR-Scores unterscheidet sich deutlich von der der MIR-Scores. Die 1. PC erklärt etwa 69 % der Gesamtvarianz. Für die Varianz entlang PC-1 sind hauptsächlich die eingekreisten Scores verantwortlich. Dabei handelt es sich um Spektren, die bei hohen Begasungsraten und Rührerdrehzahlen aufgenommen wurden. Speziell die Kombination aus hoher Rührerdrehzahl (600 rpm) und hoher Begasungsrate (5,0 und 10 L/min) verursachen die beobachtete Varianz.

Die Zahl der Luftblasen und deren Größe wird durch beide Faktoren, der Drehzahl und der Begasungsrate, bestimmt. Die eingebrachte Leistung eines Rührers ist in der 3. Potenz abhängig von der Rührerdrehzahl [44]. Wird die Rührerdrehzahl erhöht, so werden Gasblasen feiner dispergiert. Durch die eingesetzte Rushton-

Turbine werden diese nach außen zu den Sonden befördert. Vermutlich können fein dispergierte Gasblasen eher in die Messzone des NIR eindringen, als große Gasblasen. Diese Erklärung wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei niedrigen Rührerdrehzahlen und variierender Begasungsrate die Scores dicht beieinander liegen (s. Abb. 4.6, S. 32).

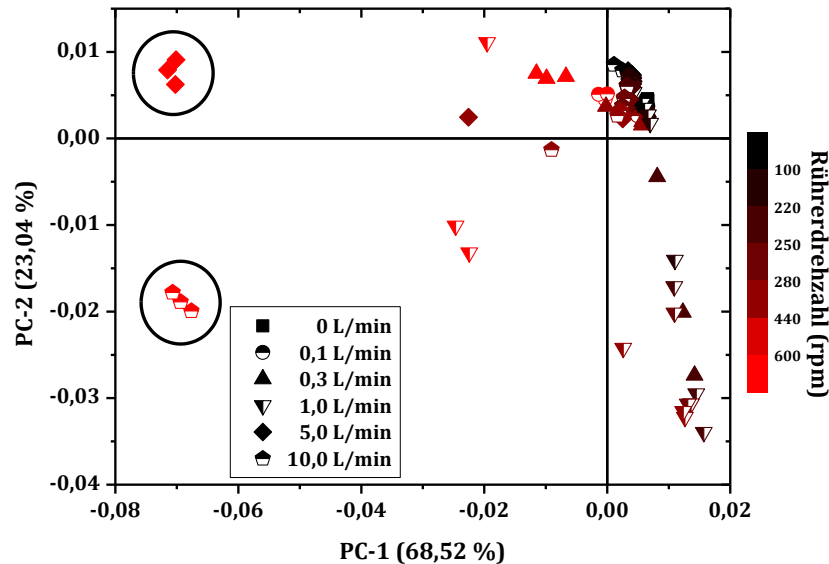


Abb. 4.6: PCA-Scores (SNV, 1050 - 1650 nm) der NIR-Spektren bei konstanter Temperatur (37 °C); Scores bei einer Kombination aus hoher Begasungsrate und Rührerdrehzahl sind eingekreist.

### 4.1.3 Zusammenfassung – äußere Einflüsse

Die Auswertung dieser Versuchsreihe gibt Aufschluss darüber, in welchem relativen Maße die einzelnen Reaktorparameter die jeweilige IRS-Messung beeinträchtigen. Als Ergebnis ist festzuhalten, dass die Temperatur den dominierenden Einfluss auf die MIRS hat. Etwa 99,4 % der Gesamtvarianz innerhalb der MIR-Spektren beruht auf Temperaturunterschiede zwischen den Messungen. Die Temperatur hat eine Auswirkung auf das Besetzungsverhältnis des Schwingungsgrundzustandes, den Brechungsindex, die Dichte der Probe sowie die Wasserstoffbrückenbindungen [45]. In Relation dazu beeinflussen die Rührerdrehzahl und Begasungsrate die MIR-Messung minimal. Dieser geringe Einfluss lässt sich anhand der kurzen Eindringtiefe des MIR-Lichtes in die Probe erklären. Insgesamt werden diese Ergebnisse durch die Literatur bestätigt. Maeda *et al.* haben gezeigt, dass die Temperatur einen direkten Einfluss auf die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen hat [46] und somit auch auf das IR-Spektrum. Doak *et al.* untersuchten den Einfluss der Begasungsrate und Rührerdrehzahl und kamen zu dem Schluss, dass diese beiden Einflussgrößen die MIRS nicht signifikant stören [16].

Anders als die MIR-Messung wird die NIR-Messung stark durch Streueffekte beeinflusst. Mit Hilfe entsprechender Vorverarbeitungsmethoden (SNV) wurden diese Einflüsse kompensiert. Tamburini *et al.* untersuchten ebenfalls die Einflüsse der Rührerdrehzahl und Begasungsrate auf die NIR-Messung und kamen zu einer ähnlichen Schlussfolgerung [47].

Von allen drei untersuchten Parametern hat die Begasungsrate den geringsten Einfluss auf beide IR-Messungen. In Hinblick auf eine CHO-Kultivierung und der Einhaltung eines konstanten  $pO_2$ , sollte daher nur die Begasungsrate und nicht die Rührerdrehzahl angepasst werden. Auf diese Weise werden zusätzliche Varianzen, die die quantitative Bestimmung mittels IRS beeinträchtigen können, vermieden.

## 4.2 LOD- und LOQ-Bestimmung der IRS für Glucose

Nachdem die Einflüsse der drei verschiedenen Reaktorparameter auf die IR-Messung untersucht wurden, stellt sich als nächstes die Frage ab welchen Mindestkonzentrationen die MIRS und NIRS verlässliche Vorhersagewerte liefern. Im Fokus steht die nahezu Echtzeitvorhersage der primären Kohlenstoffquelle Glucose. Aufbauend auf der Echtzeitvorhersage von Glucose kann zum Beispiel eine Regelungsteuerung für eine Zufütterung etabliert werden. Für beide IR-Methoden wurde jeweils ein PLS-Kalibrationsmodell erstellt und daraus der LOD (*Limit of Detection*) und LOQ (*Limit of Quantitation*) für Glucose bestimmt (s. Kapitel 2.3.3, S. 15).

### 4.2.1 Planung und Durchführung

Zur Bestimmung des LOD und LOQ wurde wasserfreie D-Glucose<sup>1</sup> in zehn verschiedenen Konzentrationsstufen, inklusive einer Blindprobe, angesetzt (s. Tabelle 4.2, S. 34). Es gilt zu beachten, dass sich in Lösung ein Gleichgewicht zwischen den Anomeren  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucose einstellt (Anhang 7.1.2, S. 90) [48]. Da beide Anomere sich in ihrem IR-Spektrum unterscheiden, darf die Messung erst nach Erreichen des Gleichgewichts erfolgen. Alle Glucose enthaltenden Standards werden daher 24 h vor der Messung angesetzt und bei 4 °C gelagert.

Glucosekonzentrationen < 2,5 g/L treten überproportional häufig auf, um bei niedrigen Konzentrationen eine höhere Datendichte und Genauigkeit zu erreichen. Jede Konzentrationsstufe (inkl. Blindprobe) wurde dreifach angesetzt und im BIOSTAT® Cplus spektroskopisch vermessen. Damit werden Varianzen, die durch das Einwiegen, Lösen und Überführen in den Reaktor entstehen, berücksichtigt. Insgesamt ergeben sich daraus 30 Lösungen, die in zufälliger Reihenfolge dreifach vermessen wurden.

---

<sup>1</sup> D-Glucose wird im Folgenden nur als Glucose bezeichnet.



Tabelle 4.2: Übersicht der einzelnen Konzentrationsstufen von Glucose.

Stufe	Glucose (g/L)	Stufe	Glucose (g/L)
1	0	6	1,0
2	0,1	7	2,5
3	0,25	8	5,0
4	0,5	9	7,5
5	0,75	10	10,0

Während dieser Versuchsreihe wurde ein weiter Prototyp des NIR-Spektrometers mit 1 mm Messspalt getestet. Am Bioreaktor können jedoch nur maximal zwei Spektrometer angeschlossen werden. Um beide NIR-Spektrometer (1 mm und 5 mm) direkt miteinander vergleichen zu können, wurde beim ersten Durchlauf beide NIR eingesetzt. In einem zweiten Durchlauf wurden alle Lösungen neu angesetzt und mit dem MIR bei gleichen Reaktorparametern vermessen (s. Anhang Tabelle 7.1 und Tabelle 7.2, S. 106).

#### 4.2.2 Auswertung und Ergebnisse – LOD/LOQ

Für die Berechnung des LOD und LOQ wurden für jede IR-Methode (MIR, 1 mm NIR und 5 mm NIR) eigene PLS Modelle erstellt. Die Modelle wurden aus den Spektren der dreifachen Messungen der 30 Standards und den dazu korrespondierenden Glucosekonzentrationen nach Einwaage generiert. Anhand der PLS-Modelle wurden die Konzentrationen der Blindproben vorhergesagt und daraus der LOD und LOQ berechnet.

Tabelle 4.3: Übersicht der Glucose PLS-Modelle; RMSEC = root mean square error of calibration; SG1-2-3 = Savitzky-Golay, 1. Ableitung, Glättung mit Polynom 2. Ordnung und Fensterbreite = 3; F = Anzahl Faktoren

Name	Bereich	RMSECV (g/L)	F	R <sup>2</sup>	Vorverarb.	Ausreißer Nr.
MIR	1200 – 950 cm <sup>-1</sup>	0,031	1	0,999	SG1-2-3	keine
NIR 1 mm	1050 – 1650 nm	0,370	2	0,994	SNV	01, 11

Auf Basis eines MIR-Referenzspektrums wird der Spektralbereich für Glucose zwischen 1.200 und 950 cm<sup>-1</sup> festgelegt. Das MIR-PLS-Modell erklärt mit einem Faktor den Zusammenhang zwischen den MIR-Spektren und der Glucosekonzentration. In Tabelle 4.3 (S. 34) sind die Ergebnisse des PLS-Modells zusammengefasst. Der mittlere Vorhersagefehler der Kreuzvalidierung (RMSECV) beträgt 0,031 g/L. Die Spektren lassen sich hinsichtlich der Glucosekonzentration entlang des 1. Faktors im Scoreplot gruppieren (s. Abb. 4.7, S. 35). Mit dem 1. Faktor beschreibt das PLS-Modell nahezu vollständig die Varianz innerhalb der Spektren (98,75 %), die durch die Veränderung der Glucosekonzentration hervorgerufen wird (99,99 %). Der 2. Faktor beschreibt weitere 0,165 % der spektralen Varianz,

welche auf das Messrauschen zurückgeführt werden kann. Der Mittelwert aus den Glucosevorhersagen der neun Blindprobenspektren und die dazugehörige Standardabweichung wurden zusammen mit den Regressionskoeffizienten in Gl. 2.12 und Gl. 2.13 (S. 16) eingesetzt (s. Tabelle 4.4, S. 35). Unter diesen optimalen Bedingungen errechnet sich für Glucose ein LOD  $< 0,02$  g/L und ein LOQ  $< 0,06$  g/L.

Tabelle 4.4: LOD und LOQ der beiden IR-Methoden für Glucose.

Name	LOD (g/L)	LOQ (g/L)
MIR	0,019	0,057
1 mm NIR	0,258	0,559

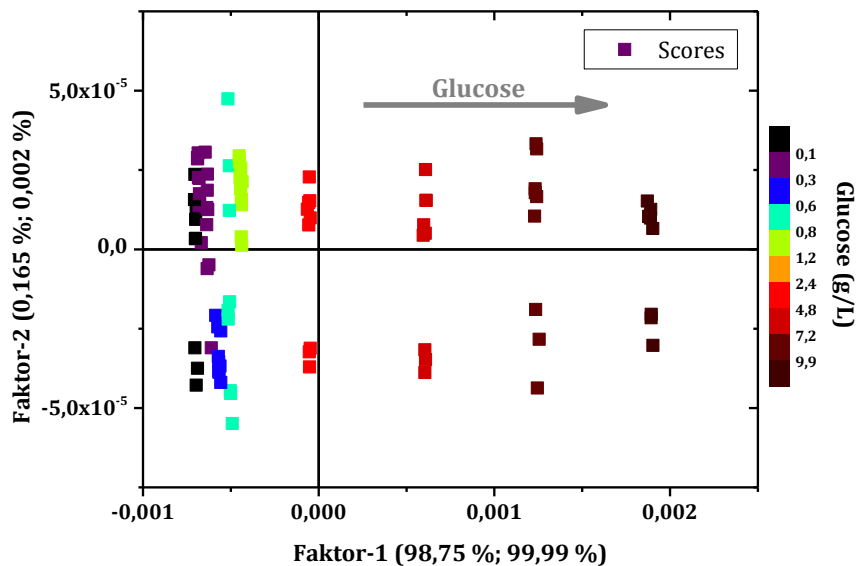


Abb. 4.7: Glucose-PLS-Scores für MIR.

Die PLS-Scores für das NIR mit 1 mm Messspalt sind in Abb. 4.8 (S. 36) dargestellt. Die Scores streuen entlang des 1. Faktors stärker als die entsprechenden MIR-Scores. Insbesondere bei niedrigen Glucosekonzentrationen ( $< 2,4$  g/L) streuen die Scores-Werte mehr entlang Faktor-1.

Der 1. Faktor der PLS beschreibt 70,64 % der spektralen Varianz und 95,03 % der Glucosevarianz. Mit dem 2. Faktor werden  $> 99$  % der Varianz von Glucose erklärt, weswegen für das Glucosemodell zwei Faktoren eingesetzt werden. Der RMSECV liegt unter 0,4 g/L für Glucose und ist damit um mehr als den Faktor zehn größer als beim MIR (s. Tabelle 4.3, S. 34). Das LOD und LOQ ist ebenfalls um etwa das Zehnfache größer als bei MIR (s. Tabelle 4.4, S. 35).

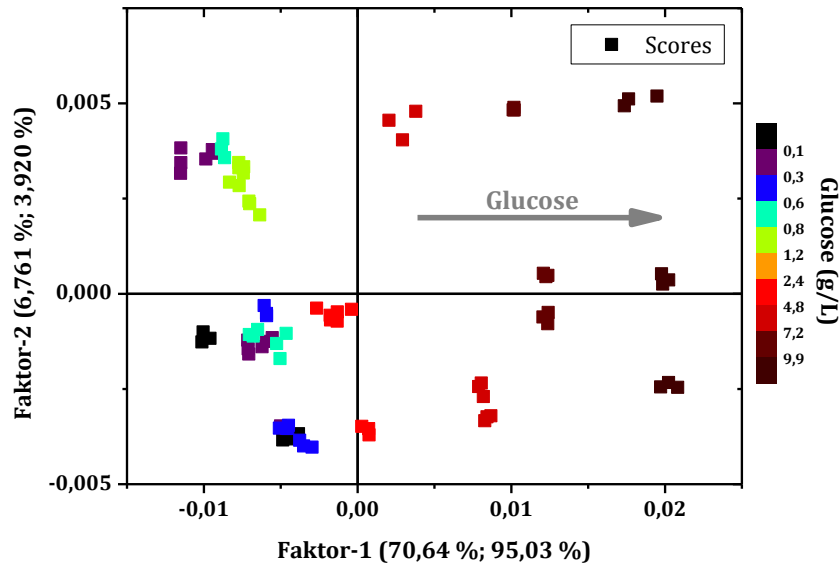


Abb. 4.8: Glucose-PLS-Scores für das 1 mm NIR.

Für das NIR Spektrometer mit 5 mm Messspalt konnte kein aussagekräftiges Kalibrationsmodell für Glucose erstellt werden (s. Anhang 7.2.1, S. 92). Deswegen wurde für das 5 mm NIR auch kein LOD und LOQ für Glucose berechnet.

### 4.2.3 Zusammenfassung – LOD und LOQ

Die Bestimmung des LOD und LOQ wurden unter optimalen Rahmenbedingungen durchgeführt. Für diese Versuchsreihe stand ein zusätzliches NIR mit einem 1 mm Messspalt zur Verfügung. Der Bioreaktor verfügt nur über zwei Ingold® Stützen, weshalb die MIR-Messungen separat durchgeführt wurden.

Von beiden NIR Spektrometern (1 mm und 5 mm) wurden lediglich die Ergebnisse der 1 mm Version dargestellt. Anhand der Ergebnisse wurde gezeigt, dass die MIRS sensitiver als die NIRS ist. Die Berechnungen des LOD und LOQ von Glucose hat für die MIRS einen Wert von 0,02 g/L bzw. 0,06 g/L ergeben. Im Falle der NIRS liegen die Werte für Glucose um ca. den Faktor 10 höher (LOD = 0,26 g/L; LOQ = 0,56 g/L).

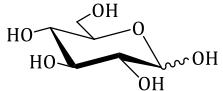
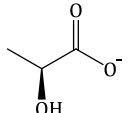
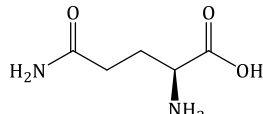
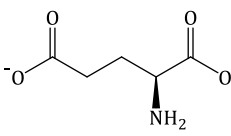
## 4.3 Kalibrationsmodelle aus synthetischen Standards

Der nächste Schritt bestand darin mehrere Analyten nebeneinander in Lösung zu messen. Dies entspricht dem späteren Einsatzgebieten, bei denen komplexe Kulturmedien verschiedene Analyten und Komponenten enthalten. Die Evaluierung soll zeigen, welche der Analyten mittels der MIRS und NIRS in den vorgegebenen Konzentrationsbereichen quantitativ erfasst werden können.

Zu diesem Zweck wurde ein Versuchsplan für die relevanten Analyten einer CHO-Kultivierung entwickelt. In Tabelle 4.5 (S. 37) sind die Analyten, ihre

Strukturformeln und die gewählten Konzentrationsbereiche angegeben. Die vorgegebenen Konzentrationsbereiche von Glucose und Lactat entsprechen in etwa denen einer CHO-Kultivierung. Im Gegensatz dazu liegen die Konzentrationen der Metabolite bei einer Kultivierung  $< 1$  g/L. Für die Versuchsreihe wurden die Konzentrationen nach oben hin erweitert, um eine Detektion mittels MIR sicherzustellen.

Tabelle 4.5: Übersicht der relevanten Analyten und deren Konzentrationsbereich.

Analyt	Formel	Bereich (g/L)
D-Glucose		0 – 10
L-Lactat		0 – 4
L-Glutamin		0 – 3
L-Glutamat		0 – 3
Ammonium	$\text{NH}_4^+$	0 – 3

Das Ziel des Versuchsplans ist es, die IR-Spektrometer zu evaluieren und die LODs und LOQs für die einzelnen Analyten neben Störgrößen zu bestimmen. Neben den fünf chemischen Komponenten wurden zusätzlich drei Reaktorparameter (Temperatur, Begasung und Rührerdrehzahl) in den Versuchsplan integriert. Die Auswertung soll zeigen, in welchem Maße die verschiedenen Reaktorparameter die Vorhersage der Analyten und somit auch die Messmethode stören.

### 4.3.1 Entwicklung des Versuchsplanes

Der PLS-Algorithmus maximiert die Korrelation zwischen den Spektren (X-Datenmatrix) und den Konzentrationen eines Analyten (Y-Datenmatrix). Absorbieren mehrere Analyten im selben Spektralbereich und korrelieren die Konzentrationen untereinander, vermag der Algorithmus nicht die Varianzen innerhalb der Spektren dem gesuchten Analyten zuzuordnen. Damit der PLS-Algorithmus selektiv einen Analyten im Spektrum identifizieren kann, müssen die Konzentrationen zwischen den verschiedenen Analyten so vorgegeben werden,

dass zwischen diesen keine Kollinearität vorliegt. Dies gilt auch für die Reaktorparameter.

Der Versuchsplan wurde so aufgestellt, dass alle Konzentrationsstufen der Analyten und Reaktorparameter nicht miteinander korrelieren. Erstellt wurde der Versuchsplan von Frau Dr. D. SOLLE mit Hilfe von Matlab (Version 7.10). Er beinhaltet 9 verschiedene Konzentrationsstufen für jeden der Analyten. Die Reaktorparameter wurden in drei Stufen variiert. Das hierzu entwickelte Skript ist im Anhang aufgeführt (s. Kapitel 7.4.2, S. 107 ff.).

Tabelle 4.6: Versuchsplan – DoE; grau hinterlegt sind die Standards bei 18 % und 75 % der Maximalkonzentration.

ID-Probe	Begasung (L/min)	Rührer (rpm)	Temperatur (°C)	Glucose (g/L)	Lactat (g/L)	Ammonium (g/L)	Glutamin (g/L)	Glutamat (g/L)
PBS-01	0	100	36	3,50	0,40	1,05	1,50	1,05
PBS-02	1	100	36	10,00	2,00	1,50	0,54	0,00
PBS-03	0	300	36	7,50	3,00	0,54	0,30	2,25
PBS-04	1	300	36	1,80	0,01	0,30	0,00	0,54
PBS-05	0	100	38	1,00	1,40	0,01	0,01	3,00
PBS-06	1	100	38	0,10	0,72	2,25	3,00	1,50
PBS-07	0	300	38	0,00	4,00	0,10	1,05	0,01
PBS-08	1	300	38	5,00	0,00	0,00	2,25	0,30
PBS-09	0,5	200	37	0,01	0,10	3,00	0,10	0,10
PBS-10	0	100	36	1,80	0,72	0,54	0,54	0,54
PBS-11	1	300	38	7,50	3,00	2,25	2,25	2,25
PBS-12	0	100	36	5,00	2,00	0,30	3,00	2,25
PBS-13	1	100	36	0,01	4,00	0,10	0,54	0,30
PBS-14	0	300	36	1,80	0,01	1,50	2,25	0,00
PBS-15	1	300	36	10,00	3,00	2,25	0,00	0,54
PBS-16	0	100	38	7,50	0,10	0,01	1,05	1,50
PBS-17	1	100	38	0,10	0,72	3,00	1,50	0,10
PBS-18	0	300	38	1,00	1,40	0,54	0,01	1,05
PBS-19	1	300	38	3,50	0,40	0,00	0,10	0,01
PBS-20	0,5	200	37	0,00	0,00	1,05	0,30	3,00
PBS-21	0	100	36	1,80	0,72	0,54	0,54	0,54
PBS-22	1	300	38	7,50	3,00	2,25	2,25	2,25
PBS-23	0	100	36	5,00	0,72	0,10	0,01	3,00
PBS-24	1	100	36	1,00	4,00	1,50	0,30	0,01
PBS-25	0	300	36	3,50	0,01	0,01	0,10	0,00
PBS-26	1	300	36	0,10	0,40	2,25	0,00	1,50
PBS-27	0	100	38	1,80	2,00	0,30	0,54	0,10
PBS-28	1	100	38	0,01	1,40	1,05	1,50	0,54
PBS-29	0	300	38	10,00	0,00	3,00	1,05	0,30
PBS-30	1	300	38	7,50	3,00	0,54	2,25	1,05
PBS-31	0,5	200	37	0,00	0,10	0,00	0,00	2,25
PBS-32	0	100	36	1,80	0,72	0,54	0,54	0,54
PBS-33	1	300	38	7,50	3,00	2,25	2,25	2,25

Die 9 verschiedenen Konzentrationsstufen sind alle drei Mal im Plan vertreten und decken den kompletten Konzentrationsbereich jedes Analyten ab. Niedrige Konzentrationen sind häufiger vertreten, um eine genauere Aussage zur Sensitivität bei niedrigen Konzentrationen treffen zu können. Ergänzt werden diese 27 Standards durch weitere 6 Standards. Drei davon enthalten je 18 % und die weiteren drei enthalten je 75 % der maximalen Konzentrationen der Analyten. Letztere entsprechen den Zentralversuchen eines klassischen Versuchsplans und dienen zur Bestimmung der reinen Versuchs- und Messvarianz. Von jedem der 33 Standards (s. Tabelle 4.6, S. 38) wurden je drei Spektren im BIostat® Cplus

aufgenommen. Eine ausführliche Versuchsvorschrift ist in Kapitel 7.4.2 (S. 107 ff.) dargelegt.

Die Temperaturregelung des Reaktors funktionierte während dieser Versuchsreihe nicht einwandfrei. Es wurden Temperaturschwankungen von etwa  $\pm 0,3$  K beobachtet. Erste Auswertungen zeigten sehr hohe Varianzen innerhalb der Spektren, die nicht auf die Konzentrationsänderungen der Analyten zurückzuführen waren, sondern durch die Temperatur und Rührerdrehzahl verursacht wurden. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1 (S. 26) zeigten, dass Temperaturänderungen sowohl die MIRS als auch die NIRS beeinflussen. Daraufhin wurden ab der Probe PBS-20 alle Standards zusätzlich bei 37 °C vermessen. In die Auswertung fließen daher insgesamt 45 Standards bzw. 135 Spektren je IR-Methode.

### 4.3.2 PBS-Standards – MIR-Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte in zwei Schritten. Der erste Schritt beinhaltet eine rein qualitative Auswertung der Spektren mittels PCA. Im zweiten Schritt werden für jeden Analyten bzw. Reaktorparameter PLS-Modelle erstellt und analysiert.

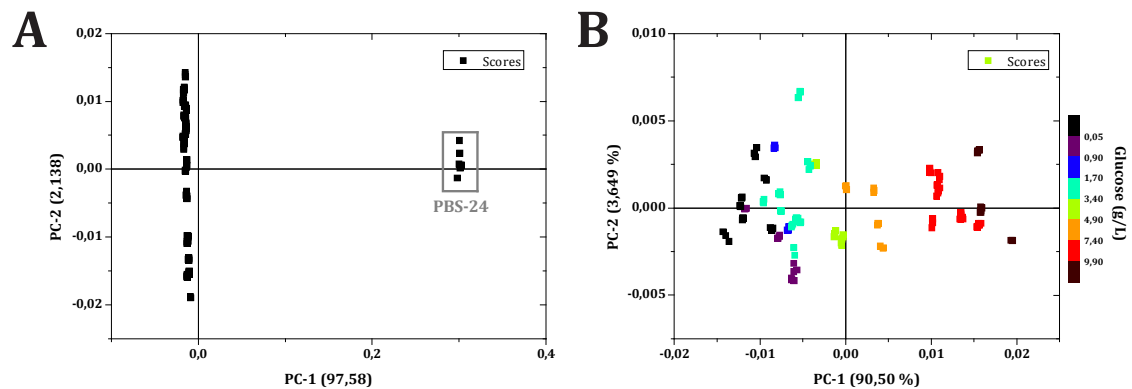


Abb. 4.9: PCA-Scores über sämtliche PBS-Standards (A) und ohne PBS-24 (B); Vorverarbeitung DT1 für den Wellenzahlbereich zwischen 1200 – 950  $\text{cm}^{-1}$ .

Das Diagramm der PCA-Scores für den Wellenzahlbereich zwischen 1.200 – 950  $\text{cm}^{-1}$  für vorverarbeitete Spektren (DT1) ist in Abb. 4.9 A gezeigt. Die erste Hauptkomponente beschreibt über 97 % der Gesamtvarianz innerhalb der Spektren. Diese Varianz wird durch die Probe PBS-24 hervorgerufen, dessen Spektren deutlich höhere Absorptionsintensitäten haben. Da die Ursache nicht im Zusammenhang mit den Analytkonzentrationen oder Reaktorparameter steht, wird PBS-24 als spektraler Ausreißer klassifiziert und für die weiteren Auswertungen nicht verwendet.

In einer weiteren PCA ohne Probe PBS-24 beschreibt PC-1 etwa 90 % der Gesamtvarianz (Abb. 4.9 B). Diese Varianz wird durch die unterschiedlichen Konzentrationen von Glucose hervorgerufen. Die Scores jeder Dreifachmessung

liegen im Diagramm dicht zusammen, was auf eine geringe Messvarianz zurückzuführen ist. Die Verteilung korreliert nicht mit den Reaktorparametern und somit haben diese keinen signifikanten Einfluss auf die MIRS.

Im Vorfeld wurde von jedem Analyten ein Reinspektrum aufgenommen anhand dessen der Spektralbereich für die PCA und PLS festgelegt wird. (s. Anhang 7.2.2, S. 93). Durch Vergleichen der Loadings mit den Reinspektren der Analyten kann nachgewiesen werden, ob ein Analyt durch ein Kalibrationsmodell beschrieben wird oder nicht.

Im Verlauf der Auswertung wurden verschiedene Vorverarbeitungsmethoden getestet, um für jeden Analyten bzw. Reaktorparameter das jeweils beste PLS-Modell zu ermitteln. Die PLS-Modelle sollen mit möglichst wenigen Faktoren einen geringen Vorhersagefehler der Kreuzvalidierung (RMSECV) sowie LOD und LOQ ergeben.

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem DoE-Plan – MIR.

Analyt/ Parameter	Vorverarbeitung	Wellenzahlbereich (cm <sup>-1</sup> )	Faktoren	LOD (g/L)	LOQ (g/L)	R <sup>2</sup>	RMSECV
Glucose	DT1	1.200–950	3	0,149	0,473	0,993	0,415 g/L
Lactat	SG1-2-3	1.200–950	4	0,215	0,709	0,981	0,249 g/L
Glutamin	-	1.750–1200	10	1,106	3,556	0,966	0,246 g/L
Glutamat	DT2	1.750–1200	9	0,697	2,255	0,985	0,169 g/L
Ammonium	-	1.800–1300	3	0,220	0,690	0,978	0,214 g/L
Temperatur	DT1	1.800–950	9	-	-	0,922	0,319 °C
Begasung	-	1.800–950	3	-	-	0,352	0,465 L/min
Rührerdrehzahl	-	1.800–950	3	-	-	0,550	82,23 rpm

SG1-2-3: 1. Ableitung bei einer Fensterbreite von 3 inklusive Savitzky-Golay-Glättung mit einem Polynom 2. Ordnung

In Tabelle 4.7 sind alle Kalibrationsmodelle und die Ergebnisse für die Analyten und Reaktorparameter zusammengefasst. Der mittlere Vorhersagefehler (RMSECV) der Kreuzvalidierung liegt für alle Analyten bis auf Glucose um 0,2 g/L. Dabei bezieht sich der RMSECV immer auf die tatsächliche gravimetrische Einwaage der Analyten. Die LODs und LOQs von Glucose, Lactat und Ammonium haben in etwa die gleiche Größenordnung, wohingegen diese für Glutamin und Glutamat deutlich höher liegen. Von den drei Reaktorparametern kann nur für die Temperatur ein valides PLS-Modell erstellt werden.

#### Glucose:

Mit einem LOQ = 0,473 g/L für Glucose ist dieser um etwa das 10-fache höher als bei der entsprechenden Bestimmung aus einer reinen Glucoselösung (s. Kapitel 4.2). Eine Auftragung der Referenzwerte (Einwaage) gegen die Vorhersage aus der Kreuzvalidierung zeigt, dass die Vorhersagewerte leicht streuen (s. Abb. 4.10 A). Ab Probe PBS-20 wurden zusätzliche Spektren bei 37 °C aufgenommen. Die Vorhersagewerte derselben Proben bei anderer Temperatur unterscheiden sich kaum. Temperaturdifferenzen von 1 K haben demnach keinen signifikanten Einfluss

auf die Vorhersagegenauigkeit. In Abb. 4.10 A ist neben der Winkelhalbierenden, die die ideale Regressionsgerade darstellt, auch die Regressions- oder Kalibrationsgerade des Modells eingezeichnet. Die Abweichung der Kalibrationsgerade von der Winkelhalbierenden ist gering.

Um festzustellen, welche Wellenzahlen bzw. Wellenlängen einen großen Einfluss auf das PLS-Modell haben, wird der multivariate Regressionskoeffizient untersucht. Der multivariate Regressionskoeffizient (Reg.-Koeff.) gleicht zum großen Teil dem Referenzspektrum von Glucose. Dies wird durch das PLS-Loading des 1. Faktors bestätigt, was nahezu identisch zum Referenzspektrum ist. Die Banden bei 991, 1.035 und 1.080  $\text{cm}^{-1}$  entsprechen der C–O-Valenzschwingung der Hydroxylgruppe in Glucose [45].

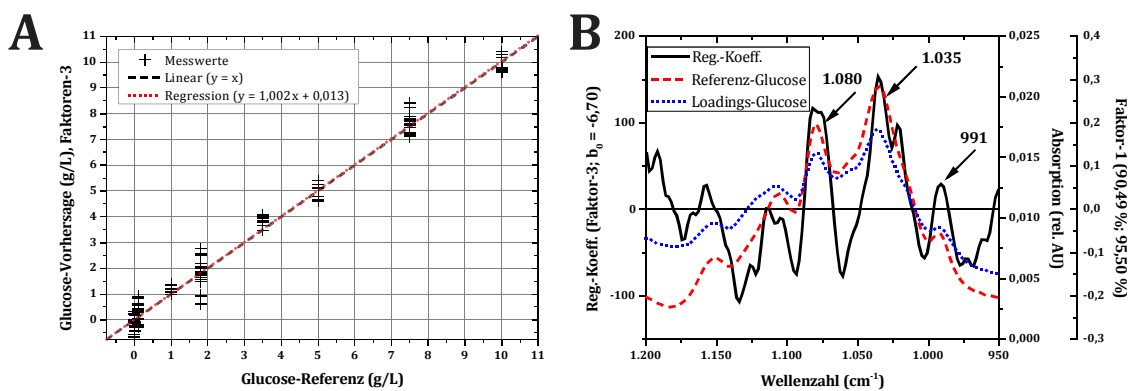


Abb. 4.10: Glucose – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.-Koeff, Loadings und dem Reinspektrum von Glucose (B).

### Lactat:

Die Auswertung für Lactat ergibt einen etwas höheren LOQ als für Glucose. Die Vorhersage aus der Kreuzvalidierung streut bei niedrigen Konzentrationen etwas stärker (s. Abb. 4.11 A). Der Vergleich der Reg.-Koeff. mit dem Referenzspektrum von Lactat zeigt, dass ausschließlich Lactat durch das Modell beschrieben wird (Abb. 4.11 B). Die C–O Valenzschwingung der Alkoholgruppe von Lactat resultiert in den Banden bei 1.123 und 1.040  $\text{cm}^{-1}$  [45]. Wegen der Interferenzen durch Wasserdampf<sup>1</sup> ab etwa 1.200  $\text{cm}^{-1}$  wurde die Bande der Carbonyl-Valenzschwingung bei 1.574  $\text{cm}^{-1}$  nicht in das Modell miteinbezogen.

<sup>1</sup> Im Rahmen dieser Versuche wurde anstelle der  $\text{N}_2$ -Spülung eine Trockenpatrone eingesetzt.



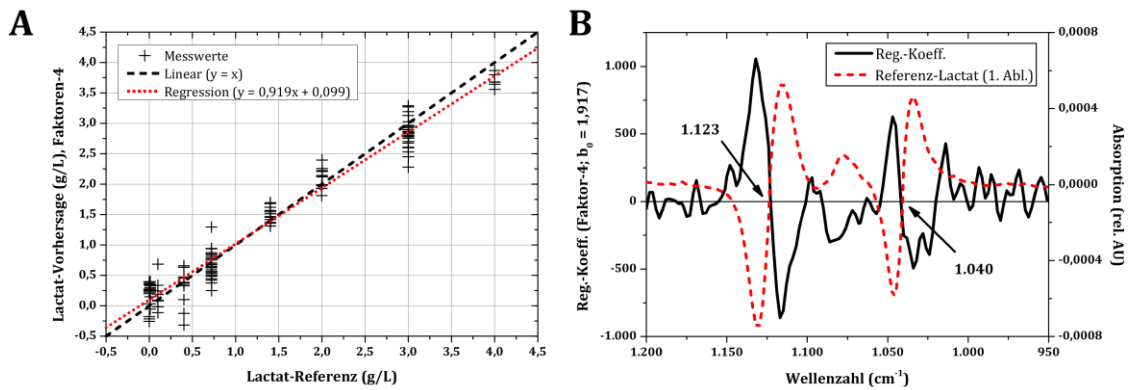


Abb. 4.11: Lactat – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.-Koeff. und Lactat-Referenzspektrum (B).

### Glutamin/Glutamat:

Glutamin und Glutamat absorbieren vorwiegend im Bereich zwischen 1.300 bis 1.700  $\text{cm}^{-1}$  (s. Abb. 7.5, S. 93). Dieser Bereich wird durch den Wasserdampf im Messgerät stark beeinflusst und weist hierdurch starke Varianzen auf. Zum anderen überlagern sich die Absorptionsbanden von Glutamin und Glutamat im MIR-Spektrum. Beides führt dazu, dass die Selektivität für beide Analyten geringer ist. Für Glutamin werden 10 und für Glutamat 9 Faktoren benötigt.

Trotzdem werden für beide Analyten Vorhersagefehler unter 0,3 g/L erreicht. Die LODs und LOQs sind in beiden Fällen deutlich höher als bei Glucose und Lactat. Das LOQ von Glutamin liegt bei 3,5 g/L und das LOQ von Glutamat bei 2,25 g/L. Die Ursache lässt sich anhand der Reg.-Koeff. erklären. Der Reg.-Koeff. von Glutamin unterscheidet sich deutlich vom dazugehörigen Referenzspektrum (Abb. 4.12 A).

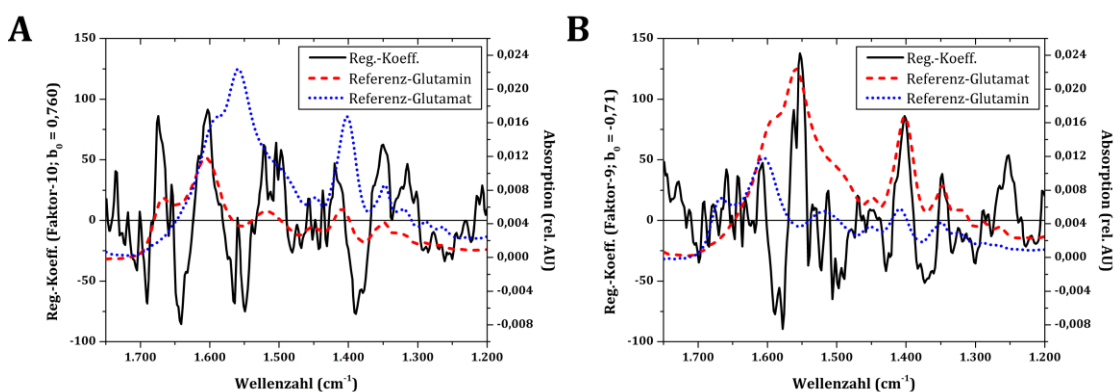


Abb. 4.12: Vergleich zwischen Reg.-Koeff. von Glutamin und den Spektren von Glutamin und Glutamat (A); Vergleich zwischen Reg.-Koeff von Glutamat und den Spektren von Glutamat und Glutamin (B).

Nur die Banden bei 1.603 und 1.350  $\text{cm}^{-1}$  stimmen mit der Referenz überein. Hierbei handelt es sich um die  $\text{NH}_3^+$  Deformationsschwingung der Aminosäuregruppe sowie der symmetrischen Valenzschwingung des Carboxy-

Anions [45]. Einige der übrigen Banden können auf Glutamat ( $1.558\text{ cm}^{-1}$ ) und Lactat ( $1.575\text{ cm}^{-1}$ ) zurückgeführt werden. Die restlichen Banden können keinem der anderen Analyten zugewiesen werden. Deren starker Einfluss auf das Modell sorgt wahrscheinlich für den hohen LOD und LOQ.

Im Fall des Glutamats stimmt der Reg.-Koeff. des PLS-Modells besser mit dem Referenzspektrum von Glutamat überein (Abb. 4.12 B). Die Banden bei  $1.555$ ,  $1.400$  und  $1.350\text{ cm}^{-1}$  werden vom Modell gut erfasst.

### Ammonium:

Das Modell für Ammonium benötigt 3 Faktoren. Der RMSECV beträgt etwa  $0,2\text{ g/L}$  und die Streuung der Vorhersage ist gering (s. Abb. 4.13 A). Bemerkenswert ist die sehr gute Übereinstimmung des Reg.-Koeff. mit dem Referenzspektrum von Ammonium. Nur die beiden charakteristischen Banden bei  $1.450$  und  $1.625\text{ cm}^{-1}$  fließen in das Modell ein (s. Abb. 4.13 B). Obwohl in diesem Spektralbereich Varianzen der Wasserdampfbanden auftreten, so werden diese vom Modell sehr gut kompensiert.

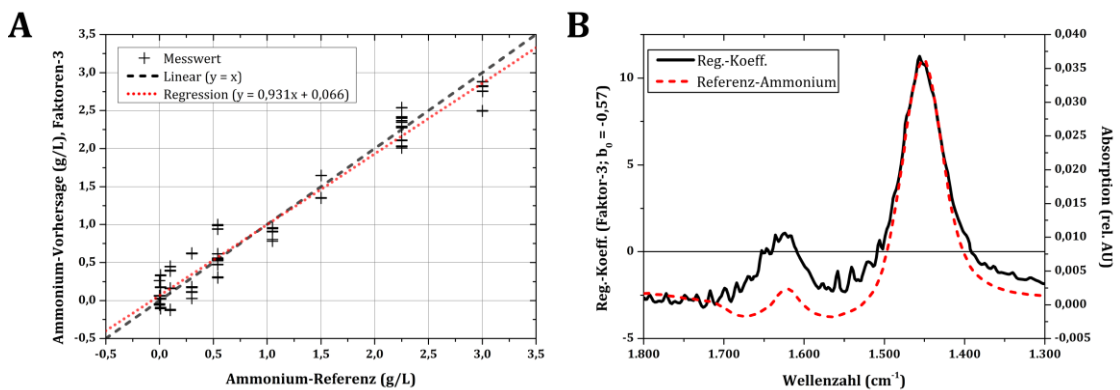


Abb. 4.13: Ammonium – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.-Koeff. und Ammonium-Referenzspektrum (B).

### Temperatur/Begasung/Rührerdrehzahl:

Die Voruntersuchungen aus Kapitel 4.1 (S. 26 ff.) haben ergeben, dass von den drei Reaktorparametern nur die Temperatur die MIR-Messung im BIOSTAT® Cplus beeinflusst. Begasungsrate und Rührerdrehzahl haben hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Messung.

### Zusammenfassung:

Die LOQs für Glucose, Lactat und Ammonium liegen alle unter  $0,8\text{ g/L}$ . Vergleiche der Referenzspektren mit den Reg.-Koeff. zeigen, dass diese drei Analyten spezifisch vorhergesagt werden können. Aufgrund störender Varianzen durch Wasserdampfbanden wird die Vorhersage von Glutamin und Glutamat erschwert.

Der RMSECV liegt in beiden Fällen unter 0,25 g/L, wohingegen die LOQ Werte über 2 g/L liegen.

Es ist keine signifikante Beeinträchtigung der MIRS-Messung durch die Reaktorparameter zu beobachten. Die Vorhersagen der Standards, die zusätzlich bei 37 °C gemessen wurden, weichen nicht von den Vorhersagen bei 36 oder 38 °C ab. Hinsichtlich der Reaktorparameter kann nur für die Temperatur ein valides Modell erstellt werden. Bei konstanten Reaktorparametern und einer Spülung des Spektrometers mit N<sub>2</sub> sind niedrigere LODs und LOQs für sämtliche Analyten zu erwarten.

### 4.3.3 PBS-Standards – NIR-Auswertung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der NIR-Auswertung bezüglich der PBS-Standards vorgestellt. Von den fünf untersuchten Analyten konnte nur für Ammonium ein valides PLS-Modell erstellt werden. Die Ergebnisse bestätigen zudem die in Kapitel 4.1.2 (S. 30 ff.) gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der signifikanten Einflüsse der Temperatur und Rührerdrehzahl auf die NIR-Messung. Die Scores der PCA zeigen eine Korrelation zwischen der Rührerdrehzahl und PC-1 (s. Abb. 4.14 A und B). Ob mit oder ohne SNV-Vorverarbeitung, in beiden Fällen lassen sich die Spektren im Score-Diagramm entlang PC-1 nach der Rührerdrehzahl unterscheiden. Die beiden anderen Reaktorparameter haben keinen Einfluss auf die Scores der ersten beiden PCs.

Ohne eine Datenvorverarbeitung können die Spektren im Score-Diagramm nach dem Zeitpunkt der Messung unterschieden werden. Wie in Abb. 4.14 A dargestellt, lassen sich die Score-Werte hinsichtlich PC-2 in zwei Gruppen aufteilen. Markiert wurden die Proben, die an den letzten zwei Tagen dieser Versuchsreihe gemessen wurden (PBS-20 bis PBS-33).

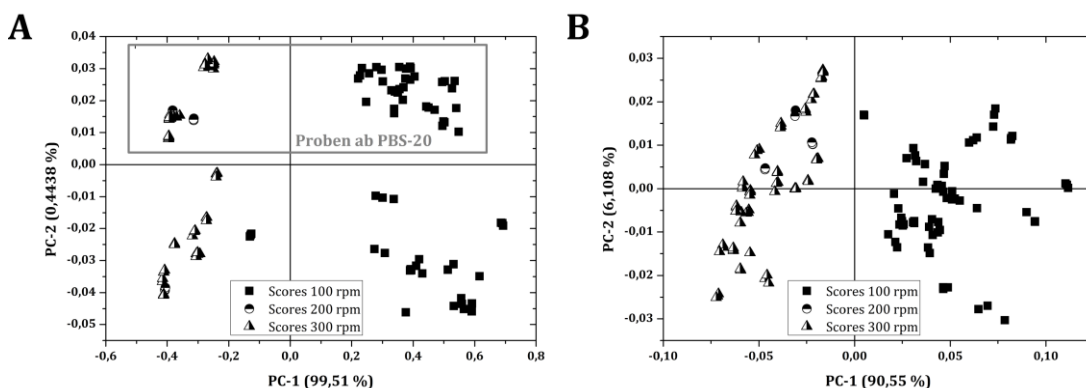


Abb. 4.14: PCA-Scores aller NIR-Spektren ohne (A) und mit SNV (B).

Eine SNV entfernt die Interferenzen innerhalb der Spektren, die durch Streulichteffekte hervorgerufen werden, indem jedes Spektrum zentriert und

skaliert wird. Die Varianzen innerhalb der SNV-vorverarbeitenden NIR-Spektren werden durch die Rührerdrehzahl verursacht.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den PLS-Modellen ist in Tabelle 4.8 gegeben. Von den fünf Analyten konnte nur für Ammonium ein valides Modell erstellt werden. Als repräsentatives Beispiel ist die Auswertung für Glucose im Anhang (s. 7.2.4, S. 95) aufgeführt. Da die Temperatur und Rührerdrehzahl einen signifikanten Einfluss auf die NIR-Messung haben, lassen sich für beide Reaktorparameter gute Modelle erstellen. Für den Parameter Begasung lässt sich hingegen kein valides Modell erstellen.

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem DoE-Plan – NIR.

Analyt/ Parameter	Vorverarbeitung	Faktoren	LOD (g/L)	LOQ (g/L)	R <sup>2</sup>	RMSECV
Glucose	–	3	3,457*	6,604*	0,463	3,027 g/L
Lactat	SNV	2	1,951*	3,449*	–0,006	1,388 g/L
Glutamin	SNV	4	1,090*	2,588*	0,523	0,811 g/L
Glutamat	–	3	0,725*	0,949*	0,238	1,004 g/L
Ammonium	SNV	6	1,254	3,949	0,866	0,505 g/L
Temperatur	SNV	6	–	–	0,961	0,225 °C
Begasung	–	6	–	–	0,453	0,457 L/min
Rührerdrehzahl	–	3	–	–	0,930	35,60 rpm

\*: Keine validen PLS-Modelle – LOD und LOQ sind nicht aussagekräftig.

### Ammonium:

Von den insgesamt fünf Analyten konnte nur für Ammonium ein valides PLS-Modell erstellt und damit ein aussagekräftiger LOD bzw. LOQ berechnet werden. Die Vorhersage aus der Kreuzvalidierung streut teilweise stark (Abb. 4.15 A), aber mit einem RMSECV von 0,5 g/L bei 6 PLS-Faktoren ist der Vorhersagefehler gering. Die Streuung in der Vorhersage ist unabhängig von der Temperatur oder Rührerdrehzahl.

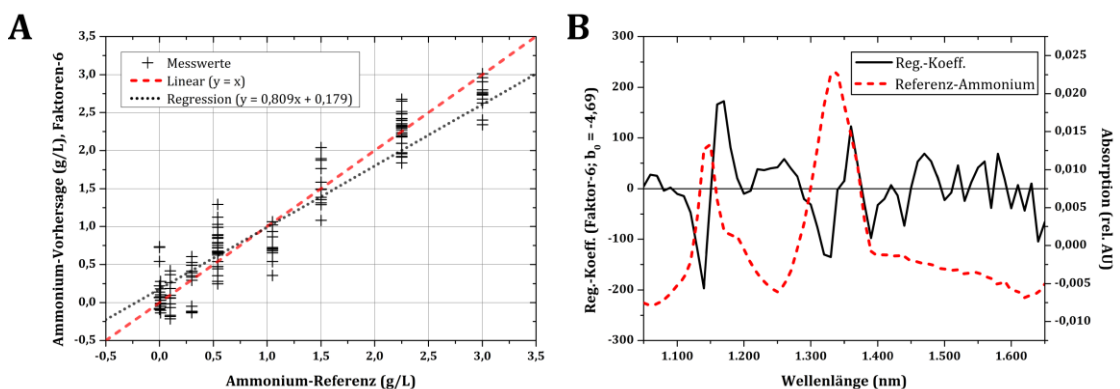


Abb. 4.15: Ammonium – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Vergleich zwischen PLS-Reg.Koeff und Ammonium-Referenzspektrum (B).

Der Reg.-Koeff. zeigt einen starken Einfluss bei 1.140, 1.160 und 1.320 bis 1.360 nm. Bei diesen Wellenlängen absorbiert auch die Referenz (Abb. 4.15 B). In der Literatur

wird eine starke Bande von Ammonium bei 1.534 nm angegeben, diese ist jedoch weder im Referenzspektrum noch beim Reg.-Koeff. zu beobachten [40]. Ein wahrscheinlicher Grund dafür ist der breite Messspalt und die damit zusammenhängende Sättigung der Absorption durch Wasser oberhalb von ca. 1.400 nm.

### Reaktorparameter:

Von den drei Reaktorparametern kann für die Temperatur und Rührerdrehzahl ein valides PLS-Modell erstellt werden. Dies bestätigt die Erkenntnisse der qualitativen Auswertung in Kapitel 4.1.2 (S. 30 ff.).

Die berechneten Vorhersagen der Temperatur und Rührerdrehzahl sind in Abb. 4.16 A und B dargestellt und zeigen eine deutliche Streuung der Vorhersagewerte. Die Abweichung der Kalibrationsgeraden von der idealen Regressionslinie ist in beiden Fällen gering. Anders verhält es sich mit der Begasungsrate. Das  $R^2$  liegt unter 0,5 und die Vorhersagewerte weichen stark von den Referenzwerten ab (s. Abb. 4.16 C). In der Kreuzvalidierung beschreibt das Modell mit 6 PLS-Faktoren etwa 20 % der Varianz.

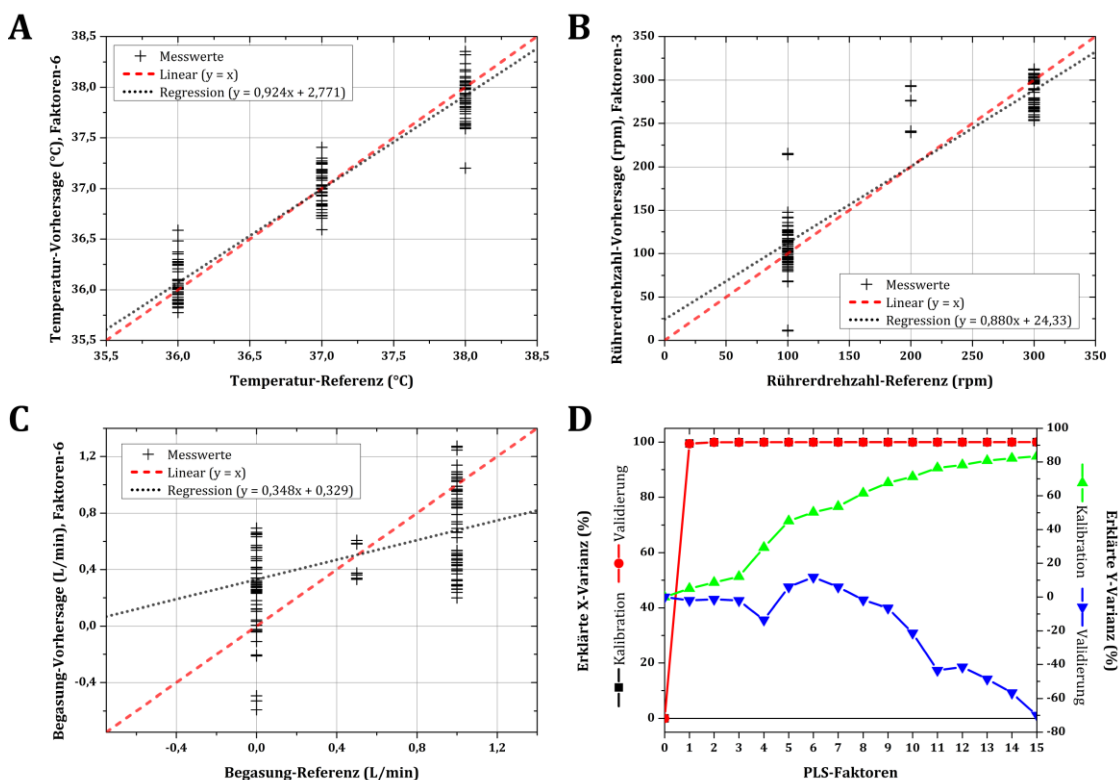


Abb. 4.16: Vorhersage aus der Kreuzvalidierung aufgetragen gegen die Referenz für die Temperatur (A), Rührerdrehzahl (B) und Begasung (C); beschriebene Varianzen der Spektren und der Begasung in Abhängigkeit von den eingesetzten PLS-Faktoren (D).

**Zusammenfassung:**

Bis auf Ammonium konnte für keinen der Analyten ein valides PLS-Modell erstellt werden. Die Ergebnisse dieser Versuchsauswertung bestätigen den starken Einfluss der Temperatur und Rührerdrehzahl auf die quantitative Vorhersage chemischer Komponenten.

In Hinblick auf eine robuste und valide Vorhersage der Analyten während der CHO-Kultivierungen sollte die Temperatur und Rührerdrehzahl konstant gehalten werden. Die Änderung dieser Parameter im Versuchsplan hat vermutlich dazu geführt, dass keine aussagekräftigen Modelle für die restlichen Analyten erstellt werden konnten. Die Regelung des  $pO_2$ -Wertes sollte daher über die Begasungsrate und nicht über die Rührerdrehzahl erfolgen.

## 5 CHO-Kultivierung und PLS-Vorhersage

Im vorherigen Kapitel wurden die Spektrometer, deren Ankopplung am Bioreaktor und das Messverfahren vorgestellt. Anschließend wurde der Einfluss der drei Reaktorparameter auf die IR-Messung qualitativ untersucht. Anhand eines Versuchsplanes wurden die Detektionsgrenzen (LOD und LOQ) der jeweiligen IR-Methode für die fünf relevanten Analyten bestimmt.

In diesem Kapitel wird der Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit beschrieben. Beide IR-Methoden werden hinsichtlich der Echtzeitüberwachung von CHO-Kultivierung evaluiert und untersucht. Im Mittelpunkt steht die Frage, welche der Analyten und Zellparameter mittels der beiden IR-Methoden verlässlich vorhergesagt werden können.

Als Basis für die Evaluierung der IRS dienen acht CHO-Kultivierungen im BIOSTAT® Cplus. Im ersten Teil dieses Kapitels werden die Ergebnisse der CHO-Kultivierungen anhand der Messwerte der Referenzanalytik vorgestellt. Insbesondere werden die Unterschiede zwischen den batch und fed-batch Kultivierungen aufgezeigt.

Im Anschluss daran werden die Auswertungen der PCA und PLS für die MIRS und NIRS erläutert und kritisch diskutiert. Dies beinhaltet die Erstellung und Validierung der PLS Modelle für die jeweiligen Analyten und Zellparameter. Basierend auf diesen Ergebnissen werden die Möglichkeiten und Grenzen der MIRS und NIRS zur inline Überwachung von CHO-Kultivierungen vorgestellt. Des Weiteren werden die Vor- und Nachteile der jeweiligen IR-Methode aufgezählt und bewertet.

### 5.1 CHO-Kultivierung im Bioreaktor

In diesem Unterkapitel werden die Verläufe der CHO-Kultivierungen im Bioreaktor bezogen auf die Messwerte der Referenzanalytik beschrieben. Die Kultivierungen wurden so geplant und durchgeführt, dass sie untereinander eine möglichst geringe Varianz aufweisen. Ausgenommen davon sind die Kultivierungen, bei denen gezielt Varianzen durch Zufütterung (Spiking-Experimente) oder durch Optimieren der Begasungsstrategie herbeigeführt wurden.

Die Spiking-Experimente dienen dazu, Korrelationen zwischen einzelnen Analyten zu durchbrechen und gleichzeitig die Robustheit der Kalibrationsmodelle zu überprüfen. Angelehnt an industrielle CHO-Kultivierung, sollen die Kultivierungen

am Institut für Technische Chemie ähnlich hohe Anforderung bezüglich der Reproduzierbarkeit erfüllen.

Für sämtliche Kultivierungen wurde die Zelllinie CHO-K1-HP (AG Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld) verwendet und in dem für diese Zellen speziell adaptieren Medium TC-42 (Teutocell AG, Bielefeld) kultiviert.

### 5.1.1 Übersicht der Kultivierungen

Die Evaluierung der IRS zur inline Überwachung von CHO-Kultivierungen beruht auf den Daten von acht CHO-Kultivierungen<sup>1</sup> im BIOSTAT® Cplus. Davon wurden drei (K02, K04 und K05) als reine batch Kultivierungen betrieben. Bei den restlichen fünf Kultivierungen (K06 – K10) handelt es sich um Spiking-Experimente, bei denen immer Glucose und bei K07 zusätzlich Glutamin als Feed hinzugegeben wurde (s. Tabelle 5.1). Der Bioprozess wurde mindestens so lange fortgeführt bis die Viabilität, das Verhältnis aus der Gesamt- und Lebendzellkonzentration (GZK und LZK), 70 % unterschritt. Dabei wurden GZKs zwischen  $14,4$  und  $18,6 \cdot 10^6$  Zellen/mL erreicht.

Die in diesem Kapitel dargestellten Messwerte der Analyten und Zellvariablen wurden durch Referenzanalysemethoden bestimmt (s. Anhang 7.6, S. 110 ff.). Mindestens alle 6 h wurde eine Probe für die Referenzanalytik entnommen. Die Referenzwerte werden mit dem dazugehörigen MIR- und NIR-Spektrum zur die Kalibration und Validierung verwendet (ab S. 60 ff.)

Tabelle 5.1: Übersicht zu den einzelnen Kultivierungen, der maximalen Gesamtzellkonzentration (GZK), Kultivierungsdauer und Bemerkungen.

Kultivierung	max. GZK ( $10^6$ Zellen/mL)	Dauer (h)	batch/ fed-batch	Bemerkungen
K02	15,8	142,7	batch	keine
K04	14,4	120,3	batch	keine
K05	15,8	136,2	batch	keine
K06	16,3	121,3	fed-batch	Glucosezugabe nach 94 h in 4 Stufen
K07	18,6	118,8	fed-batch	nach 62 h Glutamin auf ca. 1 g/L; nach 94 h Glucose zw. 1 und 1,5 g/L
K08	17,5	166,6	fed-batch	nach 80 h Glucose zw. 1 und 2 g/L
K09	17,0	235,4	fed-batch	nach ca. 89 h Glucose um 1 g/L gehalten
K10	18,0	234,5	fed-batch	nach ca. 75 h Glucose zw. 2 und 4 g/L

<sup>1</sup> Alle Arbeiten, die direkt mit der CHO-Kultivierung verbunden sind, wurden in Zusammenarbeit mit M. Sc. Sophia Bonk und M. Sc. Ferdinand Rüdinger durchgeführt. Im Einzelnen zählen hierzu die Vor- und Hauptkulturen, Probenahme und Referenzanalytik.



### 5.1.2 Beispiel – batch Kultivierung

Als Beispiel für eine der drei batch Kultivierungen sind die Konzentrationsverläufe der Analyten sowie der Zellkonzentration und Viabilität gezeigt (s. Abb. 5.1, S. 50). Als primäre Substrate für den Zellstoffwechsel dienen die beiden Kohlenstoffquellen (C-Quellen) Glucose und Glutamin. Von beiden C-Quellen ist Glutamin nach ca. 77 h als erste verbraucht. Nach ca. 98 h ist Glucose konsumiert (s. Abb. 5.1). Dem exponentiellen Verbrauch der C-Quellen steht das exponentielle Zellwachstum gegenüber. Beide Substrate werden im Citratzyklus metabolisiert und sind für das Zellwachstum essentiell [49], [50]. Sobald Glucose verbraucht ist, nimmt die Viabilität deutlich ab (s. Abb. 5.1). Die GZK nimmt ab diesem Zeitpunkt weiterhin zu, die LZK und Viabilität nehmen ab.

Durch die Metabolisierung beider C-Quellen bildet sich Lactat. Dies wird von Zellen ins Medium abgegeben und reichert sich während der exponentiellen Wachstumsphase an [51]. Dabei korreliert die Konzentration von Lactat negativ mit denen von Glucose und Glutamin. Die max. Konzentration von Lactat wird einige Stunden vor dem vollständigen Verbrauch der Glucose beobachtet. Sobald Glucose verbraucht ist, wird Lactat als alternative C-Quelle genutzt und abgebaut. Ab diesem Zeitpunkt (ca. 96 h) steigt die GZK weiter an, gleichzeitig nimmt die Viabilität stark ab.

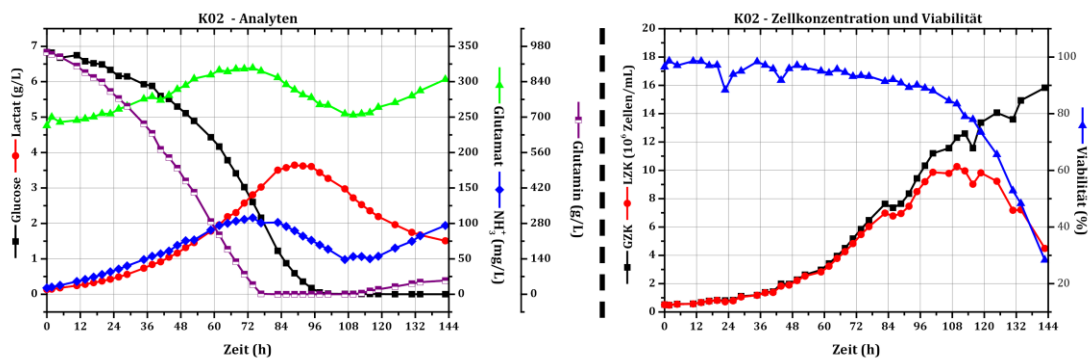


Abb. 5.1: Konzentrationsverläufe der Analyten für K02 (links); Zellwachstum und Viabilität für K02 (rechts).

Neben Lactat wird Ammonium ( $\text{NH}_3^+$ ) als weiterer Metabolit gebildet. Ammonium ist ein Stoffwechselprodukt der Glutaminolyse [49] sowie ein Abbauprodukt bei der thermischen Zersetzung von Glutamin [52]. Die max. Konzentration von Ammonium (100 mg/L) wird nach ca. 74 h beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wird Glutamin verbraucht. Als dritter Metabolit wird Glutamat untersucht. Glutamat ist ebenso wie Ammonium ein Zwischenprodukt der Glutaminolyse [49], weshalb die max. Konzentration nach ca. 74 h erreicht wird (s. Abb. 5.1).

Nach etwa 108 h ist eine Konzentrationszunahme der Metabolite zu erkennen (s. Abb. 5.1). Ab diesem Zeitpunkt sinkt gleichzeitig die Viabilität der Zellen rapide ab.

Die Viabilität wird über die Trypanblau-Methode bestimmt. Eine zellhaltige Probe wird mit Trypanblau gefärbt, welches durch die geschädigte Zellwand in tote Zellen eindringt und diese einfärbt (s. Anhang 7.6.1, S. 111). Durch die defekte Zellwand können auch die im Cytoplasma der CHO-Zellen befindlichen Metabolite in das Kulturmedium diffundieren und mit Hilfe der Referenzanalytik detektiert werden. Dieser Zusammenhang würde den Konzentrationsanstieg der Metabolite gegen Ende der Kultivierungen erklären.

### 5.1.3 Beispiel – fed-batch Kultivierung

Von den acht CHO-Kultivierungen wurde bei fünf eine hoch konzentrierte Glucose-Lösung (300 g/L) zugegeben. Damit sollen die Korrelationen zwischen den einzelnen Analyten durchbrochen werden (s. Kapitel 3.2.2, S. 24). Zusätzlich zu der Glucose-Lösung wurde bei K07 Glutamin (100 mM) zugegeben, um anhand dessen die Robustheit des Kalibrationsmodells für Glutamin zu testen.

Als repräsentatives Beispiel ist K06 gezeigt, bei der nach Verbrauch beider C-Quellen Glucose zugefüttert wurde. Nach ca. 94 h war die Glucose konsumiert und wurde in insgesamt vier Schritten auf eine Endkonzentration von 9 g/L aufgestockt (s. Abb. 5.2 links). Die Zugabe der Glucose-Lösung hat verschiedene Auswirkungen auf die Kultivierung. Sobald Glucose wieder verfügbar ist, wird kein weiteres Lactat mehr abgebaut, sondern erneut durch die Glykolyse produziert. Das Fehlen von Glutamin und anderen Aminosäuren wirkt sich limitierend auf das Zellwachstum aus. Durch die Glucose-Zufütterung setzt eine stationäre Phase bei gleichzeitiger sinkender Viabilität ein (s. Abb. 5.2 rechts).

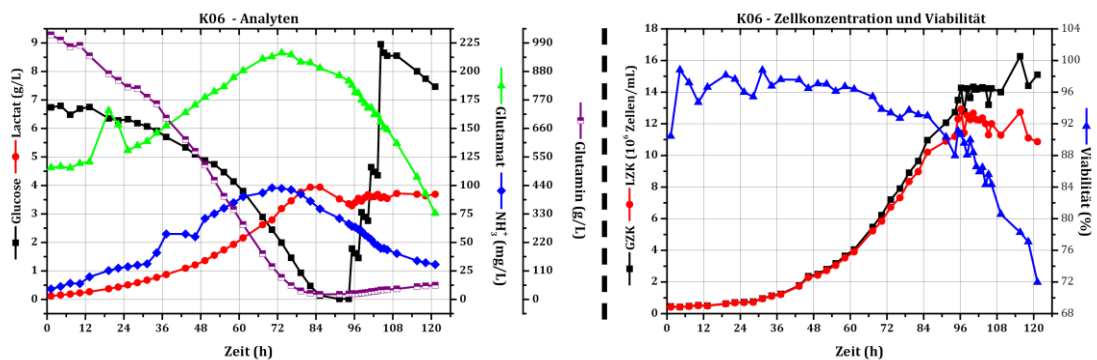


Abb. 5.2: Kultivierung inkl. Glucose-Zufütterung; Konzentrationsverläufe der Analyten für K06 (links); Zellwachstum und Viabilität für K06 (rechts).

### 5.1.4 Übersicht aller Kultivierungen

In den folgenden drei Abbildungen sind die Konzentrationsverläufe von Glucose und Ammonium sowie der Verlauf der LZK zusammengefasst. Daran können Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungen gezeigt werden.

Angefangen bei einer Startkonzentration von ca. 6,7 g/L ist der Verlauf von Glucose bis zur einer Kultivierungsdauer von 72 h homogen (s. Abb. 5.3). Dies lässt auf eine hohe Reproduzierbarkeit des gesamten Prozesses schließen. Nach 72 h wurden bei fünf Kultivierungen (K06 bis K10) Spiking-Experimente durchgeführt, weswegen im Anschluss die Verläufe differieren. Bei K06 wurde erst nach dem Verbrauch von Glucose zugefüttert, weshalb die K06 bis zu diesem Zeitpunkt noch als batch Kultivierung betrachtet werden kann. Für die Kultivierungen K02 bis K06 zeigt sich übereinstimmend, dass Glucose nach ca. 96 h konsumiert wurde.

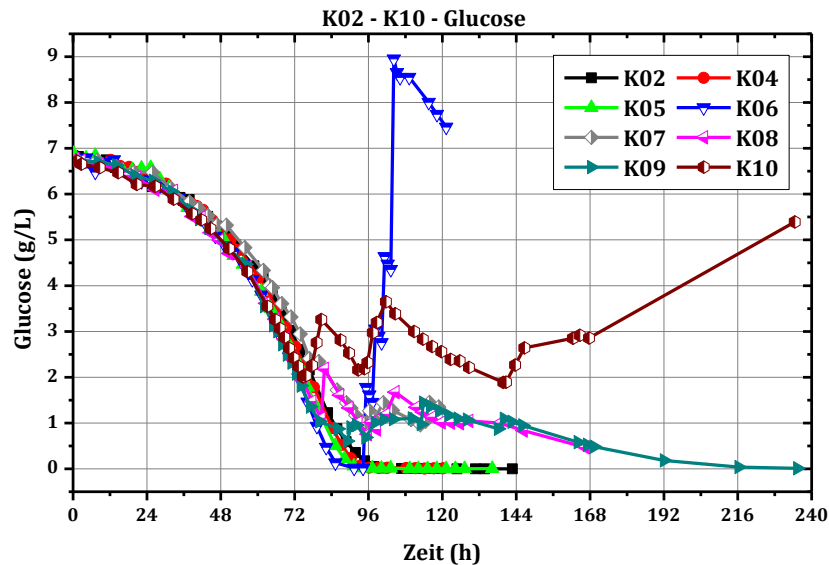


Abb. 5.3: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Glucose für alle Kultivierungen.

Während der exponentiellen Wachstumsphase stieg die Begasungsrate entsprechend an, was zu einer starken Schaumbildung beitrug. Um den Volumenstrom zu begrenzen wurde mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch begast. Bei den Kultivierungen K02-K05 wurde der Sauerstoffanteil im Gasgemisch um jeweils 10 % erhöht, sobald die Begasungsrate einen Wert von 0,5 L/min überschritten hatte. Ab K06 wurde der Sauerstoffanteil bereits nach Erreichen eines Volumenstroms von 0,3 L/min um 10 % erhöht. Durch die optimierte Begasungsstrategie werden die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase weniger gestresst. Somit wird Glucose bei K06 ca. 5 h früher als bei den vorherigen Kultivierungen konsumiert (s. Abb. 5.3 K06).

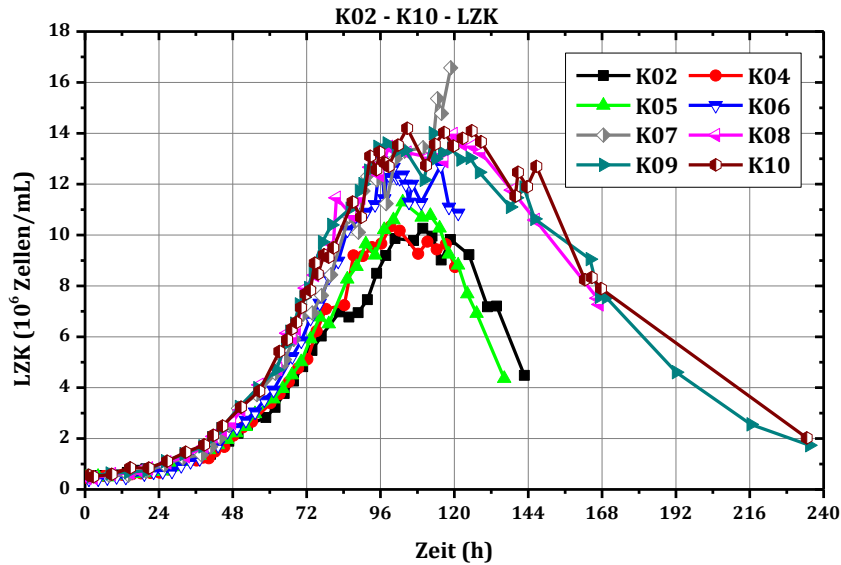


Abb. 5.4: Übersicht des Zuwachses der LZK für alle Kultivierungen.

Die Verläufe der LZK bestätigen die Auswirkungen der Begasungsoptimierung auf die Kultivierung. Für K02, K04 und K05 nimmt die LZK langsamer zu und erreicht bei K05 max.  $11,3 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Bei den restlichen Kultivierungen (K06 bis K10) werden höhere LZK und ein schnelleres Zellwachstum beobachtet.

Als letztes Beispiel wird der Konzentrationsverlauf von Ammonium vorgestellt. Das erste Maximum der Ammonium-Konzentration wird für alle Kultivierungen, bis auf K07, nach ca. 72 h beobachtet. Die Kultivierung K07 stellt ein Sonderfall dar, da hier neben Glucose zusätzlich Glutamin zur Kultivierung gegeben wurde. Der Anstieg der Ammonium-Konzentration (140 mg/L) lässt sich durch die Zugabe von Glutamin zurückführen, da Ammonium als Nebenprodukt der Glutaminolyse gebildet wird.

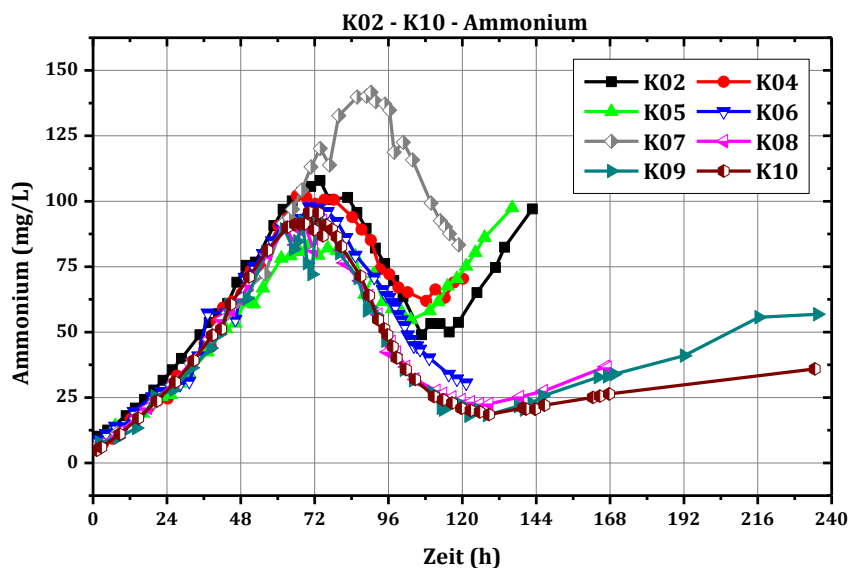


Abb. 5.5: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Ammonium für alle Kultivierungen.

Die Konzentrationsverläufe der übrigen Analyten und Zellvariablen sind im Anhang dargestellt (s. Kapitel 7.3.1, S. 96 ff.)

### 5.1.5 Zusammenfassung – CHO-Kultivierung

Am Beispiel der Konzentrationsverläufe von Glucose konnte für die batch Kultivierungen eine gute Reproduzierbarkeit gezeigt werden. Eine gute Reproduzierbarkeit ist notwendig, um eine solide Datengrundlage für die Kalibration zu gewährleisten. Andererseits werden durch die Spiking-Experimente gezielt Varianzen eingebracht, wodurch die Erstellung robuster Kalibrationsmodelle ermöglicht wird bzw. auch die Robustheit der Modelle getestet wird.

## 5.2 Qualitative Untersuchung der IR-Spektren

In diesem Kapitel werden die MIR- und NIR-Spektren qualitativ untersucht. Eine qualitative Untersuchung beinhaltet zum einen eine Inspektion der IR-Spektren sowie eine PCA der spektralen Daten. Die PCA untersucht die spektralen Daten hinsichtlich ihrer maximalen Varianz. Anhand der Scores können die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Spektren hinsichtlich der einzelnen Kultivierungen untersucht werden.

### 5.2.1 PCA – MIR

In der MIRS können die beiden Gase  $\text{H}_2\text{O}$  (g) und  $\text{CO}_2$  das eigentliche MIR-Spektrum stark überlagern (s. Abb. 5.6 K02). Dabei handelt es sich um feine Rotationsbanden, hervorgerufen durch die beiden Gase, die innerhalb des Spektrometers vorkommen. Wird direkt vor einer Probenmessung ein Hintergrundspektrum aufgenommen (s. Kapitel 3.1.1, S. 19) werden die Eigenabsorptionen von  $\text{H}_2\text{O}$  (g) und  $\text{CO}_2$  eliminiert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Spektrometer mit einem nicht IR-aktiven Gas ( $\text{N}_2$ ) zu spülen.

Eine Spülung des Spektrometers mit ( $\text{N}_2$ ) wurde erst ab Kultivierung K06 etabliert. Ein direkter Vergleich eines MIR-Spektrums ohne (K0201) und mit (K1001) Spülung zeigt die Unterschiede im MIR-Spektrum (s. Abb. 5.6). Ohne  $\text{N}_2$ -Spülung werden Schwingungen, die ab ca.  $1.300\text{ cm}^{-1}$  absorbieren, durch die Rotationsbanden von  $\text{H}_2\text{O}$  (g) überlagert. Interessant für die Auswertung ist der Bereich zwischen  $1.800$  und  $950\text{ cm}^{-1}$ , in dem Carbonyl-, Carboxyl- und Aminosäuregruppen absorbieren.

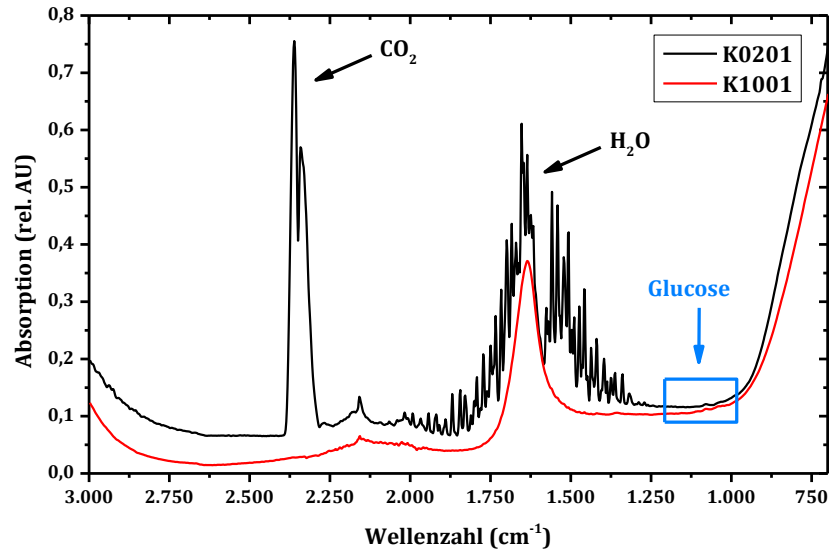


Abb. 5.6: MIR-Spektren (KDV) für K02 und K10

Um eine PCA auf die Spektren sämtlicher CHO-Kultivierungen (K02 bis K10) anwenden zu können, wurde der Spektralbereich zwischen  $1200$  und  $950\text{ cm}^{-1}$  gewählt, da in diesem Bereich keine Rotationsbanden von  $\text{H}_2\text{O}$  (g) auftreten. Dieser Spektralbereich ist essentiell für die Kalibration von Glucose und Lactat, da hier die C–O-Schwingungen liegen.

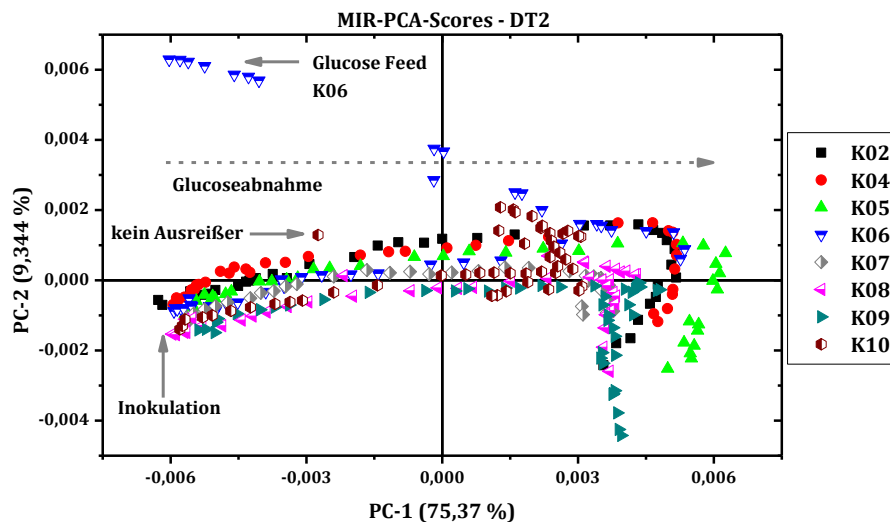


Abb. 5.7: MIR-PCA-Scores der Spektren der Kultivierungen K02 bis K10 (DT2,  $1200 - 950\text{ cm}^{-1}$ ).

Im Scores-Diagramm sind die einzelnen Werte nach den Kultivierungen gruppiert, um Varianzen zwischen den Kultivierungen zu erkennen. Zum Zeitpunkt der Inokulation liegen die Score-Werte aller Kultivierungen dicht beieinander (s. Abb. 5.7). Die 1. PC beschreibt ca. 75 % der Gesamtvarianz innerhalb der Spektren (s. Abb. 5.7). Anhand der Loadings der 1. und 2. PC (s. Abb. 7.14, S. 99) lassen sich die

Informationen auf Glucose und Lactat zurückführen. Nach der Inokulation nimmt die Konzentration von Glucose entlang der 1. PC ab. Bei K06 wurde nach dem Verbrauch von Glucose, weitere Glucose schrittweise hinzugegeben. Der erneute Anstieg der Konzentration von Glucose ist im Scores-Diagramm eindeutig zu erkennen (s. Abb. 5.7). Ebenso stellt der letzte Scores-Wert von K10 keinen Ausreißer dar, sondern ist bedingt durch den Glucose-Feed gegen Ende von K10 (vgl. Abb. 5.3, S. 52).

Am Schluss der Kultivierungen nimmt die Streuung der Scores-Werte entlang der 2. PC zu. Dies liegt vermutlich am Informationsgehalt der 2. PC, die vorwiegend die Lactat-Konzentration wiedergibt. Die Bildung und Abnahme von Lactat hängt bei den fed-batch Kultivierungen von der Zugabe der Glucose ab.

### 5.2.2 PCA – NIR

In Kapitel 2.2.3 wurden die verschiedenen Messprinzipien der NIRS vorgestellt. Die in dieser Arbeit aufgezeichneten Spektren beruhen auf dem Prinzip der Transflexion. Aufgrund dessen und einer deutlich größeren Weglänge im Vergleich zur ATR-Messtechnik müssen Streueffekte bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Streueffekte können genutzt werden, um die Partikelgröße und Partikelanzahl zu bestimmen. Die NIR-Spektren von K02 sind in Abb. 5.8 dargestellt. Im Zuge der Kultivierung nimmt die Zellzahl zu, was zu einer Zunahme der Absorption führt. Um die Zellzahl mittels der NIR vorherzusagen, sollten keine SNV verwendet werden. Im NIR-Spektrum sind die beiden Obertöne der O–H-Schwingung (ca. 1.175 und 1.450 nm) gezeigt. Bei einer Absorption von 2,0 bedeutet dies, dass nur etwa 1 % der eingestrahlten Strahlung auf den Detektor trifft.

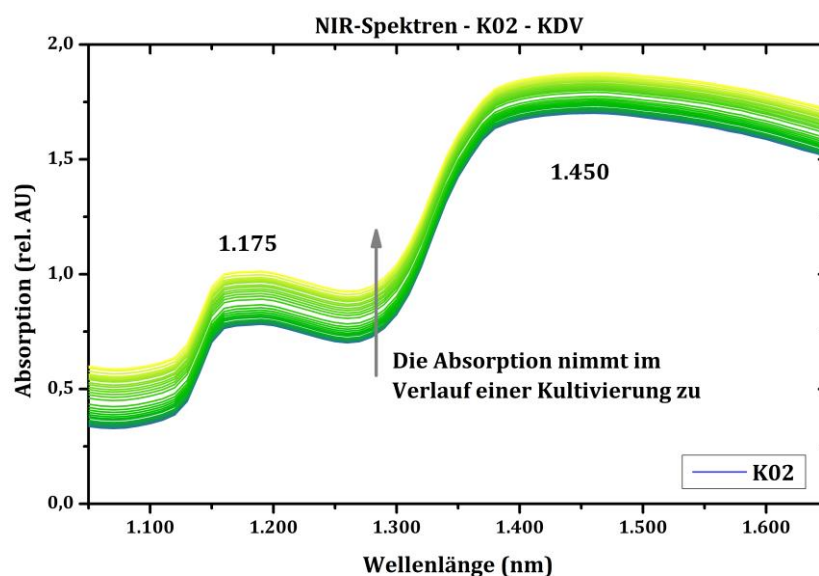


Abb. 5.8: NIR-Spektren von K02 ohne Datenvorverarbeitung; Wasserabsorptionsbanden bei 1.175 sowie 1.450 nm.

In diesem Teil des Spektrums ist von einer Totalabsorption von Wasser auszugehen. Das Score-Diagramm der PCA ist in Abb. 5.9 abgebildet. Diese Auswertung beinhaltet alle aufgenommenen NIR-Spektren aller Kultivierungen. Zum Zeitpunkt der Inokulation liegen die Score-Werte aller Kultivierungen nah beieinander. Markiert wurden spektrale Ausreißer, deren Score-Werte der 2. PC deutlich von dem restlichen Verlauf der Kultivierung abweichen. Spektrale Ausreißer können durch Luftblasen, die in die Messzone gelangen, erklärt werden.

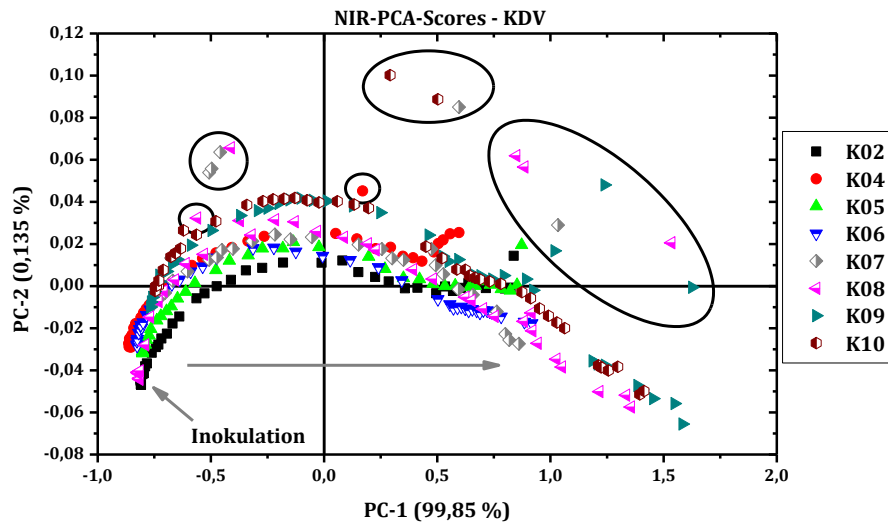


Abb. 5.9: NIR-PCA-Scores der Spektren der Kultivierungen K02 bis K10; markiert sind spektrale Ausreißer.

In einer weiteren PCA wurden die in Abb. 5.9 markierten Ausreißer entfernt. In Tabelle 5.2 sind die Ausreißer aufgeführt. Die Scores der zweiten PCA ohne die aufgeführten Ausreißer sind in Abb. 5.10 dargestellt. Die 1. PC beschreibt mit 99,88 % nahezu vollständig die spektrale Varianz. Ursache für die Varianz innerhalb der 1. PC ist ein Versatz der Basislinie, was durch die Zunahme der Zellzahl bedingt ist. Das Loading der 1. PC bestätigt dieses Hypothese (s. Abb. 7.15, S. 99). Das Loading der 1. PC ist über den gesamten Wellenlängenbereich positiv und beschreibt den Drift der Basislinie bei Zunahme der Zellzahl.

Tabelle 5.2: Ausreißer nach NIR-PCA.

Kultivierung	Ausreißer
K04	K0425
K07	K0704-K0707, K0731, K0735
K08	K0807, K0811, K0826, K0827, K0839
K09	K0931, K0933, K0942
K10	K1020, K1024

Im Score-Diagramm ist ein bogenförmiger Verlauf der Score-Werte zu beobachten, anhand dessen sich die Kultivierungen differenzieren lassen (s. Abb. 5.10). Die 2. PC



beschreibt ca. 0,11 % der spektralen Varianz. Analyten wie Glucose oder Lactat korrelieren nicht mit den spektralen Varianzen der ersten beiden PCs.

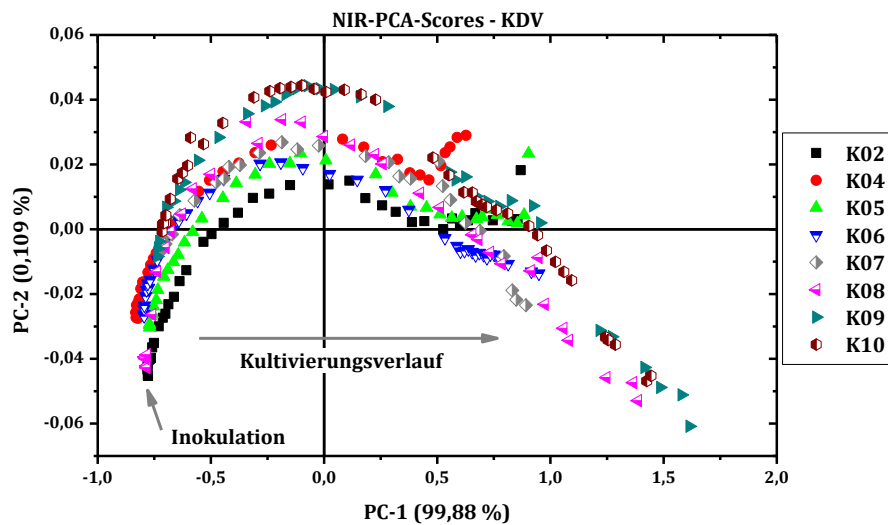


Abb. 5.10: NIR-PCA-Scores der Spektren der Kultivierungen K02 bis K10 ohne spektrale Ausreißer.

### 5.2.3 Zusammenfassung der PCA-Auswertung

Die PCA-Auswertungen der MIR- und NIR-Spektren zeigen eine hohe Homogenität zwischen den einzelnen Kultivierungen. Die spektralen Varianzen zwischen den Kultivierungen sind gering. Für die MIR-Auswertung wurde der Absorptionsbereich von Glucose und Lactat gewählt und es konnte gezeigt werden, dass beide Analyten einen deutlichen Einfluss auf die spektralen Varianzen haben. Im Gegensatz dazu bietet die NIRS die Möglichkeit das Zellwachstum nachzuverfolgen. Bei zunehmender Zellzahl nehmen die Streueffekte zu, die bei der Transflexionsmessung zu höheren Absorptionsintensitäten führen.

## 5.3 Permutationsanalyse

Die quantitative Auswertung beruht auf den Daten von insgesamt acht Kultivierungen. Anhand der PCA konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede in den spektralen Varianzen zwischen den Kultivierungen am Größten sind. Für die Validierung bedeutet dies, dass ein Kalibrationsmodell immer gegen eine oder mehrere Kultivierungen, die nicht Teil des Kalibrationsmodells sind, getestet werden. Dieses Vorgehen wird im weiteren Verlauf als externe Validierung bezeichnet. Nur eine externe Validierung gibt Aufschluss darüber, ob ein Kalibrationsmodell robust ist und die Variablen einer dem Modell unbekanntem Kultivierung mit einem geringen Fehler vorhergesagt werden können.

Des Weiteren gilt es zu klären, welche der Kultivierungen in das Kalibrationsmodell aufgenommen werden und welche zur externen Validierung herangezogen werden. In dem Zusammenhang soll untersucht werden, wie viele Kultivierungen notwendig sind, um ein valides Kalibrationsmodell erstellen zu können. Um diese Fragestellungen beantworten zu können wurde mittels Matlab eine Permutationsanalyse durchgeführt (s. Anhang Kapitel 7.3.4, S. 100).

Die Permutationsanalyse berechnet aus den acht Kultivierungen den mittleren Vorhersagefehler (RMSEP) aus allen möglichen Kombinationen in Abhängigkeit von der Anzahl der verwendeten PLS-Faktoren. Zur Veranschaulichung ist im Folgenden der Median des RMSEP bezüglich der Anzahl an verwendeten PLS-Faktoren und der Anzahl an Kultivierungen im Kalibrationsmodell dargestellt. Anstelle des Mittelwerts wurde der Median gewählt, da die Anzahl der möglichen Kombinationen stark variieren und der Median eine bessere Vergleichbarkeit liefert. Wird eine Kultivierung ins Modell aufgenommen, so ergeben sich daraus acht mögliche Kombinationen (siehe letzte Spalte). Werden vier Kultivierungen in das Kalibrationsmodell aufgenommen, resultieren daraus 70 mögliche Kombinationen. Der RMSEP nimmt von rot, gelb, grün nach blau hin ab.

Demnach ist der RMSEP am höchsten, wenn nur eine Kultivierung ins Modell aufgenommen wird. Der minimale RMSEP von 0,241 g/L ergibt sich, wenn sieben Kultivierungen mit drei PLS-Faktoren zur Modellerstellung verwendet werden. Wird nur eine Kultivierung zur Modellierung verwendet, wird ein unzureichender Anteil der gesamten Prozessvarianz der insgesamt acht Kultivierungen erfasst. Im Gegensatz zu univariaten Kalibrationen ist eine Extrapolation mittels PLS nicht möglich, weshalb höhere RMSEPs beobachtet werden.

		Anzahl PLS-Faktoren										
Anzahl Kultivierungen Kalibrationsmodell	Median RMSEP (g/L)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Kombina- tionen
	1	0,363	0,321	0,389	0,470	0,471	0,505	0,505	0,548	0,553	0,565	8
	2	0,344	0,326	0,306	0,340	0,355	0,361	0,347	0,351	0,347	0,380	28
	3	0,334	0,299	0,308	0,308	0,313	0,342	0,330	0,326	0,313	0,322	56
	4	0,340	0,315	0,304	0,299	0,284	0,305	0,316	0,324	0,295	0,299	70
	5	0,315	0,325	0,284	0,292	0,291	0,291	0,307	0,320	0,311	0,295	56
	6	0,364	0,317	0,295	0,287	0,278	0,278	0,287	0,309	0,319	0,322	28
	7	0,319	0,307	0,241	0,259	0,263	0,303	0,297	0,281	0,316	0,316	8

Abb. 5.11: Median des RMSEP in Abhängigkeit von der Anzahl der Kultivierungen im MIR Kalibrationsmodell sowie von der Anzahl der PLS-Faktoren für Glucose.

Wie viele Kultivierungen mindestens zur Kalibration herangezogen werden müssen, um ein robustes Modell erstellen zu können, kann nicht generell beantwortet werden. Als wichtigstes Kriterium gilt es die gesamte Prozessvarianz zu erfassen und in das Modell zu integrieren. In Bezug auf den Median des RMSEP lässt sich schließen, dass zwei oder drei Kultivierungen genügen sollten, um ein

ausreichendes Maß an Prozessvarianz abzubilden. In der Spalte mit drei PLS-Faktoren liegt der RMSEP unter Verwendung von zwei oder drei Kultivierungen bei ca. 0,3 g/L. Werden mehr Kultivierungen für die Modellierung benutzt, verbessert sich der mittlere RMSEP nur geringfügig.

Zur weiteren Analyse werden die minimalen RMSEPs in Abhängigkeit von der Anzahl der Kultivierungen im Kalibrationsmodell untersucht (s. Abb. 5.12). Bei drei Kultivierungen mit vier PLS-Faktoren für das Modell wird ein RMSEP von ca. 0,2 g/L erreicht.

		Anzahl PLS-Faktoren										Kombinationen
Anzahl Kultivierungen Kalibrationsmodell		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	Min. RMSEP (g/L)	0,317	0,308	0,290	0,382	0,368	0,358	0,345	0,319	0,349	0,334	8
2		0,259	0,276	0,251	0,238	0,226	0,254	0,263	0,264	0,269	0,265	28
3		0,261	0,236	0,197	0,200	0,213	0,201	0,213	0,203	0,215	0,229	56
4		0,211	0,221	0,190	0,190	0,197	0,185	0,189	0,186	0,186	0,197	70
5		0,168	0,164	0,161	0,160	0,169	0,178	0,161	0,166	0,149	0,146	56
6		0,132	0,128	0,166	0,161	0,155	0,119	0,136	0,160	0,146	0,141	28
7		0,083	0,124	0,128	0,097	0,089	0,094	0,119	0,131	0,127	0,121	8

Abb. 5.12: Mittels Permutationsanalyse berechneter minimaler RMSEP für Glucose in Abhängigkeit von der Anzahl an Kultivierungen im MIR-Kalibrationsmodell sowie PLS-Faktoren.

Als Vorgabe wird definiert, dass etwa 2/3 der Kultivierungen für die Modellerstellung benutzt werden. Die verbleibenden 1/3 ergeben ein repräsentatives Test-Set für die externe Validierung. Bei insgesamt acht Kultivierungen bedeutet dies, dass etwa fünf Kultivierungen für die Modellerstellung verwendet werden. Mit Hilfe der Permutationsanalyse lässt sich somit die ideale Kombination an Kultivierungen für die Kalibration und Validierung bestimmen. Für jeden der Analyten wurde eine entsprechende Permutationsanalyse durchgeführt, um die bestmögliche Kombination für jeden der Analyten zu ermitteln.

Am Beispiel der Permutationsanalyse der MIR-Auswertung für Glucose wurde dargelegt, dass bereits drei Kultivierungen für die Modellerstellung ausreichend sind, um einen RMSEP von 0,2 g/L für Glucose zu erreichen.

## 5.4 Kalibrationsmodelle und Vorhersagen – MIR

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus der Kalibration und Validierung der MIR-Spektren vorgestellt. In einer groben Übersicht sind die Modell- und Vorhersagefehler zusammengefasst. In den darauffolgenden Unterkapiteln werden die Kalibrationsmodelle für die einzelnen Analyten kritisch analysiert und diskutiert. Neben den Vorhersagefehlern wird vor allem auf die Robustheit eines Modells eingegangen.

### 5.4.1 Übersicht

In Tabelle 5.3 ist eine Zusammenfassung aller Kalibrationsmodelle und deren externe Validierung gegeben. Als Vorgabe gilt, dass fünf Kultivierungen (Kult.) zur Kalibration (Kal.) und somit drei Kult. zur Validierung (Val.) eingesetzt werden. Diese Vorgabe gilt für die Analyten Glucose und Lactat. Bei den restlichen Variablen wurden drei Kult. zur Modellierung und eine Kult. für die Vorhersage verwendet. Bei den Kult. K02 bis K06 wurde das MIR-Spektrometer nicht mit N<sub>2</sub> gespült, was zu starken Interferenzen innerhalb der Spektren führte (s. Abb. 5.6, S. 55). Nur für Glucose und Lactat konnte der Spektralbereich eingegrenzt werden. Die restlichen Analyten absorbieren in diesem spektralen Bereich, weshalb die Auswertung auf die Kult. K07 bis K10 beschränkt wurde.

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Kalibration und Validierung der MIR-Daten

Analyt	Kult. Kal.	Kult. Val.	Proben Kal. / Val.	PLS-F.	RMSECV	RMSEP <sup>1</sup>	RMSEP <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Kal.	Bereich Kal.	Bereich Val.
Glucose	K02, K04, K05, K06, K10	K07, K08, K09	208 / 123	4	0,167 g/L	0,171 g/L	5,1 %	0,996	0 - 8,95 g/L	0,01 - 6,77 g/L
Lactat	K04, K06, K07, K08, K09	K02, K05, K10	204 / 127	5	0,153 g/L	0,182 g/L	9,2 %	0,984	0,04 - 3,95 g/L	0,07 - 3,95 g/L
Glutamin	K07, K09, K10	K08	129 / 42	5	112,1 mg/L	68,8 mg/L	12,9 %	0,948	20 - 1074 mg/L	20 - 1067 mg/L
Glutamat	K07, K09, K10	K08	129 / 42	4	33,0 mg/L	42,4 mg/L	41,9 %	0,75	4 - 237 mg/L	9 - 203 mg/L
Ammonium	K07, K08, K10	K09	126 / 47	5	14,3 mg/L	10,7 mg/L	22,9 %	0,857	4,9 - 141,7 mg/L	7,7 - 93,2 mg/L
GZK	K07, K09, K10	K08	129 / 42	5	1,402 10 <sup>6</sup> N/mL	0,988 10 <sup>6</sup> N/mL	11,2 %	0,944	0,50 - 18,6 10 <sup>6</sup> N/mL	0,47 - 17,6 10 <sup>6</sup> N/mL
Viabilität	K07, K09, K10	K08	129 / 42	5	4,52 %	4,33 %	8,7 %	0,932	10,7 - 98,2 %	41,8 - 99,7 %

<sup>1</sup> Einheit entsprechend des Analyten

<sup>2</sup> Prozentualer RMSEP bezogen auf die Hälfte des max. auftretenden Messwertes.

Für Glucose und Lactat liegen die RMSEP-Werte unter 0,2 g/L. Oft wird der RMSEP auch als prozentuale Abweichung von der maximal beobachteten Konzentration angegeben. Da die Konzentrationen auch Werte nahe Null erreichen vermittelt eine prozentuale Angabe bezüglich des maximalen Messwertes einen positiven Wert. Deshalb wurde der RMSEP zusätzlich als prozentualer Fehler bezüglich der Hälfte des maximalen Referenzwertes definiert. Für Glucose und Lactat ergibt sich daraus ein prozentualer RMSEP von 5,1 % und 9,2 %.

Für die restlichen Variablen, ausgenommen Glutamat, liegt der RMSEP niedriger als der RMSECV. In diesen Fällen wurden jeweils drei Kult. für die Modellerstellung verwendet und eine Kult. dient der externen Validierung. Gerade die Varianzen zwischen den einzelnen Kult. sind ausschlaggebend (s. Abb. 5.7, S. 55). Da nur eine

Kult. zur externen Validierung zur Verfügung steht, sind die Varianzen innerhalb dieser Kult. deutlich geringer. Als Ausnahme gilt das Modell von Glutamat, welches mit einem RMSEP von 41,9 % den höchsten prozentualen RMSEP aufweist.

In den nächsten Kapiteln werden für jeden Analyten bzw. Zellvariable die Kalibrationsmodelle vorgestellt und analysiert.

## 5.4.2 Glucose

Wie sich bereits in den Vorversuchen gezeigt hatte, ist die MIRS bei der Bestimmung chemischer Komponenten sensitiver als NIRS. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Kalibration und Validierung für Glucose ist in Abb. 5.13 gezeigt. Für die Kalibration wurden fünf Kult. verwendet. In Abb. 5.13 A werden die Vorhersagewerte aus der Kreuzvalidierung gegen die Referenzwerte aufgetragen. Die Linie gibt den idealen Verlauf (Vorhersage = Referenz) wieder.

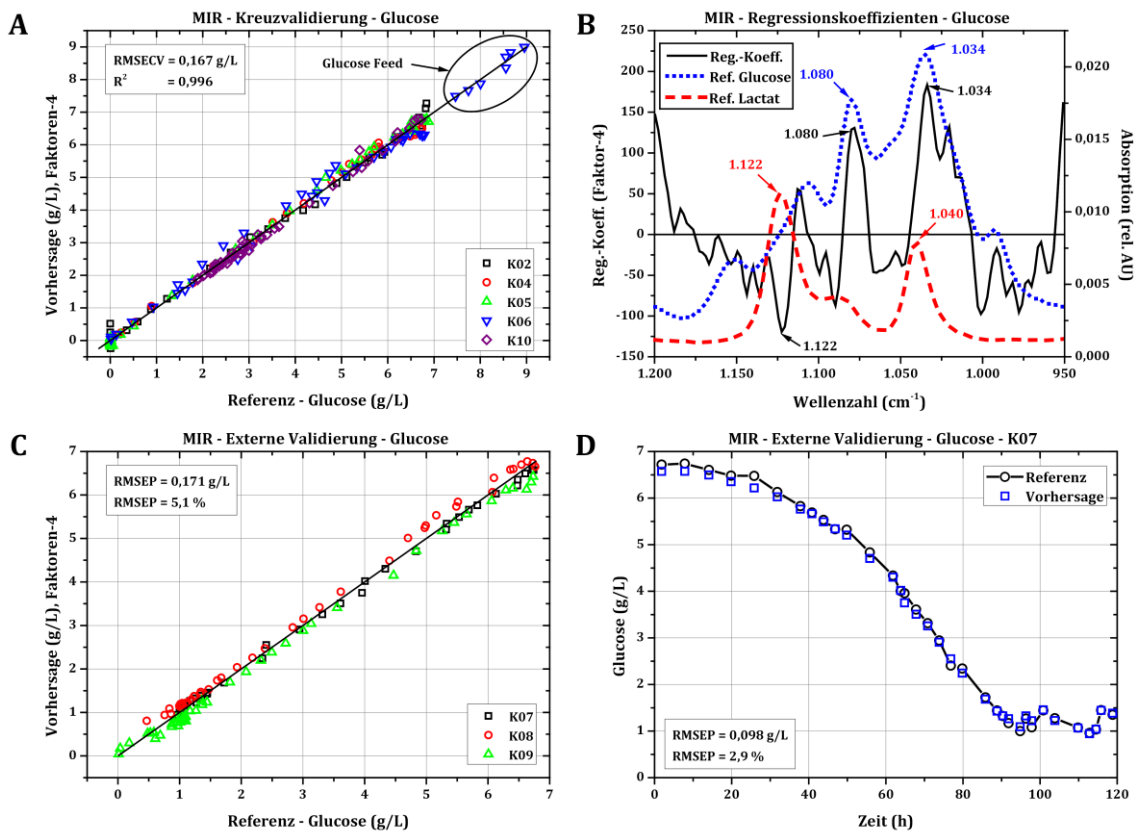


Abb. 5.13: Glucose-Auswertung mit TC42-Medium als Hintergrundspektrum und DT2 als Datenvorverarbeitung: Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K07 (D).

Über den kompletten Konzentrationsbereich von 0 bis 9 g/L streuen die Werte gering, was sich auch in einem niedrigen RMSECV von etwa 0,17 g/L widerspiegelt. In der Kalibration enthalten ist die K06 mit dem Glucose-Feed auf max. 9 g/L (s. Abb. 5.13 A). Auch die hohen Konzentrationen von Glucose werden in der

Kreuzvalidierung mit einem geringen Fehler vorhergesagt. Geht die Konzentration von Glucose gegen 0 g/L streuen die Vorhersagen stärker.

In Abb. 5.13 B werden die Regressionskoeffizienten<sup>1</sup> mit den Referenzspektren von Glucose und Lactat verglichen. Für das Modell wurde der Spektralbereich zwischen 1.200 – 950  $\text{cm}^{-1}$  verwendet. Das Kalibrationsmodell stützt sich auf die Information von Glucose im Spektrum (1.080 und 1.034  $\text{cm}^{-1}$ ), berücksichtigt aber auch die Information von Lactat (1.122  $\text{cm}^{-1}$ ). Zu dem Zeitpunkt, wenn Glucose verbraucht wird, durchläuft die Konzentration von Lactat ein Maximum. Um die Null-Werte von Glucose vorhersagen zu können, muss sich das Modell auf die Information von Lactat im Spektrum stützen.

Bei der externen Validierung werden die Kult. K07, K08 und K09 durch das Glucosemodell vorhergesagt (s. Abb. 5.13 C). Der RMSEP ist mit 0,171 g/L nahezu identisch mit dem RMSECV. Der Konzentrationsbereich liegt zwischen 0 – 6,7 g/L Glucose. Die Vorhersagewerte weichen, selbst bei niedrigen Konzentrationen, nur gering von den Referenzwerten ab.

Im direkten Vergleich streuen die Werte von K08 und K09 etwas stärker als bei K07. In Abb. 5.13 D sind die Vorhersagewerte und die Referenzwerte von K07 gegen die Kultivierungszeit aufgetragen. Nach etwa 94 h Kultivierungsdauer wurde Glucose bei einer Konzentration von 1 – 1,5 g/L konstant gehalten. Trotz der Zugabe sind die Abweichungen zwischen den Vorhersagewerten und Referenzwerten gering und es wird ein RMSEP von 0,1 g/L berechnet.

Anhand der externen Validierung wird die Robustheit des Kalibrationsmodells bestätigt. Die Vorhersagen sind auch nach einem Glucose Feed präzise.

### 5.4.3 Lactat

Während des exponentiellen Wachstums der CHO-Zellen wird vermehrt Lactat produziert. Generell gilt, dass sich Lactat-Konzentrationen oberhalb von 2 g/L negativ auf das Wachstum von CHO-Zellen auswirken können. Eine präzise Überwachung von Lactat und dessen Auswirkung auf das Zellwachstum ermöglicht ein besseres Verständnis bezüglich des Zellmetabolismus.

Mit einem RMSECV von etwa 0,15 g/L fällt der Vorhersagefehler für Lactat etwas niedriger aus als bei Glucose (s. Abb. 5.14 A). Der Konzentrationsbereich liegt zwischen 0 – 4 g/L Lactat und die Streuung ist über den gesamten Bereich konstant. Zum Kalibrationsmodell gehört, genau wie bei dem Modell für Glucose, die K06. Trotz der Zugabe von Glucose gegen Ende von K06 bleibt der Vorhersagefehler klein.

Es werden insgesamt fünf PLS-Faktoren für das Kalibrationsmodell von Lactat benötigt. Die Regressionskoeffizienten stimmen bei 1.123 und 1.040  $\text{cm}^{-1}$  mit dem

---

<sup>1</sup> Da es sich um multivariate Regressionsmodelle handelt, ist der Regressionskoeffizient stets multivariat.

Referenzspektrum überein (s. Abb. 5.14 B). An der Flanke des Peaks bei  $1.040\text{ cm}^{-1}$  ist bei  $1.033\text{ cm}^{-1}$  die Information von Glucose im Modell enthalten. Selbst während der starken Konzentrationserhöhungen von Glucose, wird Lactat weiterhin selektiv vorhergesagt.

Am externen Datensatz wird die Selektivität und Präzision des Lactat Modells mit einem RMSEP von ca.  $0,18\text{ g/L}$  bestätigt (s. Abb. 5.14 C). Die einzelnen Messpunkte sind entlang der Winkelhalbierenden orientiert. Die Vorhersagewerte unterhalb von  $0,5\text{ g/L}$  Lactat weichen von dem idealen Verlauf etwas deutlicher ab. Niedrige Lactat-Werte liegen zu Beginn jeder Kult. vor, wenn gleichzeitig die Glucose-Werte hoch sind. Hierdurch wird eine präzise Vorhersage von Lactat zu Beginn jeder Kult. erschwert. Wird im späteren Verlauf einer Kult. Glucose zugegeben stört dies die Vorhersagegenauigkeit des Modells nicht (s. K10 Abb. 5.14 C).

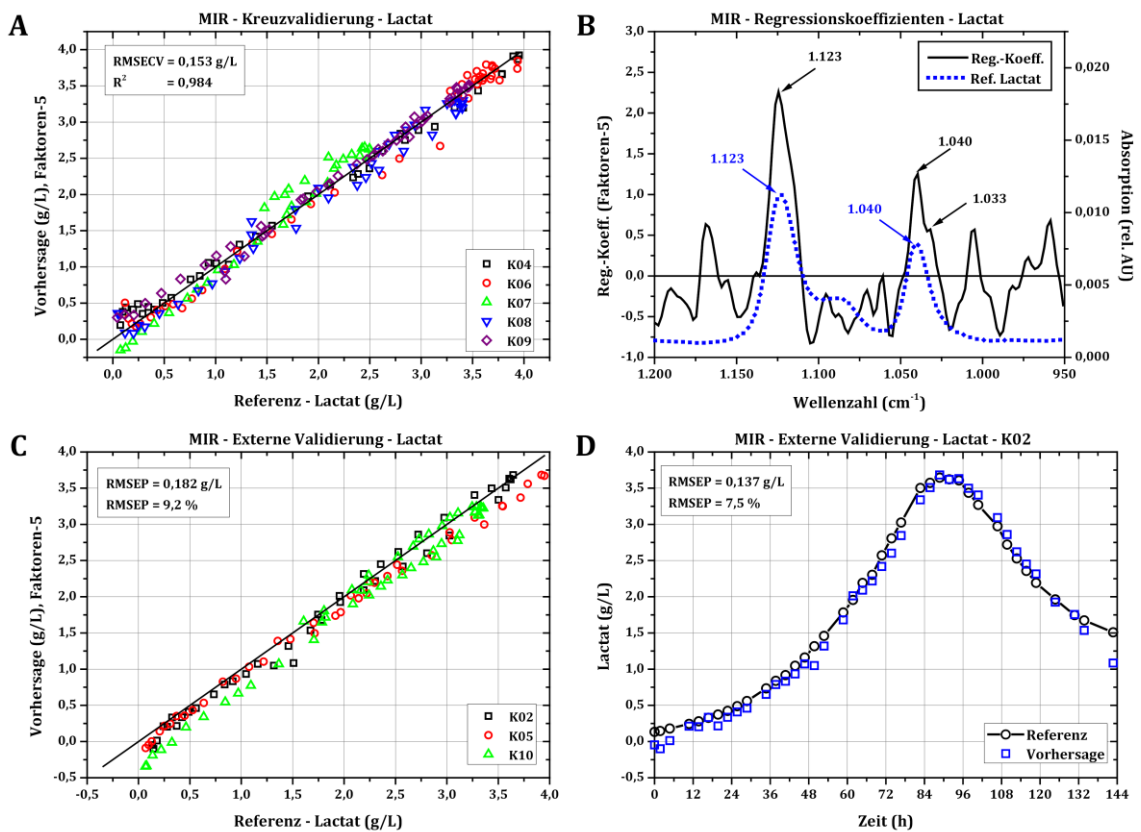


Abb. 5.14: Lactat – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K02 (D).

Am Verlauf der K02 werden die Vorhersage- und Referenzwerte von Lactat direkt miteinander verglichen (s. Abb. 5.14 D). Auch hier zeigt sich eine Ungenauigkeit der Vorhersage innerhalb der ersten 6 h bei niedrigen Lactat-Konzentrationen. Der mittlere Fehler der Vorhersage ist mit einem RMSEP von etwa  $0,14\text{ g/L}$  im Schnitt geringer. Auch nach der Glucose-Zugabe (94 h) wird Lactat präzise durch das Modell vorhergesagt.

### 5.4.4 Glutamin

Glutamin ist neben Glucose und Lactat eine weitere kritische Variable und muss, wegen seiner thermischen Instabilität, dem Medium frisch zugegeben werden. Glutamin absorbiert vor allem im Spektralbereich  $> 1.200 \text{ cm}^{-1}$ , wo die Interferenzen durch die Wasserbande auftreten. Die Auswertung beschränkt sich deshalb auf die Kult. K07 bis K10.

In Abb. 5.15 A sind die Vorhersagen aus der Kreuzvalidierung gegen die Referenzwerte aufgetragen. Bei K07 wurde Glutamin kurz vor dessen Verbrauch zugegeben, um die Robustheit des Modells zu steigern. Aus der Kreuzvalidierung geht hervor, dass das Kalibrationsmodell Glutamin nicht spezifisch vorhersagt. Die Vorhersage des Glutamin Feeds weicht deutlich von den Referenzwerten ab, was wiederum zu einem hohen RMSECV von ca. 112 mg/L führt.

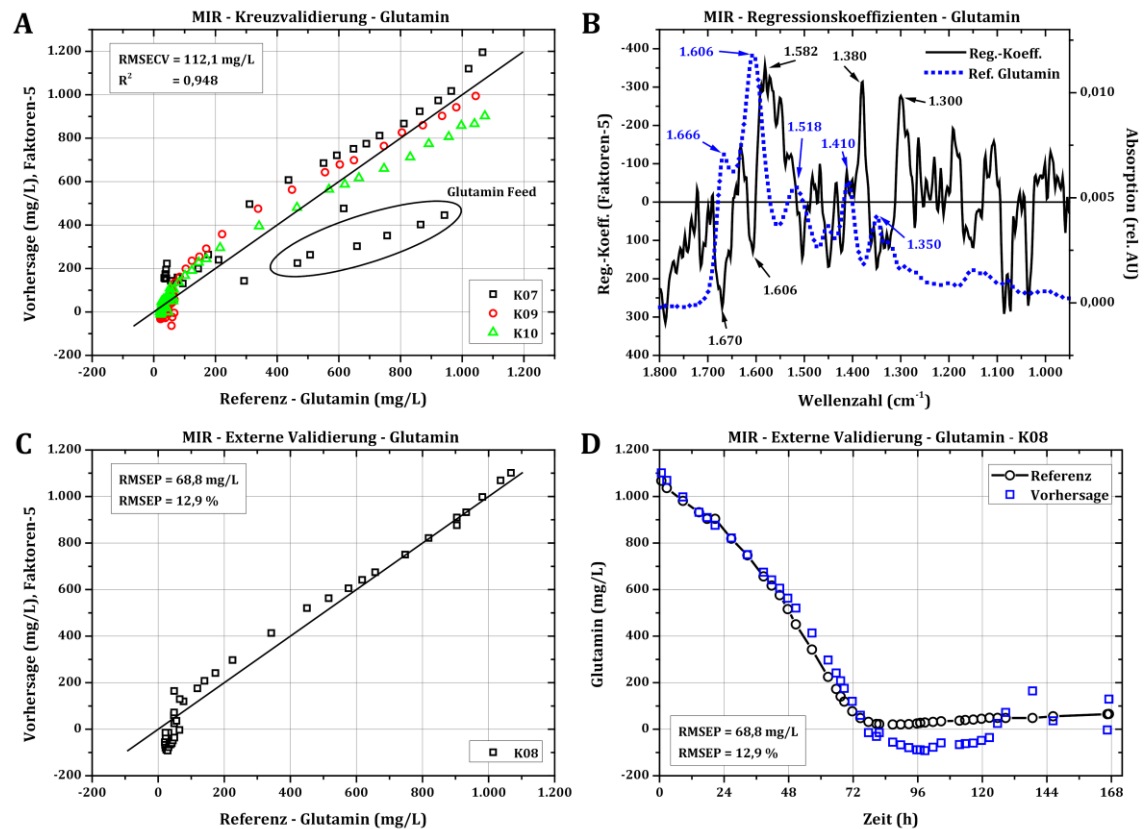


Abb. 5.15: Glutamin - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektrern (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D).

Es werden nur bedingt Übereinstimmungen zwischen den Regressionskoeffizienten und dem Referenzspektrum von Glutamin beobachtet (s. Abb. 5.15 B). Charakteristisch für Glutamin sind die Amid-Schwingungen bei  $1.666$  und  $1.606 \text{ cm}^{-1}$  [53]. Beim Regressionskoeffizienten sind diese Werte negativ. Die Bande bei  $1.580 \text{ cm}^{-1}$  wird vermutlich durch Lactat verursacht (antisymmetrische C–O-Streckschwingung), da der Verlauf der Lactat-Konzentration mit dem von



Glutamin negativ korreliert. Die Informationen bei  $1.380$  und  $1.300\text{ cm}^{-1}$  können nicht Glutamin zugeordnet werden. Diese Banden können nicht explizit einem Molekül zugeordnet werden, sondern stellen die Gesamtinformation aus allen chemischen Verbindungen im Medium dar.

Das Ergebnis der externen Validierung ergibt einen RMSEP von ca.  $69\text{ mg/L}$ , der um etwa  $40\text{ mg/L}$  unter dem RMSECV liegt (s. Abb. 5.15 C). Dies hat zwei Gründe. Zum einen wurde nur gegen eine Kult. validiert und in der Kalibration trat ein Glutamin Feed auf, der vom Modell mit einem deutlich höheren Fehler vorhergesagt wurde. In Abb. 5.15 D ist der zeitliche Verlauf der Vorhersage und der Referenzwerte aufgezeigt. Der Vorhersagefehler ist bis  $72\text{ h}$  gering und nimmt deutlich zu, sobald Glutamin verbraucht ist.

Die Auswertung lässt darauf schließen, dass die Vorhersage von Glutamin zu einem bedeutenden Teil auf Kreuzkorrelationen beruht. Am Beispiel von K08 wird Glutamin während der exponentiellen Phase mit einem niedrigen Fehler vorhergesagt. Für eine mögliche Kontrolle einer Feed-Zugabe reicht die MIRS nicht aus.

#### 5.4.5 Gesamtzellkonzentration (GZK)

Für die GZK-Auswertung wurden ebenfalls die letzten vier Kult. (K07 bis K10) verwendet. Die Kreuzvalidierung des Kalibrationsmodells ergibt einen RMSECV von  $1,4 \cdot 10^6$  Zellen/mL (s. Abb. 5.16 A). Wegen der geringen effektiven Eindringtiefe der MIR-Strahlung in die Probe ist es mittels der ATR-Technologie nicht möglich die GZK direkt zu messen.

Das Ergebnis der Kreuzvalidierung zeigt jedoch, dass über Kreuzkorrelationen zu anderen Medienbestandteilen eine Kalibration möglich ist. Das Modell stützt sich dabei auf verschiedene Bereiche im MIR-Spektrum ( $1.609$ ,  $1.547$ ,  $1.380$ ,  $1.302$ ,  $1.111$ ,  $1.061$  und  $1.024\text{ cm}^{-1}$ ). Eine direkte Zuordnung zu einer Verbindung ist nicht möglich. Eine Kalibration basierend auf Kreuzkorrelationen ist weniger robust. Außerdem ist mit höheren Vorhersagefehlern zu rechnen, sollte es zu Abweichungen vom regulären Kultivierungsverlauf kommen.

Die externe Validierung zeigt bei niedrigen Zellkonzentrationen ( $> 5 \cdot 10^6$  Zellen/mL) einen geringen Vorhersagefehler (s. Abb. 5.16 C). Im Bereich zwischen  $5$  und  $15 \cdot 10^6$  Zellen/mL ist der Vorhersagefehler deutlich größer (s. Abb. 5.16 C). Insbesondere während des exponentiellen Wachstums ab  $48\text{ h}$  ist der Vorhersagefehler höher (s. Abb. 5.16 D). Der RMSEP ist mit ca.  $1,0 \cdot 10^6$  Zellen/mL etwa um ein Drittel niedriger als der RMSECV. In der Kreuzvalidierung wird die GZK bei der K07 im direkten Vergleich zu den beiden anderen Kult. mit einem deutlich höheren RMSECV vorhergesagt. Genau wie bei Glutamin, wird für die externe Validierung der RMSEP aus einer Kult. berechnet. Des Weiteren zeichnet sich die Referenzmethode zur Bestimmung der Zellkonzentration und Viabilität als die am

wenigsten reproduzierbare Methode aus. Die Standardabweichung ist generell für die Bestimmung der Zellkonzentration am höchsten. Dadurch treten Ausreißer, wie in Abb. 5.16 D durch den Pfeil markiert, auf.

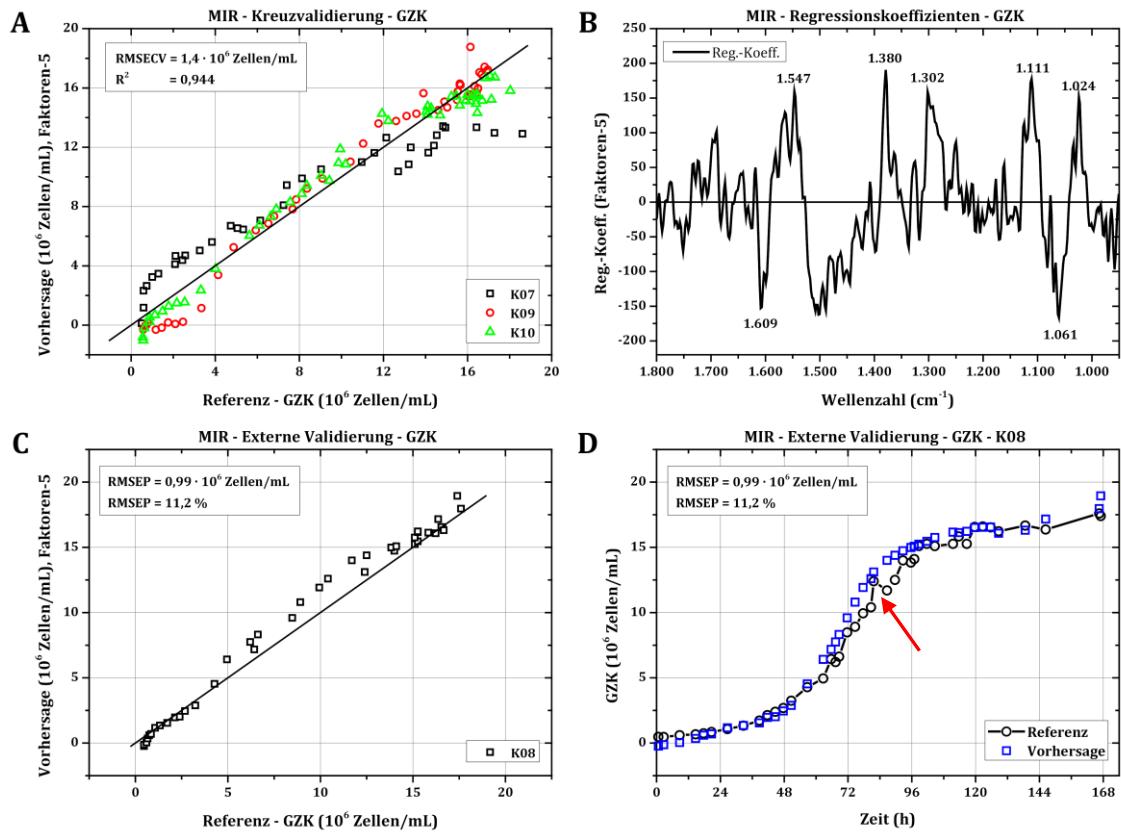


Abb. 5.16: GZK - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D).

### 5.4.6 Glutamat

Als Stoffwechselneben- und Zersetzungsprodukt von Glutamin ist der Konzentrationsverlauf von Glutamat mit dem von Glutamin verknüpft. In Hinblick auf die max. Glutamat-Konzentration von ca. 240 mg/L berechnet sich aus der Kreuzvalidierung ein RMSECV von 33 mg/L (s. Abb. 5.17 A). Nach der Inokulation liegt die Glutamat-Konzentration zu Anfang jeder Kultivierung bei etwa 120 mg/L. Im Verlauf einer Kult. nimmt die Konzentration von Glutamat zu und wird schließlich abgebaut.

Die Vorhersage und deren Abweichung vom Referenzwert folgen demnach einer Methodik. Für K09 und K10 wird ein ähnliches Muster beobachtet. Im Gegensatz dazu wird bei K07 Glutamin zugegeben, was zu einem Konzentrationsanstieg von Glutamat führt. In den Vorversuchen wurde für Glutamat ein LOD von ca. 0,7 g/L (s. Tabelle 4.7, S. 40) bestimmt. In diesem komplexeren System kann davon ausgegangen werden, dass die Kalibration auf Kreuzkorrelationen zu anderen Medienbestandteilen beruht. Die Messpunkte sind nicht systematisch entlang der

Winkelhalbierenden versetzt. Die beiden typischen Banden des Glutamats ( $1.560$  und  $1.401\text{ cm}^{-1}$ ) werden in den Regressionskoeffizienten nicht beobachtet (s. Abb. 5.17 B). Die Banden bei  $1.510$  und  $1.362\text{ cm}^{-1}$  können keiner bestimmten Verbindung zugeordnet werden.

Der Vorhersage von K08 in der externen Validierung ist vergleichbar mit den Vorhersagen von K09 und K10 aus der Kreuzvalidierung (s. Abb. 5.17 C). Glutamat nimmt nach der Inokulation zu, die Vorhersagen sind aber stets zu hoch. Nach etwa 72 h wird ein Maximum erreicht und Glutamat wird abgebaut (s. Abb. 5.17 D). Diese Abnahme wird durch das Modell mit einer Abweichung von bis zu  $100\text{ mg/L}$  vorhergesagt. Mit einem prozentualen RMSEP von ca.  $42\%$  ist die Vorhersage von Glutamat mittels MIRS ungenau.

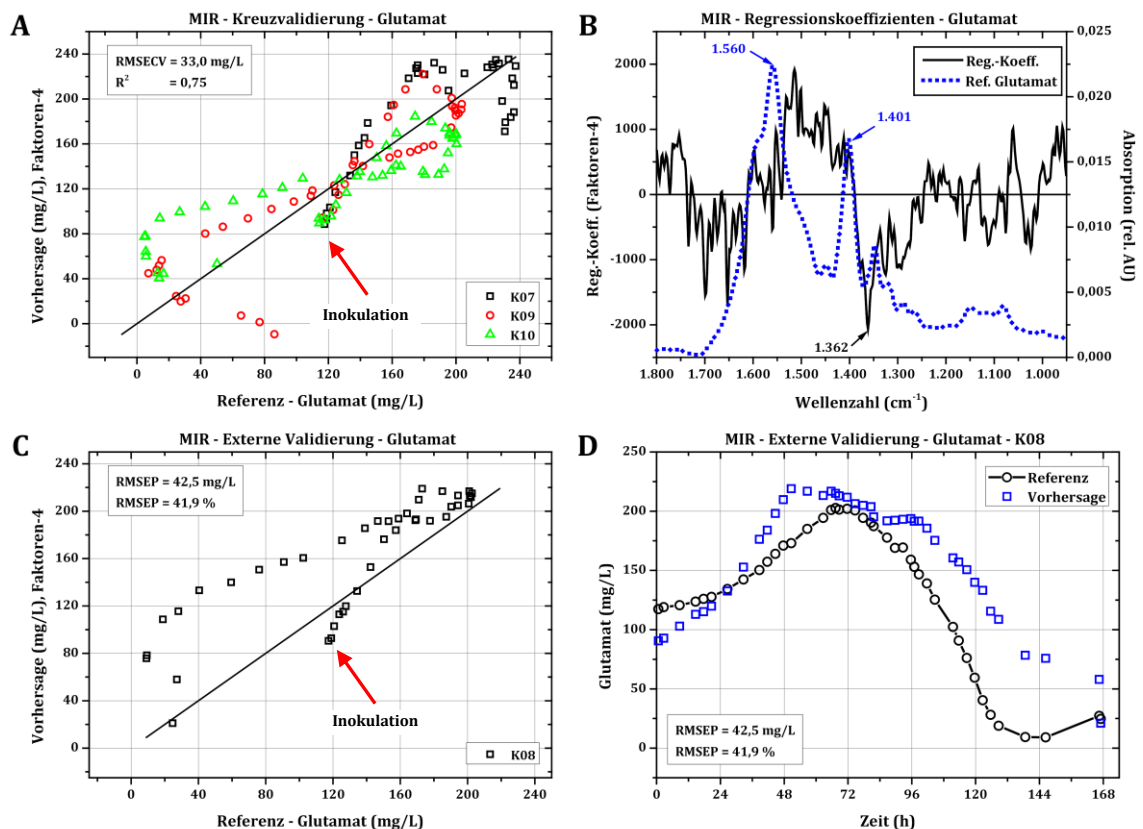


Abb. 5.17: Glutamat - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D).

Aufgrund der geringen Glutamat-Konzentration ist eine Kalibration nur über Kreuzkorrelationen möglich. Kalibrationen anhand von Kreuzkorrelationen sind deutlich anfälliger bei Änderungen der Prozessvarianzen.

### 5.4.7 Ammonium

Der Konzentrationsbereich von Ammonium liegt bei den acht CHO-Kultivierung zwischen 0 und  $140\text{ mg/L}$ . Die Ergebnisse der Kreuzvalidierung ergeben einen

RMSECV von ca. 14 mg/L, der im Vergleich zu Glutamat etwa halb so groß ist (s. Abb. 5.18 A). Die einzelnen Messpunkte liegen verteilt auf der Winkelhalbierenden. Für K07 werden höhere Ammonium-Konzentrationen beobachtet, was auf den Glutamin Feed zurückgeführt werden kann (s. Kapitel 5.1.2, S. 50). Trotz dieser zusätzlichen Varianzen bei K07 wird Ammonium mit einem ähnlichen RMSECV vorhergesagt.

Am Endpunkt der K08 wird Ammonium mit einem Fehler von nahezu 100 mg/L vorhergesagt. Am Ende der K08 wurde Glucose von ca. 0,5 g/L auf 5 g/L erhöht. Die Zugabe von Glucose stört möglicherweise die Kreuzkorrelationen, über die Ammonium vorhergesagt wird, worüber der hohe Vorhersagefehler bei K0842 erklärt werden kann.

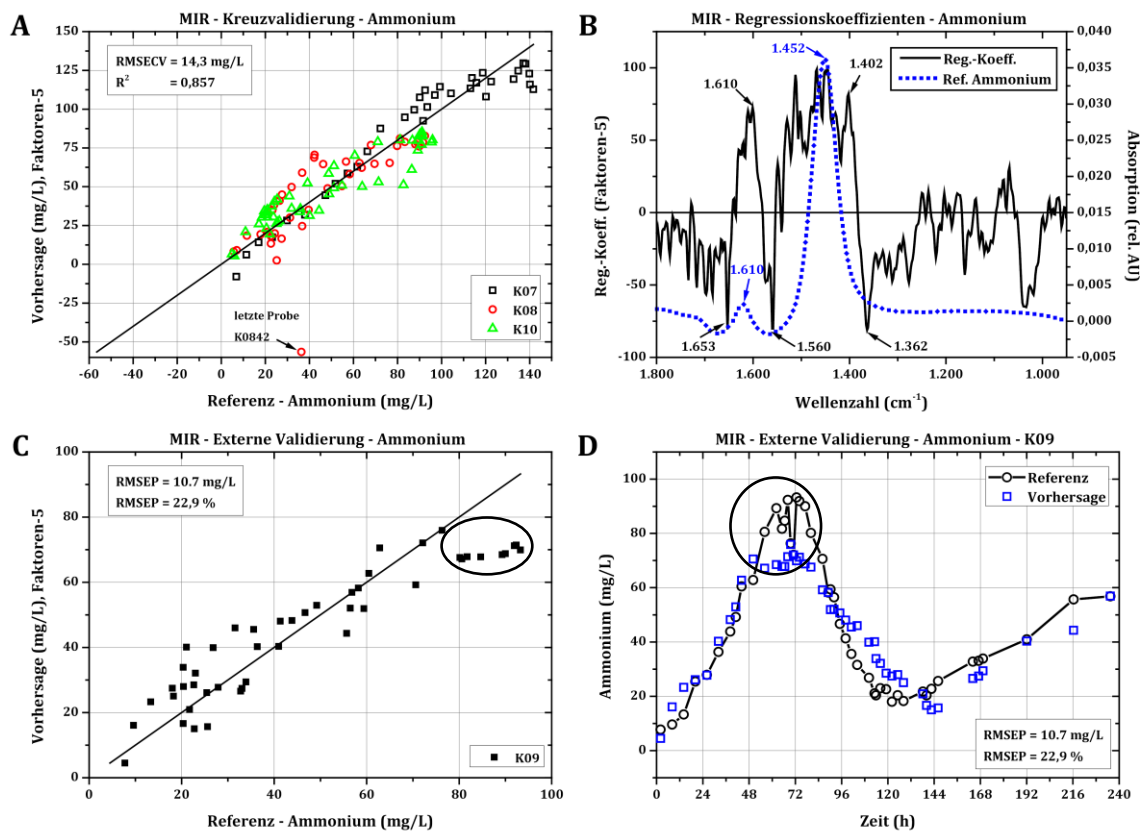


Abb. 5.18: Ammonium – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K09 (D).

Beide ammoniumspezifische Banden ( $1.610$  und  $1.452 \text{ cm}^{-1}$ ) werden durch die Regressionskoeffizienten beschrieben (s. Abb. 5.18 B). Weitere vier Banden haben einen großen Einfluss auf das Modell. Der Peak bei  $1.402 \text{ cm}^{-1}$  wurde bereits bei Glutamat beobachtet und stammt von der symmetrischen Streckschwingung der Carboxy-Gruppe [54]. Im Verlauf einer CHO-Kultivierung werden einzelne Aminosäuren abgebaut und produziert [55]. Die MIR-Banden der Aminosäuren überlagern sich, da diese über die gleichen funktionellen Gruppen (Carboxy- und

Aminogruppe) verfügen. Die Ammonium-Bildung korreliert eindeutig mit dem Glutamin-Verbrauch, wird aber auch durch die Verstoffwechslung und Bildung anderer Aminosäuren beeinflusst [55]. Eine Untersuchung der Loadings des 2. und 5. Faktors ergibt, dass das Ammonium-Modell auch Änderungen der Glucose und des Lactats berücksichtigt (s. Abb. 7.17, S. 103). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass der Glucose-Feed am Ende der K08 die Ammonium-Vorhersage beeinträchtigt.

Der Vorhersagefehler der externen Validierung ist mit einem RMSEP von 10,7 mg/L in der gleichen Größenordnung wie der RMSECV (s. Abb. 5.18 C). Während der exponentiellen Phase erreicht Ammonium ein Maximum (s. Abb. 5.18 C – eingekreist). Zu diesem Zeitpunkt wurden keine Feeds oder sonstige Veränderungen an der Kult. beobachtet, dennoch werden diese Messwerte unpräzise durch das PLS-Modell vorhergesagt. Dieselben Werte sind in Abb. 5.18 D markiert, wobei in diesem Fall die Referenz- und Vorhersage-Werte in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen sind. Nach etwa 72 h erreicht Ammonium die max. Konzentration, die Werte variieren aber teilweise zwischen 75 und 95 mg/L. Die Vorhersagen liegen zu diesem Zeitpunkt ca. 20 mg/L unter den Referenzwerten, variieren aber insgesamt weniger.

Die Konzentrationen von Ammonium sind für eine direkte selektive Kalibration zu niedrig, daher ist eine Kalibration nur über Kreuzkorrelationen möglich. Am Beispiel der K08 führte die Zugabe von Glucose zu einem deutlichen Anstieg des Vorhersagefehlers in der Kreuzvalidierung und zeigt deren Grenzen auf (s. Abb. 5.18 A). Die Daten der drei Kult. im Kalibrierset sind ausreichend, um ein valides Kalibrationsmodell für Ammonium zu erstellen. Mit einem RMSEP von ca. 23 % ist es möglich Ammonium anhand von Kreuzkorrelationen vorherzusagen.

### 5.4.8 Viabilität

Im Sinne von PAT ist die Viabilität einer Zellkultur ein kritischer Parameter, da dieser den „Gesundheitszustand“ der Zellen wiedergibt und entscheidend für die möglichen Produktausbeuten ist. Die Referenzmethode zur Bestimmung der Viabilität erfolgt über eine Zellfärbung (s. Anhang 7.6.1, S. 111).

Für die Viabilität gibt es keine spezifische chemische Verbindung, anhand derer eine Kalibration erfolgen kann. Deswegen wurde für die PLS-Kalibration ein möglichst großer Wellenzahlbereich ( $1.800 - 950 \text{ cm}^{-1}$ ) definiert.

Der RMSECV aus der Kreuzvalidierung liegt bei 4,5 % mit einem  $R^2$  von 0,932 (s. Abb. 5.19 A). Der Wertebereich der Referenzanalytik für die Viabilität liegt zwischen 10 und 98,5 %. Etwa 82 % aller Referenzwerte für die Viabilität liegen oberhalb von 80 %. Damit ist das Kalibrationsmodell für Viabilitäten oberhalb von 80 % gewichtet. Lediglich vier Messwerte unter 40 % Viabilität gehen in das Modell ein. Bei niedrigen Viabilitäten ist daher ein höherer Vorhersagefehler zu beobachten.

Das Kalibrationsmodell für die Viabilität bezieht sich auf die Banden bei 1.620, 1.580, 1.364 und 1.105  $\text{cm}^{-1}$  (s. Abb. 5.19 B). Das PLS-Loading des 3. Faktors korreliert teilweise mit dem Referenzspektrum von Lactat bei 1.580, 1.124 und 1.043  $\text{cm}^{-1}$  (s. Abb. 7.18, S. 104). Die übrigen Banden aus dem Regressionskoeffizienten können keinem der anderen Analyten zugeordnet werden.

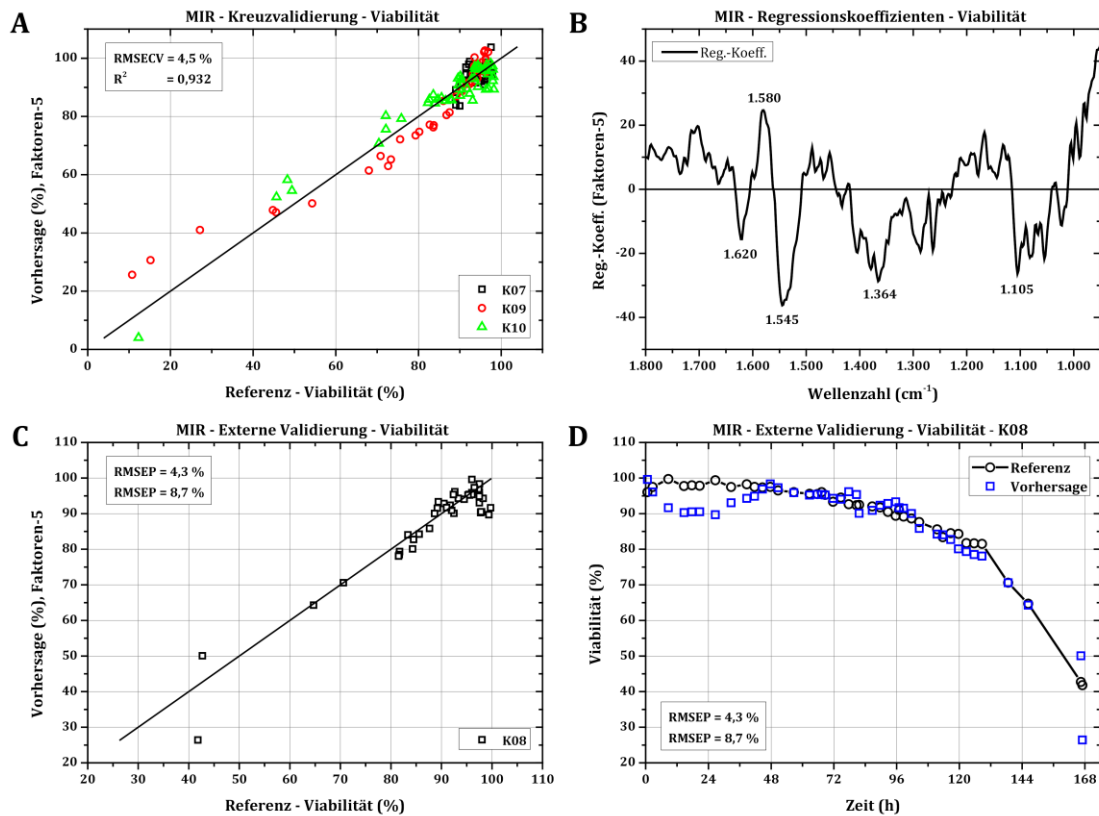


Abb. 5.19: Viabilität - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K07 (D).

Als externes Validierset wurde K08 verwendet. Mit einem RMSEP von 4,3 % liegt dieser etwas unter dem RMSECV (s. Abb. 5.19 C). Oberhalb einer Viabilität von 60 % stimmen die Referenz- und Vorhersagewerte des Modells in etwa überein. Nach etwa 168 h Kultivierungsdauer fällt die Viabilität auf etwa 40 %. Diese beiden niedrigen Viabilitäten werden durch das PLS-Modell mit deutlich höheren Fehlern vorhergesagt (s. Abb. 5.19D). Auch während der ersten 36 h weicht die Vorhersage der Viabilität vom Referenzwert deutlich ab.

Die Auswertung hat gezeigt, dass anhand von Kreuzkorrelationen eine Vorhersage der Viabilität möglich ist. Das PLS-Kalibrationsmodell stützt sich dabei im MIR-Spektrum zum einen auf die Information von Lactat, aber auch auf weitere MIR-Banden bei 1.620 und 1.545  $\text{cm}^{-1}$ . Es wird vermutet, dass diese Banden auf Konzentrationsänderungen von Aminosäuren zurückgehen.

### 5.4.9 Inline-Vorhersage – Glucose – Lactat

Für die beiden kritischen Variablen Glucose und Lactat konnten robuste Kalibrationsmodelle erstellt werden. Für beide Analyten wurde ein weiteres Set aus Kultivierungen mittels der Permutationsanalyse bestimmt, das einen möglichst geringen Vorhersagefehler für die K10 liefert.

In Abb. 5.20 ist eine inline Vorhersage für Glucose und Lactat gezeigt. Während der Kultivierung wurde nach etwa 72 h, 96 h und 142 h Glucose hinzugegeben. Trotz des Glucose Feeds wird Glucose durch das Kalibrationsmodell mit einem RMSEP < 0,1 g/L genau vorhergesagt. Ebenso wird Lactat mit einem RMSEP von 0,1 g/L vorhergesagt. Anhand dieser externen Validierung wird die hohe Genauigkeit und Selektivität der inline Vorhersage mittels MIRS für Glucose und Lactat demonstriert. Trotz der mehrfachen Zugabe von Glucose werden beide Analyten weiterhin präzise vorhergesagt.

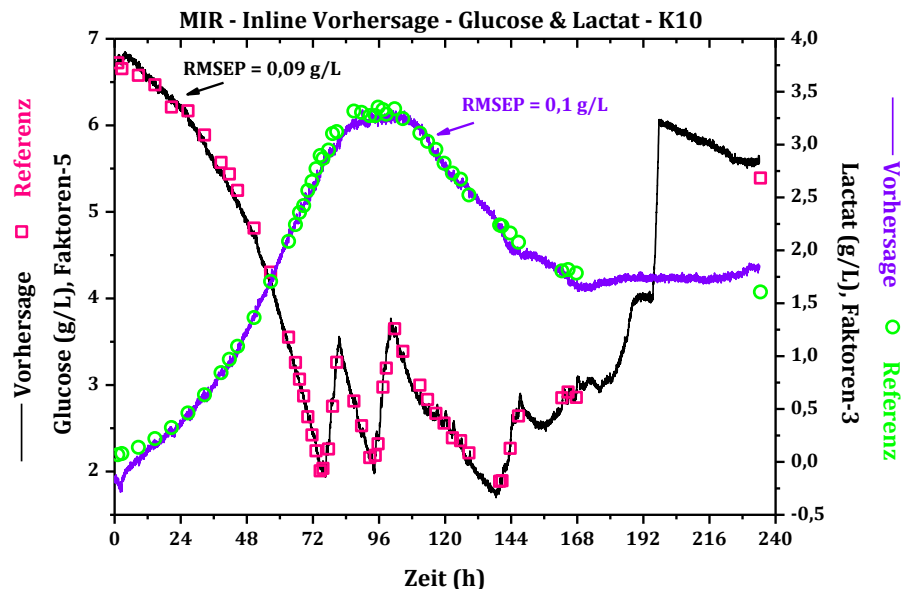


Abb. 5.20: Glucose und Lactat – Inline Vorhersage gegen Referenz aufgetragen für K10.

Für Glucose wurde in Kapitel 5.4.2 (S. 62) gezeigt, dass Konzentrationen um 1 g/L mittels der MIRS präzise vorhergesagt werden können. Basierend auf den Vorhersagen der MIRS sollte es möglich sein eine Regelung für eine Zufütterung zu etablieren und die Glucose-Konzentration konstant zu halten. Durch eine Limitierung von Glucose wird die Produktion von Lactat, welches in Konzentrationen über 2 g/L das Zellwachstum hemmen kann, reduziert [51].

### 5.4.10 Zusammenfassung

Glucose und Lactat können mittels der MIRS mit einem RMSEP von unter 0,2 g/L vorhergesagt werden. Des Weiteren wurde anhand der Kalibrationsmodelle von Glucose und Lactat gezeigt, dass diese Analyten spezifisch durch die Modelle

vorhergesagt werden. Die Regressionskoeffizienten und Loadings der Glucose- und Lactat-Kalibrationsmodelle bestätigen diesen Sachverhalt. Ermöglicht wurde dies durch die beschriebenen Spiking-Experimente. Auch eine wiederholte Zugabe von Glucose beeinträchtigt die Inline-Vorhersage von Glucose und Lactat nicht (s. 5.4.9, S. 72).

Die Konzentrationen der übrigen Analyten sind zu gering, um direkt im Spektrum nachgewiesen zu werden. In diesem Falle beruhen die Kalibrationsmodelle auf Kreuzkorrelationen zu anderen Informationen im MIR-Spektrum, die mit den Analytenkonzentrationen korrelieren. Deutlich wird dies am Beispiel von Glutamin. Die Glutamin-Zugabe wurde im Kalibrationsmodell sowie in der Kreuzvalidierung nicht präzise erfasst (s. Kapitel 5.4.4, S. 65). Dennoch ist es möglich anhand von Kreuzkorrelationen Glutamin vorherzusagen. Die Vorhersage der GZK und Viabilität ist ebenfalls nur über Kreuzkorrelationen möglich. Treten während der Kultivierungen Änderungen auf, die nicht im Kalibrationsmodell integriert sind, weichen die Vorhersagen deutlich ab.

Beruhend auf den Vorhersagen insbesondere auf Kreuzkorrelationen ist eine Vorhersage möglich, sofern keine unvorhergesehenen Varianzen auftreten.

## 5.5 Kalibrationsmodelle und Vorhersagen – NIR

### 5.5.1 Übersicht

Die Vorversuche haben im direkten Vergleich ergeben, dass die Nachweisgrenzen der NIRS in Bezug auf die untersuchten Analyten höher sind als die der MIRS (s. Kapitel 4.2.3, S. 36). Die Auswertung der CHO-Kultivierungen ergeben für die NIRS einen um den Faktor zwei bis drei höheren Vorhersagefehler für Glucose und Lactat. Die Metaboliten Glutamin, Glutamat und Ammonium können ebenfalls nicht mit Hilfe der NIRS detektiert werden. Die Vorhersagefehler für die Metabolite sind in beiden Fällen etwa vergleichbar.

Wegen der höheren optischen Weglängen durch das Medium und der Einflüsse von Streulichteffekten ist es möglich mittels der NIRS die GZK direkt zu detektieren. Daher ist der RMSEP der GZK bei der NIRS um ca. den Faktor zwei geringer als bei der MIRS. Eine komplette Übersicht der NIR-Ergebnisse bezüglich der CHO-Kultivierungen ist in Tabelle 5.4 aufgeführt.



Tabelle 5.4: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Kalibration und Validierung der NIR-Daten

Analyt	Kult. Kal.	Kult. Val.	Proben Kal. / Val.	PLS-F.	RMSECV	RMSEP <sup>1</sup>	RMSEP <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Kal.	Bereich Kal.	Bereich Val.
GZK	K02, K07, K08, K09, K10	K04, K05, K06	185 / 118	2	1,11 10 <sup>6</sup> N/mL	0,49 10 <sup>6</sup> N/mL	6,1 %	0,966	0,47 - 18,6 10 <sup>6</sup> N/mL	0,42 - 16,3 10 <sup>6</sup> N/mL
Glucose	K05, K06, K08, K09, K10	K02, K04, K07	198 / 105	4	1,267 g/L	0,479 g/L	14,0 %	0,723	0 - 8,95 g/L	0 - 6,84 g/L
Lactat	K04, K05, K07, K08, K10	K02, K06, K09	181 / 122	5	0,506 g/L	0,452 g/L	23,0 %	0,806	0,05 - 3,95 g/L	0,04 - 3,94 g/L
Viabilität	K02, K05, K06, K09, K10	K04, K07, K08	203 / 100	4	5,7 %	5,2 %	10,4 %	0,856	10,7 - 98,8 %	41,8 - 99,7 %
Glutamin	K04, K05, K07, K09, K10	K02, K06, K08	185 / 118	8	115,3 mg/L	75,7 mg/L	14,2 %	0,894	0 - 1073 mg/L	0 - 1067 mg/L
Glutamat	K02, K06, K07, K08, K09	K04, K05, K10	186 / 117	4	31,4 mg/L	19,7 mg/L	13,9 %	0,806	7,2 - 319,3 mg/L	4,7 - 283 mg/L
Ammonium	K02, K06, K07, K09, K10	K04, K05, K08	193 / 110	3	21,4 mg/L	16,1 mg/L	31,5 %	0,59	4,9 - 141,7 mg/L	5,6 - 102,1 mg/L

<sup>1</sup> Einheit entsprechend des Analyten

<sup>2</sup> Prozentualer RMSEP bezogen auf die Hälfte des max. auftretenden Messwertes.

## 5.5.2 GZK

Die GZK wird mit einem RMSEP von  $0,5 \cdot 10^6$  N/mL vorhergesagt. Vom Betrag her ist der RMSEP der NIR-Vorhersage um den Faktor zwei geringer als bei der MIRS. Es wurden fünf Kultivierungen für die Kalibration und drei Kultivierung zur Validierung verwendet.

Der Fehler der Kreuzvalidierung liegt mit  $1,1 \cdot 10^6$  N/mL etwa um den Faktor zwei höher als bei der Validierung. Verschiedene Ursachen führen zu einem erhöhten RMSECV. Zum einen wurden für die Kalibration Kultivierungen verwendet, die über einen deutlich längeren Zeitraum geführt wurden. Die K09 hat eine Kultivierungszeit von über 200 h. Nach Erreichen der stationären Phase beträgt die GZK etwa  $16 \cdot 10^6$  N/mL. Die restlichen Proben der K09 werden jedoch mit einer teils deutlich höheren GZK von über  $18 \cdot 10^6$  N/mL vorhergesagt. Eine mögliche Erklärung liegt in der Tatsache, dass sich Zelltrümmer im Medium anreichern, die ebenfalls Streueffekte hervorrufen.

Die Kalibration enthält außerdem einen Ausreißer. Die vorhergesagte GZK der Probe K0839 (eingekreist Abb. 5.21 A) liegt um etwa  $4,5 \cdot 10^6$  N/mL über dem tatsächlichen Wert. Ein Fouling des Fensters kann ausgeschlossen werden, da bei den darauffolgenden Proben der K08 keine Ausreißer auftreten. Vermutlich befanden sich vorübergehend Luftblasen im Messspalt.

Für die Kalibration werden zwei Faktoren verwendet. Der Regressionskoeffizient des Modells hat eine hohe Korrelation zu dem NIR-Spektrum von Wasser (s. Abb. 5.21 B). Der RMSEP liegt bezogen zur Hälfte des max. Wertes bei 6,1 % (vgl. MIR: 11,2 %). Bei K06 wurde Glucose in mehreren Schritten dem Kulturmedium

zugegeben, ohne dass dadurch die Vorhersage der GZK beeinflusst wurde (s. Abb. 5.21 C). Demnach ist das Modell robust gegenüber plötzlichen Konzentrationsänderungen der anderen Analyten. Am Beispiel der K04 wird die Vorhersage mit der Referenz verglichen.

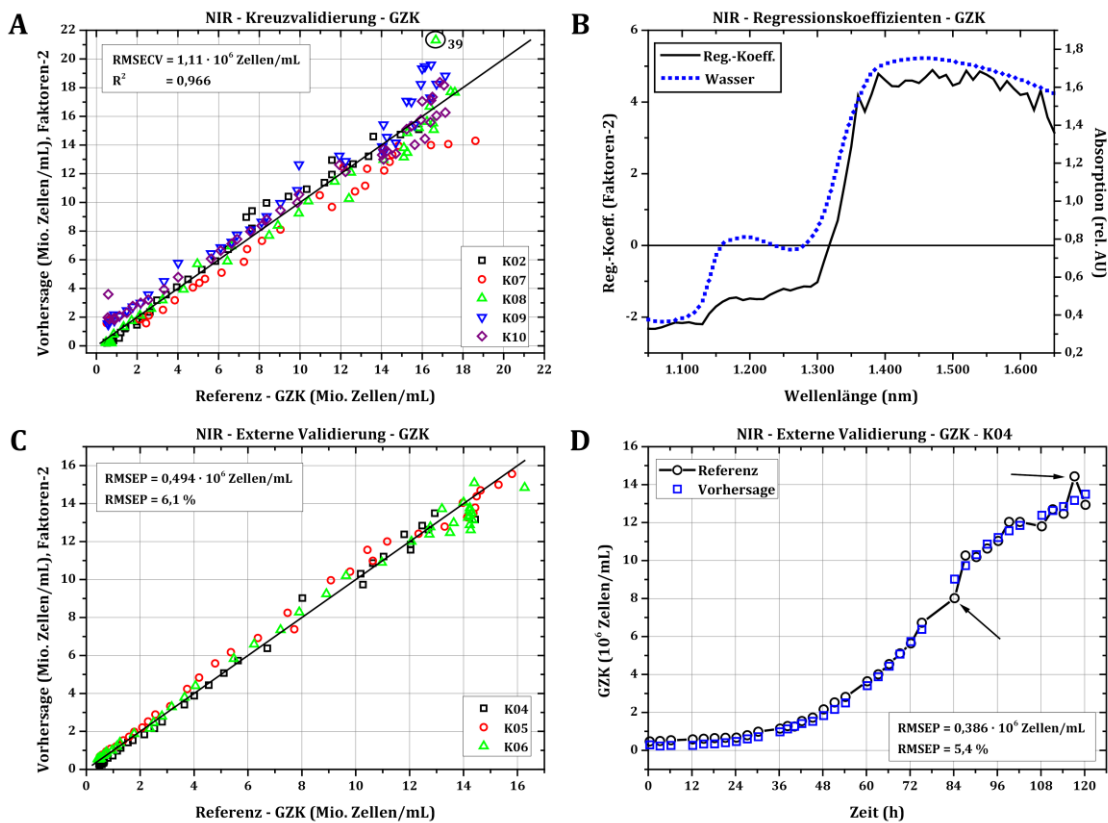


Abb. 5.21: GZK – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K04 (D).

Wird die K04 alleine betrachtet, so liegt der RMSEP unter  $0,4 \cdot 10^6$  N/mL und somit bei 5,4 % (s. Abb. 5.21 D). Die beiden in Abb. 5.21 D markierten Punkte deuten auf mögliche Ausreißer der Referenzanalytik hin. Derartige Ausreißer sind in der Vorhersage aus dem NIR-Kalibrationsmodell nicht zu erkennen. Damit ist es wahrscheinlich, dass die Bestimmung der GZK mittels NIR im Mittel einen geringeren Fehler aufweist als die Referenzanalytik.

### 5.5.3 Glucose

Für das NIR-Kalibrationsmodell von Glucose wurden die Spektren keiner Datenvorverarbeitung unterzogen. Der RMSECV ist mit etwa 1,3 g/L um das Siebenfache höher als bei dem entsprechenden MIR-Modell (vgl. Tabelle 5.3, S. 61). Modelle mit einer SNV-Vorverarbeitung ergaben höhere Vorhersagefehler. Von den acht Kultivierungen wurden fünf zur Modellerstellung genutzt, darunter auch K06. Am Ende der Kultivierung K06 wurde eine Glucose Konzentration von über 8 g/L

erreicht. Die schrittweise Zugabe von Glucose wird in der Kreuzvalidierung nicht wiedergegeben (s. Abb. 5.22 A). Die Endkonzentrationen von etwa 8 g/L Glucose werden durch die Kreuzvalidierung mit 2 bis 4 g/L Glucose vorhergesagt. An diesem Beispiel wird deutlich, dass das NIR-Modell nicht ausschließlich Glucose vorhersagt. Die Regressionskoeffizienten zeigen einen hohen Einfluss der Wellenlängen 1.150 und 1.320 nm auf das Kalibrationsmodell (s. Abb. 5.22 B). Bei 1.150 nm kann es sich entweder um die Obertöne der C–H-Schwingung oder um eine OH-Kombinationsbande von Wasser handeln [40].

Die Absorptionsbande bei 1.320 nm stimmt mit dem Referenzspektrum von Glucose überein. Hierbei handelt es sich aber nicht um die O–H-Schwingung der Hydroxyl-Gruppen von Glucose. In der Literatur werden Hydroxyl-Absorptionsbanden von Wasserstoffbrücken-gebundenen Alkoholen als breiter Peak zwischen 1.460 und 1.600 nm angegeben [40]. In der Literatur findet sich keine Angabe über eine Absorptionsbande bei 1.320 nm.

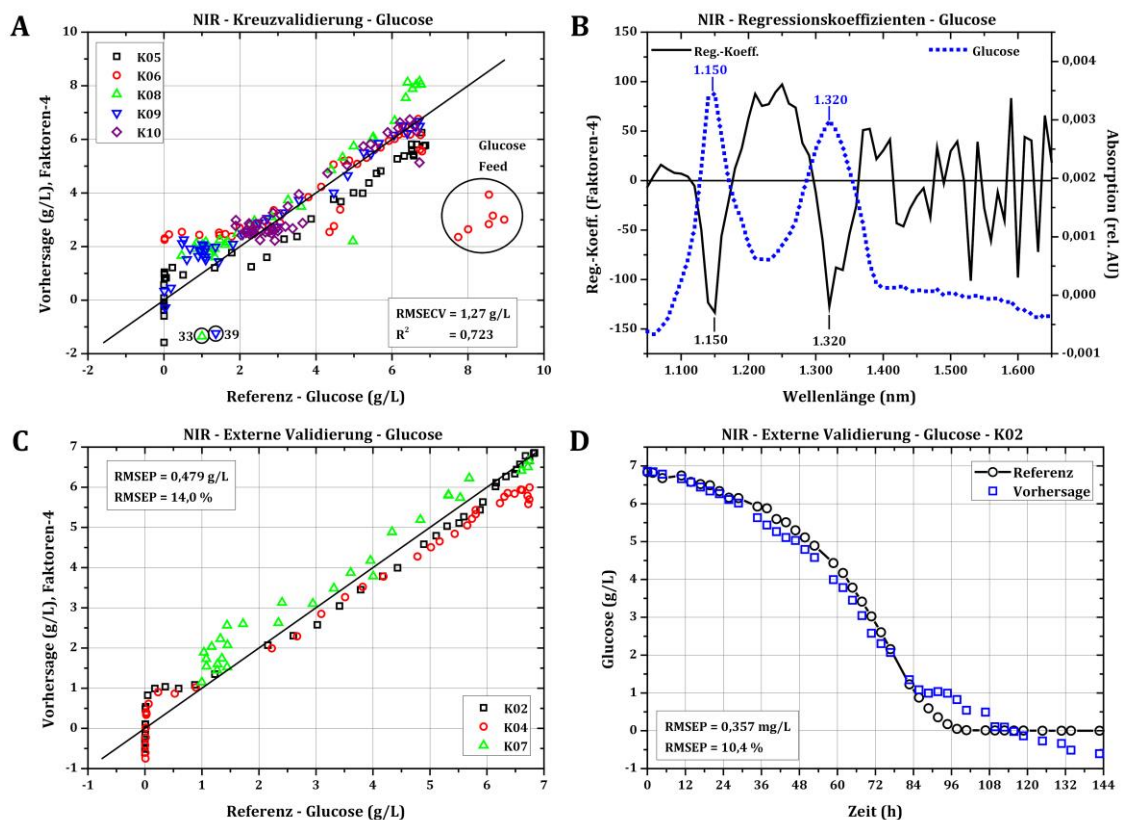


Abb. 5.22: Glucose – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektrn (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K02 (D).

Für die externe Validierung wurden die Kultivierungen K02, K04 und K07 verwendet. Der RMSEP liegt unter 0,5 g/L Glucose, womit dieser um etwa den Faktor drei höher ist als bei der MIR-Validierung. Von diesen drei CHO-Kultivierungen wurde nur bei K07 Glucose zugegeben. Die Vorhersagewerte stimmen oberhalb der Konzentration von 2 g/L mit den Referenzwerten überein.

Bei K07 wurde Glucose zwischen 1 und 1,5 g/L konstant gehalten. In diesem Bereich ist die Vorhersage ungenau und die Fehler sind teilweise  $> 1$  g/L.

Entweder ist die NIR-Methode nicht sensitiv genug, um Glucosekonzentrationen unterhalb von 2 g/L zu detektieren oder das Kalibrationsmodell wird neben Glucose auch durch andere Analyten oder Einflussgrößen bestimmt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Kreuzvalidierung ist davon auszugehen, dass Glucose nicht selektiv vorhergesagt wird, sondern zusätzlich eine Korrelation zu anderen Einflussgrößen besteht.

Ein weiteres Indiz hierfür ist die Tatsache, dass die Glucose-Vorhersage für K02 und K04 stetig abnimmt und gegen Ende der Kultivierungen negativ wird. Bei der Einzelbetrachtung der K02 wird dies verdeutlicht (s. Abb. 5.22 D). Bis etwa 1 g/L sind die Abweichungen zwischen den Vorhersage- und Referenzwerten gering. Nach etwa 84 h beginnen beide Werte voneinander abzuweichen und die Glucose-Vorhersage wird negativ.

Der RMSEP der NIR-Vorhersage ist um den Faktor drei höher als der der MIR-Vorhersage. Extreme Abweichungen vom normalen Prozessverlauf, wie bei der K06, vermag das NIR-Kalibrationsmodell nicht adäquat vorherzusagen. Anhand von Kreuzkorrelationen ist es möglich Glucose bis zu einer minimalen Konzentration von 2 g/L mit einem Fehler von unter 0,5 g/L vorherzusagen.

#### 5.5.4 Lactat

Für die Erstellung des NIR-Kalibrationsmodells für Lactat wurden Spektren ohne eine Datenvorverarbeitung verwendet. Es wurden fünf Faktoren für das PLS-Modell gewählt.

Der RMSECV liegt bei 0,5 g/L und ist somit deutlich niedriger als bei Glucose. Die Varianz zwischen der Vorhersage und der Referenz ist über den gesamten Konzentrationsbereich zwischen 0 und 4 g/l in etwa gleich (s. Abb. 5.23 A). Der geringe Fehler bei 0 g/L ist darauf zurückzuführen, dass dies der Startpunkt der Kultivierung ist. Somit ist die Varianz zwischen den einzelnen Kultivierungen zu diesem Zeitpunkt gering.

Bei den beiden batch Kultivierungen K04 und K05 fallen die Lactat-Konzentrationen gegen Ende der Kultivierung wieder. Sobald Glucose verbraucht ist, beginnen die CHO-Zellen Lactat als alternative Kohlenstoffquelle zu verwerten. Der Rückgang der Lactat-Konzentration wird vom Kalibrationsmodell nicht korrekt wiedergegeben, die Vorhersagewerte bleiben in etwa konstant (s. Abb. 5.23 A – Rechtecke). Dies deutet darauf hin, dass Lactat nicht selektiv vorhergesagt wird.

Die Regressionskoeffizienten zeigen eine Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum von Lactat bei 1.320 nm. Wie zuvor bei Glucose kann diese Bande keiner spezifischen Schwingung zugeordnet werden. Die C–H-Bande bei 1.150 nm hat keinen Einfluss auf das Kalibrationsmodell (s. Abb. 5.23 B).

Der Vorhersagefehler der externen Validierung liegt mit 0,45 g/L Lactat minimal unter dem RMSECV. Dies entspricht einem prozentualen Fehler von etwa 23 %. Von den drei Kultivierungen, die für die externe Validierung verwendet wurden, wurde nur bei K02 keine Glucose zugegeben. Sobald bei K02 die Glucose verbraucht wurde, wird Lactat als sekundäre C-Quelle verbraucht (s. Abb. 5.23 C). Ähnlich wie bei der Kreuzvalidierung vermag das Modell diesen Abfall der Lactat-Konzentration nicht vorherzusagen. Die Vorhersage bleibt konstant bei etwa 3 g/L Lactat und weicht somit gegen Ende der K02 um bis zu 1,5 g/L vom Referenzwert ab.

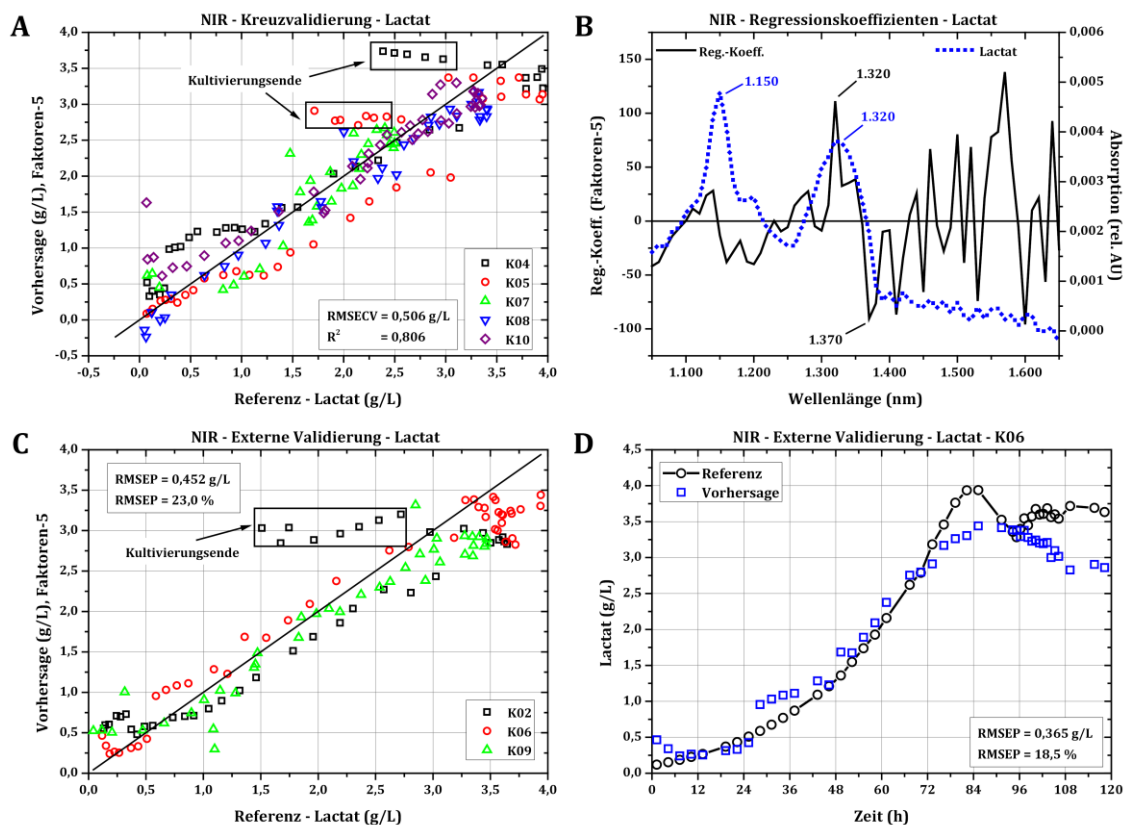


Abb. 5.23: Lactat – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K06 (D).

Damit bestätigt die externe Validierung die Annahme, dass Lactat durch das Kalibrationsmodell nicht selektiv vorhergesagt wird. Bei den „Spiking-Experimenten“ bleibt ein Rückgang der Lactat-Konzentration aus, wodurch bei diesen Kultivierungen grundsätzlich mit einem geringeren RMSEP zu rechnen ist. Am Beispiel der K06 liegt der RMSEP bei ca. 0,37 g/L und ist damit etwas geringer als der Mittelwert aus K02, K06 und K09 (s. Abb. 5.23 D).

Eine Vorhersage von Lactat ist grundsätzlich anhand von Kreuzkorrelationen möglich. Am Beispiel von batch Kultivierungen zeigen sich jedoch die Grenzen des Modells. Der Rückgang des Lactatgehaltes am Ende einer batch Kultivierung wird durch die NIRS nicht detektiert.

### 5.5.5 Viabilität

Die Viabilität wird aus dem Verhältnis zwischen den lebenden und toten Zellen gebildet. Im Zuge der Nekrose oder Apoptose ändern sich die Zellmorphologie und der Zelldurchmesser, was sich grundsätzlich auf die Lichtstreuung auswirkt. In der NIRS ist es theoretisch möglich die Viabilität als kritische Zellvariable über die Änderung des Streulichtes zu erfassen.

Für die Kalibration werden vier Faktoren eingesetzt und der RMSECV beträgt 5,78 %. Wie zuvor in Kapitel 5.4.8 (S. 70) erwähnt wurde, liegt die Problematik in der Modellerstellung für die Viabilität darin, dass Kalibrationspunkte mit einer Viabilität < 80 % unterrepräsentiert sind. Von den insgesamt 203 Kalibrationspunkten haben 11 Punkte eine Viabilität < 50 %. Die Kultivierung K09 deckt den größten Wertebereich (10 – 100 %) ab und wird deswegen für die Kalibration verwendet.

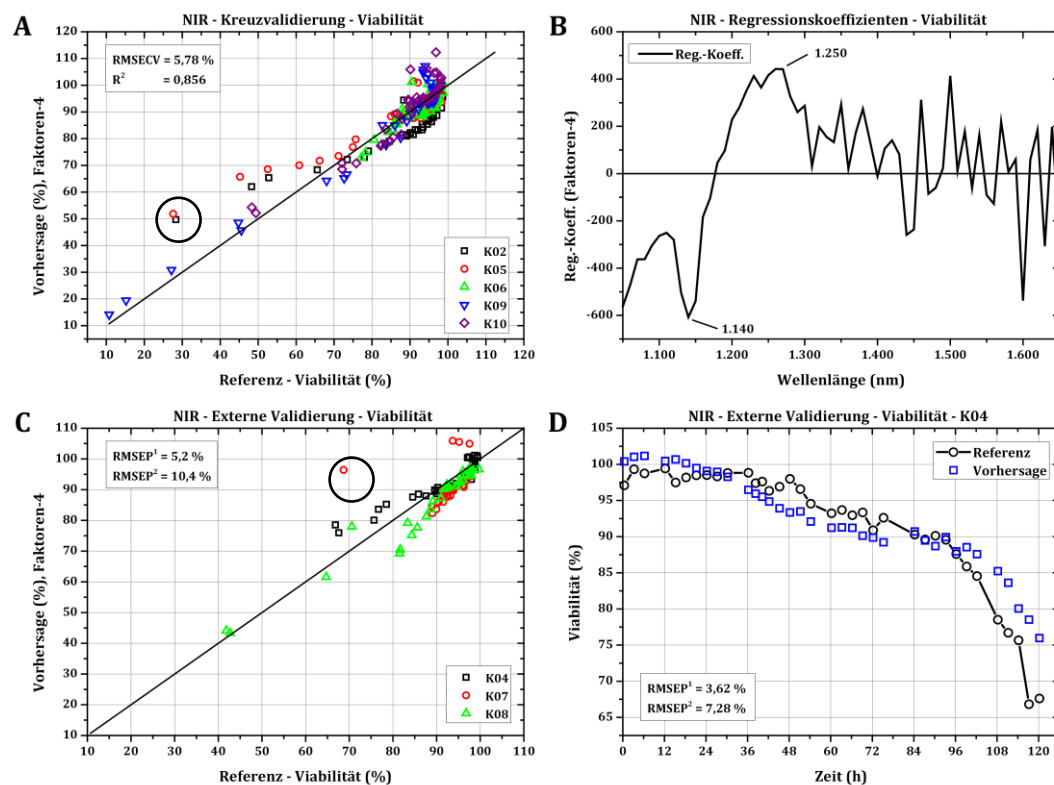


Abb. 5.24: Viabilität – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung mit Ausreißer bei K07 (C); Vorhersage gegen Referenz für K04 (D).

Bis auf K02 wird die Viabilität am Startpunkt jeder Kultivierungen in der Kreuzvalidierung mit über 100 % vorhergesagt (s. Abb. 5.24 A). Am Beispiel von K09 und K10 weichen die Vorhersagen am Endpunkt der Kultivierungen nur geringfügig vom Referenzwert ab. Im Gegensatz dazu wurden die Viabilitäten an den Endpunkten von K02 und K05 mit einem Fehler von ca. 20 % vorhergesagt. Ein

Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen besteht darin, dass bei K09 und K10 Glucose zugegeben wurde und damit der Abfall der Viabilität hinausgezögert wurde. Eine weitere Ursache für diesen Unterschied könnte in der Alterung des Mediums liegen. Für alle Kultivierungen wurde Kulturmedium aus derselben Charge des Herstellers verwendet, um Varianzen zwischen den Kultivierungen auszuschließen. Die PLS-Scores der Viabilität (s. Abb. 7.20, S. 105) deuten auf eine Zeitabhängigkeit zwischen den Score-Werten und dem Zeitpunkt der Kultivierung hin. Entlang des 2. PLS-Faktors ist eine eindeutige Reihenfolge in Abhängigkeit vom Datum der Kultivierung gegeben. Einen weiteren Hinweis auf diese Vermutung bietet eine PCA, bei der PC-1 gegen PC-4 aufgetragen ist (s. Abb. 7.16 B, S. 100).

Die Auswertung des Regressionskoeffizienten zeigt einen hohen Einfluss der Wellenlänge bei 1.140 nm auf das Kalibrationsmodell. Es handelt sich hier vermutlich um den Oberton der C–H-Schwingungen.

Bei der externen Validierung ist der Vorhersagefehler mit 5,2 % für die Viabilität etwas geringer als bei der Kreuzvalidierung (s. Abb. 5.24 C). Der markierte Messwert bei K07 entspricht nicht dem Endpunkt der K07, sondern es handelt sich hier um einen Referenzwert nach etwa 40 h Kultivierungsdauer (K0708). Hier scheint ein Fehler in der Referenzanalytik vorzuliegen. Die Referenzwerte vor und nach K0708 haben eine Viabilität von nahezu 100 %.

Am Beispiel von K04 wird die Viabilität mit einem RMSEP von < 4 % vorhergesagt (s. Abb. 5.24 D). Die Vorhersage der Viabilität kann in drei Bereiche eingeteilt werden. Während der ersten 18 h der K04 ist der Vorhersagewert mit über 100 % stets über dem des Referenzwertes. Im zweiten Bereich (36 h bis 72 h) liegen die Vorhersagewerte stets um ca. 1-2 % unter den Referenzwerten. Ab etwa 96 h liegt die Vorhersage oberhalb der Referenz. Der letzte Vorhersagewert der K04 weicht um etwa 8 % vom Referenzwert ab.

Es bleibt festzuhalten, dass die Viabilität mittels der NIRS analysiert werden kann. Der über drei Kultivierungen ermittelte RMSEP liegt bei 5,2 %. Damit ist es möglich starke Abweichungen vom Normalverhalten rechtzeitig zu erkennen.

### 5.5.6 Glutamin

Als Regel wurde vorgegeben nicht mehr als fünf Faktoren für die Modellerstellung zu verwenden. Das Kalibrationsmodell für Glutamin bildet eine Ausnahme von den restlichen Modellen. Der Validierungsfehler ist um 25 mg/L geringer, wenn anstelle von fünf acht Faktoren eingesetzt werden. Als Datenvorbehandlung wurde eine SNV verwendet.

Glutamin korreliert in seinem Verlauf stark mit Glucose und der Zellzahl. Glutamin wurde deshalb bei einer Kultivierung zugegeben, um die Korrelationen zu Glucose und der Zellkonzentration zu brechen. Der RMSECV des Kalibrationsmodells von Glutamin beträgt 115,3 mg/L mit einem Bestimmtheitsmaß von etwa 0,9 (s. Abb.

5.25 A). Die Auswertung der Kreuzvalidierung zeigt am Beispiel der K07, dass Glutamin nicht selektiv mittels der NIRS vorhergesagt werden kann. Die Zugabe von Glutamin wird bei der K07 vom Modell nicht wiedergegeben. Wird die K07 bei der Berechnung des RMSECV nicht berücksichtigt, dann verringert sich der Wert auf ca. 86 mg/L Glutamin.

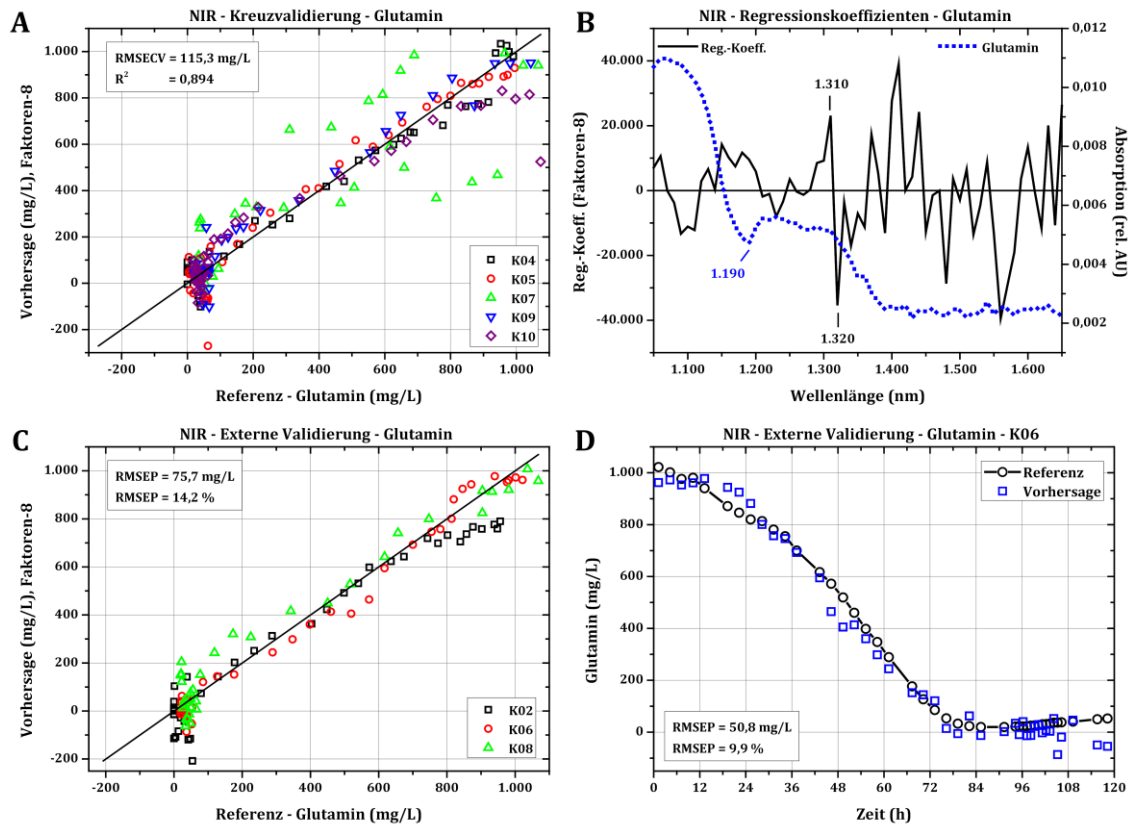


Abb. 5.25: Glutamin - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektrern (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K06 (D).

Die Regressionskoeffizienten unterscheiden sich deutlich vom Referenzspektrum (s. Abb. 5.25 B). Es gibt keine Übereinstimmung zwischen den Banden bei 1.310 nm und 1.320 nm und dem Referenzspektrum. Die Ergebnisse aus der Kreuzvalidierung sowie der Regressionskoeffizienten bestätigen, dass das Kalibrationsmodell auf Kreuzkorrelationen beruht.

Die externe Validierung beruht auf den Daten der K02, K06 und K08. Glutamin wird mit einem RMSEP von ca. 76 mg/L (14,2 %) vorhergesagt (s. Abb. 5.25 C). Der RMSEP ist um ca. 40 mg/L Glutamin geringer als der RMSECV. Dies liegt daran, dass bei keiner dieser drei Kultivierungen Glutamin zugegeben wurde. Die Abweichungen zwischen den Referenz- und Vorhersagewerten sind bei Glutamin-Konzentrationen zwischen 200 und 800 mg/L am geringsten. Demnach ist die Varianz zwischen den Kultivierungen zu Beginn und am Ende höher. Wird die K06 für sich betrachtet, so liegt der RMSEP bei ca. 51 mg/L Glutamin (s. Abb. 5.25 D).



Obwohl gegen Ende der K06 Glucose hinzugegeben wurde, wird die Glutamin-Vorhersage dadurch nicht beeinträchtigt.

Aufgrund der geringen Glutamin-Konzentrationen ist es mittels NIRS möglich Glutamin basierend auf Kreuzkorrelation vorherzusagen. Für Batch-Kultivierungen, mit und ohne Glucose-Feed, sollte es demzufolge möglich sein, Glutamin vorherzusagen. Ein Glutamin-Feed mittels der NIRS zu überwachen oder zu kontrollieren ist nicht möglich.

### 5.5.7 Glutamat

Der Konzentrationsbereich von Glutamat liegt zwischen 10 – 320 mg/L. Wie zuvor bei Glutamin, kann ein Kalibrationsmodell nur auf Grundlage von Kreuzkorrelationen erstellt werden.

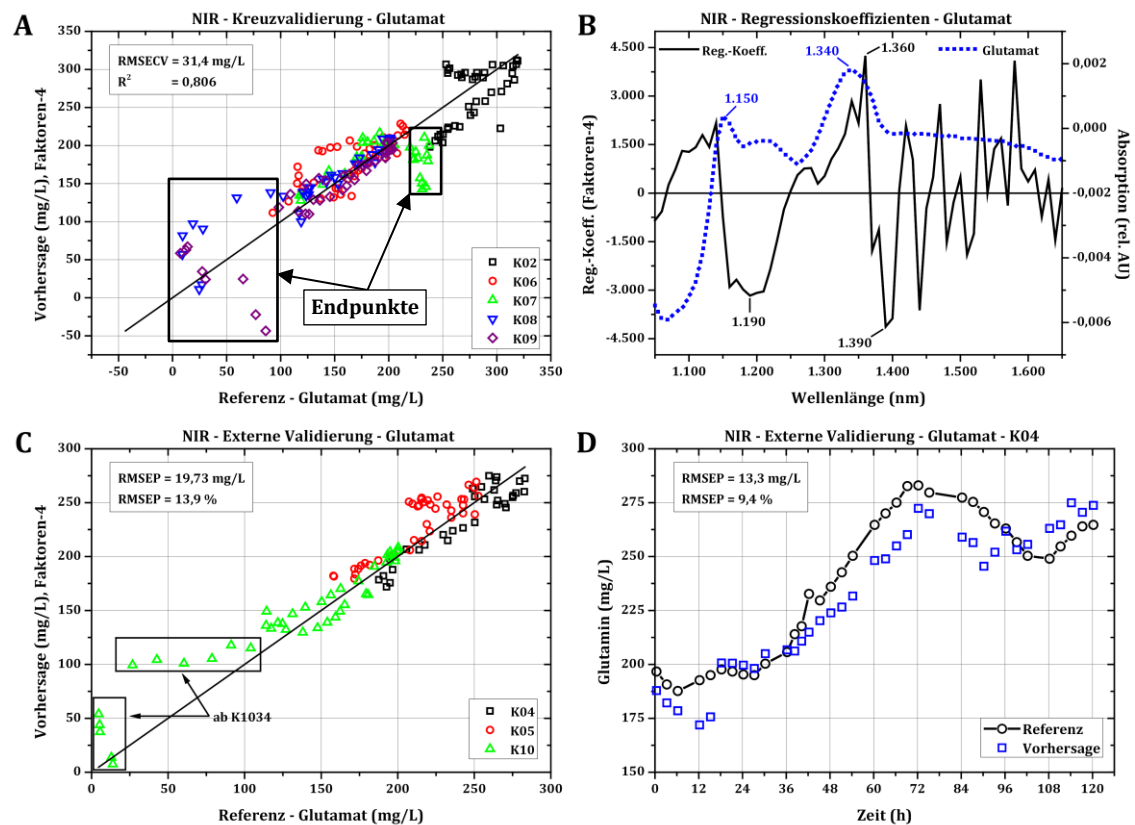


Abb. 5.26: Glutamat - Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K04 (D).

Die NIR-Spektren wurden für das Kalibrationsmodell von Glutamat SNV vorverarbeitet und für das Modell wurden vier PLS-Faktoren eingesetzt. Der RMSECV von Glutamat beträgt 31,4 mg/L und ist damit vergleichbar mit dem des MIR-Modells (s. Kapitel 5.4.6, S. 67 ff.). Die Glutamat-Konzentrationen variieren teilweise zwischen den Kultivierungen. Bei K02 liegt die Anfangskonzentration bei etwa 240 mg/L und erreicht ein Maximum von ca. 320 mg/L Glutamat. Die Anfangskonzentrationen der restlichen Kultivierungen im Kalibrationsmodell betragen etwa 120 mg/L. Somit

unterscheidet sich die K02 deutlich von den übrigen Kultivierungen (s. Abb. 5.26 A). Als Nebenprodukt des Glutamin-Stoffwechsels nimmt die Konzentration von Glutamat bei der K07 nach dem Glutamin-Feed zu. Das Kalibrationsmodell vermag diesen Verlauf in der Kreuzvalidierung nicht wiederzugeben. Auch die starke Abnahme der Glutamat-Konzentration am Ende der K08 und K09 wird bei der Kreuzvalidierung mit einer Abweichung von bis zu 150 mg/L beschrieben.

Anhand der Regressionskoeffizienten lässt sich ein hoher Einfluss der Absorptionsbanden bei 1.190, 1.360 und 1.390 nm auf das Modell erkennen (s. Abb. 5.26 B). Eine Übereinstimmung mit dem Referenzspektrum von Glutamat ist nicht gegeben. Es ist daher anzunehmen, dass das Kalibrationsmodell für Glutamat genau wie bei Glutamin auf Kreuzkorrelationen beruht.

Die externe Validierung anhand der Daten von K04, K05 und K10 ergibt einen RMSEP von ca. 20 mg/L Glutamat (13,9 %). Bei K04 und K05 erreicht Glutamat eine maximale Konzentration von  $\geq 250$  mg/L, wohingegen bei K10 Glutamat eine Konzentration von 200 mg/L nicht übersteigt (s. Abb. 5.26 C). Der Vorhersagefehler nimmt gegen Ende der Kultivierungen zu, wobei dieser Trend bei K10 am deutlichsten ausfällt. Die K10 unterscheidet sich von der K04 und K05 dahingehend, dass Glucose zugegeben wurde. Diese Varianz könnte ein Grund für die Zunahme des Vorhersagefehlers gegen Ende der K10 sein.

Am Beispiel der K04 wird die Glutamat-Konzentration der Referenz sowie der Vorhersage in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer abgebildet (s. Abb. 5.26 D). Mit 13,3 mg/L ist der RMSEP der externen Validierung deutlich niedriger als bei der entsprechenden MIR-Auswertung (s. Kapitel 5.4.6, S. 67 ff.).

Wegen der geringen Glutamat-Konzentrationen von unter 350 mg/L ist eine Vorhersage mittels NIRS nur anhand von Kreuzkorrelationen möglich. Die Vorhersagefehler sind während der ersten zwei Drittel jeder Kultivierung am geringsten und nehmen erst gegen Ende einer Kultivierung zu. Bei der K10 ist dieser Effekt deutlicher ausgeprägt.

### 5.5.8 Ammonium

Dem Kalibrationsmodell von Ammonium liegen SNV vorverarbeitete Spektren zu Grunde. Mit drei PLS-Faktoren wird Ammonium mit einem RSMECV von 21,4 mg/L vorhergesagt. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibration beträgt 0,59 (s. Abb. 5.27 A). Dies ist vom Betrag her das kleinste  $R^2$  von allen Kalibrationsmodellen. Die Vorhersagefehler bei der K02 und K07 sind gegenüber der restlichen Kultivierung im Kalibrationsmodell von Ammonium erhöht.

Die K02 ist die erste Kultivierung und möglicherweise unterscheiden sich die frühen Kultivierungen (K02, K04 und K05) von den späteren (ab K06). In abgeschwächter Form tritt dies auch bei der externen Validierung auf (K04 und K05). Bei K07 wird die Abweichung auf die Glutamin-Zugabe zurückgeführt. Als Nebenprodukt der

Glutaminolyse bildet sich Ammonium. Bei K07 wurde Glutamin nach etwa 60 h Kultivierungsdauer zugegeben. Infolgedessen stieg die Konzentration von Ammonium (140 mg/L) überdurchschnittlich stark an. Der Zeitpunkt des Glutamin-Feeds ist in der Kreuzvalidierung markiert. Ab dem Zeitpunkt der Glutamin-Zugabe nimmt der Fehler der Ammonium-Vorhersage zu und dies resultiert in einem kleinen Bestimmtheitsmaß.

Die Gegenüberstellung der Regressionskoeffizienten mit dem Referenz-Spektrum von Ammonium ergibt eine Übereinstimmung bei 1.120 nm (s. Abb. 5.27 B). Eine genauere Untersuchung der Loadings zeigt, dass bei allen drei Faktoren die Absorption bei 1.330 nm einen deutlichen Einfluss auf das Modell hat.

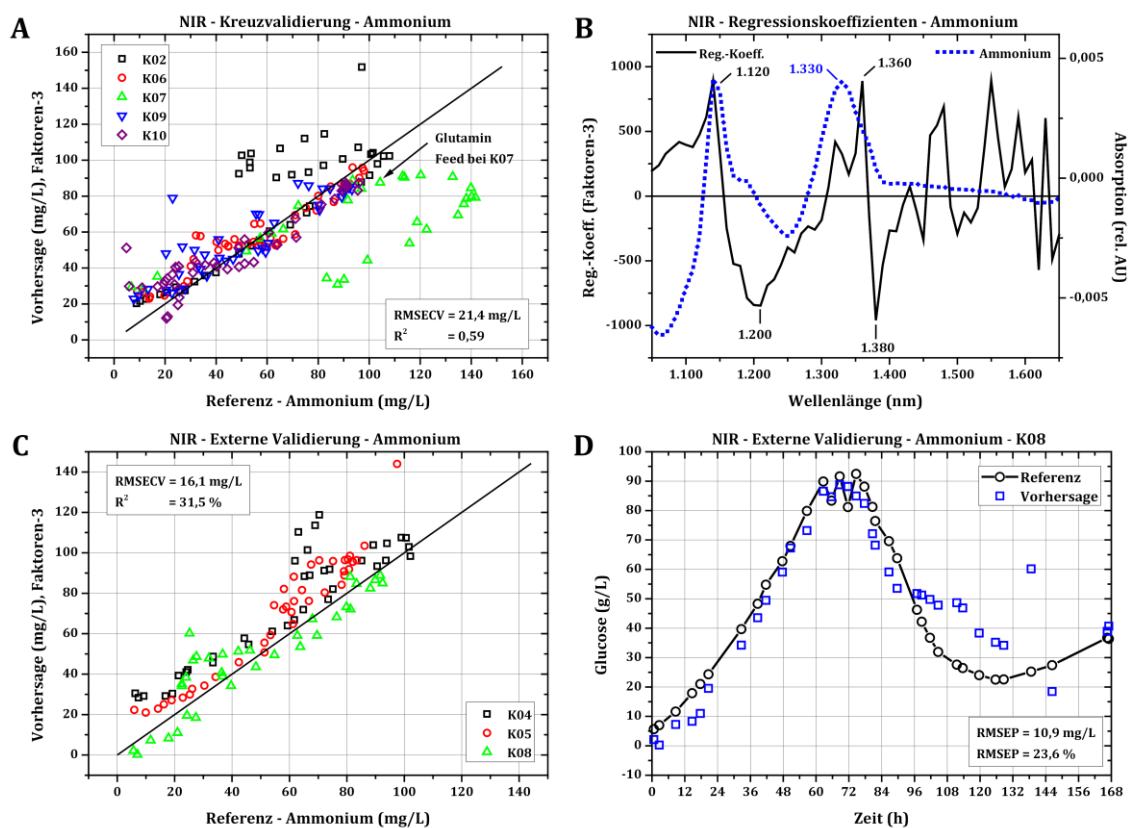


Abb. 5.27: Ammonium – Kreuzvalidierung (A); Vergleich Regressionskoeffizienten und Referenzspektren (B); externe Validierung (C); Vorhersage gegen Referenz für K08 (D).

Für die externe Validierung wurden die K04, K05 und K08 eingesetzt. Der Konzentrationsbereich von Ammonium erstreckt sich bei diesen drei Kultivierungen von ca. 5 – 100 mg/L. Der RMSEP ist mit 16,1 mg/L um etwa 5 mg/L niedriger als bei der Kreuzvalidierung. Während des exponentiellen Wachstums steigt die Konzentration von Ammonium an und erreicht nach dem Verbrauch von Glutamin ein Maximum. Nach Durchlaufen des Maximums nimmt der Vorhersagefehler von Ammonium zu.

Wie für die Analyten Glutamin und Glutamat bezieht sich das Kalibrationsmodell von Ammonium auf Kreuzkorrelationen. Die Varianzen zwischen den

Kultivierungen sind gegen Ende höher, was sich in einer Zunahme des Vorhersagefehlers von Ammonium ausdrückt. Dieser Effekt tritt verstärkt bei den beiden früheren Kultivierungen K04 und K05 auf.

Am Beispiel der K08 ist der Referenz- und Vorhersagewert von Ammonium gegen die Zeit aufgetragen. Nur für die K08 liegt der RMSEP bei 10,9 mg/L Ammonium (s. Abb. 5.27 D). Werden nur die Messwerte bis 78 h Kultivierungsdauer in die RMSEP-Berechnung einbezogen, so liegt der Vorhersagefehler bei 5,7 mg/L. Nach 96 h Kultivierungszeit und zweifacher Zugabe von Glucose, nimmt der Vorhersagefehler zu.

Als Ergebnis wird festgehalten, dass Ammonium über die NIRS vorhergesagt werden kann. Das Kalibrationsmodell ist auf Kreuzkorrelationen gestützt und die Vorhersagefehler sind während des exponentiellen Wachstums klein. Gegen Ende der Kultivierungen nehmen die Varianzen zwischen einzelnen Kultivierungen zu und gleichzeitig nimmt der Vorhersagefehler zu.

### 5.5.9 Zusammenfassung

Die dargelegten Ergebnisse haben ergeben, dass es grundsätzlich möglich ist die Zellvariablen und Analyten mittels der NIRS inline zu verfolgen. Wegen der größeren Schichtdicke haben neben den chemischen Absorptionen die Streueffekte einen starken Einfluss auf das gemessene Spektrum.

Somit ist es möglich die GZK direkt aus dem Spektrum zu ermitteln. Der RMSEP der GZK beträgt  $0,5 \cdot 10^6$  N/mL und es wurde gezeigt, dass ein Glucose-Feed die Vorhersage der GZK nicht beeinträchtigt. Glucose und Lactat werden mit einem Fehler von 0,479 g/L bzw. 0,452 g/L vorhergesagt. Die Analyse dieser beiden Kalibrationsmodelle hat gezeigt, dass die Modelle nicht ausschließlich die Informationen der jeweiligen Analyten im Spektrum verwenden, sondern auch Kreuzkorrelationen berücksichtigen. So wird zum einen der Glucose-Feed bei der K06 in der Kreuzvalidierung nicht erfasst (s. Abb. 5.22 A, S. 76) und zum anderen werden die Lactat-Konzentrationen zum Ende der ersten Kultivierungen mit einem hohen Fehler vorhergesagt (s. Abb. 5.23 C, S. 78).

Die Konzentrationen der restlichen Analyten sind zu gering, weshalb eine Kalibration basierend auf den Absorptionen der Analyten nicht möglich ist. Die einzelnen Kalibrationsmodelle basieren auf Kreuzkorrelationen und die Vorhersagen sind während des exponentiellen Wachstums valide. Durch die verschiedenen Glucose-Zugaben und der Optimierung der Kultivierungsparameter wurden weitere Varianzen eingeführt, um die Robustheit der Modelle zu testen. Dies wirkt sich vor allem auf den Vorhersagefehler gegen Ende einer Kultivierung aus. Bei Glutamin, Glutamat und Ammonium nimmt der Vorhersagefehler am Ende einer Kultivierung zu. Des Weiteren hat die Zugabe von Glutamin ergeben, dass das Kalibrationsmodell nicht in der Lage ist diese zusätzlichen Varianzen zu

kompensieren. Somit ist es nicht möglich einen Glutamin-Feed mit Hilfe der NIRS vorherzusagen oder zu regeln.

Inwieweit die Viabilität mittels der NIRS inline vorhergesagt werden kann ist unklar. Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass es grundsätzlich möglich ist die Viabilität direkt zu messen. Für eine abschließende Beurteilung fehlt eine ausreichende Datengrundlage, insbesondere Daten bei niedrigen Viabilitäten.

## 6 Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potenzial der MIRS und NIRS zur inline Überwachung von CHO-Kultivierungen erfolgreich evaluiert.

Beginnend mit einer Vorversuchsreihe wurden die Einflüsse der drei Reaktorparameter Temperatur, Begasungsrate und Rührerdrehzahl auf die MIR- und NIR-Spektren untersucht und ausgewertet. Sowohl bei der MIRS als auch bei der NIRS hat die Temperatur den größten Einfluss auf die aufgenommenen Spektren. Darüber hinaus haben diese Vorversuche gezeigt, dass die NIR-Messtechnik sensibler auf Änderungen der Begasungsrate und Rührerdrehzahl reagiert.

Im nächsten Schritt wurden die Detektionsgrenzen (LOD und LOQ) beider Messmethoden für Glucose ermittelt. Sämtliche Referenzspektren wurden im Bioreaktor bei konstanter Temperatur aufgenommen. Bis auf die Glucose-Konzentration, welche über die Einwaage vorgegeben wurde, wurden alle anderen Parameter konstant gehalten. Unter idealen Bedingungen betragen die Detektionsgrenzen der MIRS 0,02 g/L (LOD) bzw. 0,06 g/L (LOQ) für Glucose. Damit sind die Detektionsgrenzen um etwa den Faktor 10 kleiner als der LOD und LOQ der NIRS.

Im letzten Teil der Vorversuchsreihe wurden synthetische Standards vermessen, die neben Glucose weitere Analyten enthielten. Neben den Analyten wurden zusätzlich die Reaktorparameter Temperatur, Begasungsrate und Rührerdrehzahl variiert. Die einzelnen Konzentrationsstufen wurden so vorgegeben, dass keine Korrelation untereinander besteht.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen einen hohen Einfluss der Reaktorparameter auf die NIRS. Eine Auswertung der NIR-Daten war für die einzelnen Analyten wegen der Vielzahl der Varianzen, insbesondere wegen der unterschiedlichen Reaktorparameter, nicht möglich. Die Varianzen der Reaktorparameter hatten einen viel größeren Einfluss auf die Modelle als die Konzentrationsunterschiede der Analyten. Einzige Ausnahme bildet der Analyt Ammonium, für den ein NIR Kalibrationsmodell erstellt werden konnte. Die NIR Kalibrationsmodelle der übrigen Analyten hatten hohe Vorhersagefehler und waren nicht valide. Im Gegensatz dazu beeinflussen die variierenden Reaktorparameter die MIR-Messungen kaum. Für die MIRS konnten valide Modelle erstellt werden und somit die LOD und LOQ für Glucose, Lactat und Ammonium berechnet werden. Der LOQ von Glucose liegt bei 0,47 g/L und ist somit um den Faktor 8 höher als bei der Bestimmung aus einer reinen Glucose-Lösung.

Insgesamt wurden bei der Versuchsreihe mit den synthetischen Standards acht Variablen geändert. Die Datengrundlage war nicht umfassend genug, um valide NIR-Kalibrationsmodelle erstellen zu können.

Einer der Hauptteile dieser Arbeit bestand darin eine reproduzierbare Kultivierung von CHO-Zellen im 10-L-Maßstab zu etablieren. Diese Kultivierungen bilden die Datengrundlage für die Evaluierung der MIRS und NIRS. Die erfolgreiche Etablierung einer reproduzierbaren CHO-Kultivierung wird anhand des Verbrauchsprofils von Glucose bzw. des Zellwachstums während der batch Phase bestätigt. Ab der Kultivierung K06 wurde die Begasungsstrategie optimiert sowie während oder nach der exponentiellen Wachstumsphase wurde Glucose und Glutamin zugegeben. Durch diese Spiking-Experimente wurden gezielt Varianzen zwischen den Kultivierungen erzeugt, um damit die Robustheit der Kalibrationsmodelle zu erhöhen.

Die Ergebnisse der MIRS haben ergeben, dass Glucose und Lactat selektiv quantitativ vorhergesagt werden können. Der durchschnittliche Modellfehler aus drei Kultivierungen lag für Glucose und Lactat  $< 0,2$  g/L. Durch die Spiking-Experimente konnten die Korrelationen zwischen den Glucose- und Lactat-Verläufen erfolgreich durchbrochen werden und beide Analyten unabhängig voneinander vorhergesagt werden. Für die übrigen Analyten und Zellparameter wurden drei Kultivierungen für die Modellerstellung und eine für die Validierung verwendet. Dies war nötig, da der dafür notwendige Bereich des MIR-Spektrums durch Wasserdampfbanden gestört war. Glutamin, Glutamat und Ammonium treten in zu geringen Konzentrationen auf, als dass diese durch die MIRS selektiv detektiert werden können. Anhand von Kreuzkorrelationen war es dennoch möglich die Analyten vorherzusagen. Diese Modelle sind jedoch weniger robust als die Modelle für Glucose und Lactat. Geringfügige Änderungen können dazu führen, dass die Genauigkeit der Vorhersage deutlich abnimmt. Am Beispiel von Glutamin wurde gezeigt, dass ein Feed von Glutamin durch das Kalibrationsmodell nicht wiedergegeben wird.

Die ATR-Messtechnik der MIRS hat eine Eindringtiefe von 1-2  $\mu\text{m}$ , weswegen eine direkte Messung der Zellkonzentration anhand des Streulichts nicht möglich ist. Dennoch war es möglich anhand von Kreuzkorrelationen die Zellkonzentration sowie die Viabilität mit einem geringen RMSEP vorherzusagen. Geänderte Bedingungen bei der Kultivierung, wie z. B. ein Glucose-Feed, resultieren in einem deutlich erhöhten RMSEP. Wird ein Modell basierend auf Kreuzkorrelationen entwickelt, so ist es weniger robust und muss stets kontrolliert werden.

Die Transflexionsmessungen mittels NIRS ermöglichen neben der Vorhersage der Analyten Glucose und Lactat eine robuste Vorhersage der Zelldichte. Mit einem RMSEP von  $0,5 \cdot 10^6$  N/mL ist die NIR-Vorhersage der Zellkonzentration um den

Faktor zwei kleiner als bei der MIRS und liefert, auch nach einem Glucose-Feed, präzise Vorhersagen.

Der RMSEP für Glucose und Lactat beträgt jeweils etwa 0,5 g/L und ist um den Faktor 2,5 höher als bei der MIRS. Erwartungsgemäß hat die NIRS einen höheren LOD und LOQ, was bei den NIR-Vorhersagen von Glucose und Lactat ersichtlich ist. Fällt Glucose unter 1 g/L streuen die Vorhersagewerte deutlich. Ein weiterer Grund ist, dass das Kalibrationsmodell für Glucose, trotz der Spiking-Experimente, nicht selektiv ist. Die NIR-Vorhersage von Glucose stützt sich weiterhin auf die Zellzahl. Bei der Kultivierung K07 wurde Glucose stufenweise von 0 – 9 g/L erhöht und der Konzentrationsanstieg der Glucose wird in der Kreuzvalidierung mit einem hohen Fehler vorhergesagt. Die restlichen Metabolite Glutamin, Glutamat und Ammonium sind von der Konzentration her zu gering, als dass diese anhand direkter spektraler Informationen quantifiziert werden können.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass beide Systeme für die Überwachung von Zellkultivierungen eingesetzt werden können. Die MIRS ist hinsichtlich der Selektivität und Präzision bei niedrigeren Konzentrationen klar im Vorteil. Andererseits ermöglicht die NIRS bei der Messung in Transflexion eine robuste Vorhersage der Zellkonzentration. Beide Infrarot-Messtechniken sind ausgereift und bieten von der Gerätetechnik wenig Verbesserungspotential.

In einer anderen Arbeit wurde die Etablierung einer automatischen Probenahme vorgestellt [60]. Durch eine Automatisierung würde die Fehlerquelle Mensch eliminiert werden, wodurch ein robusteres Kalibrationsmodell möglich wäre. Für eine robuste Vorhersage von Glutamin mittels MIR war die Datengrundlage nicht ausreichend. Zusätzliche Kultivierungen inklusive Spiking-Experimente mit Glutamin könnte dazu beitragen Glutamin trotz der niedrigen Konzentrationen vorherzusagen.

Ein Thema, welches in dieser Arbeit nicht behandelt wurde, ist die Frage bezüglich der Langzeitstabilität der Kalibrationsmodelle sowie deren Übertragbarkeit von einem Spektrometer auf ein baugleiches System. Für einen industriellen Einsatz ist es wirtschaftlich von Vorteil, wenn für jeden Produktionsstandort bzw. Spektrometer ein globales Kalibrationsmodell für eine Applikation verwendet werden kann. Um dies zu untersuchen müssten Kultivierungen in zwei baugleichen Reaktoren durchgeführt werden und mit zwei Spektrometern der gleichen Baureihe und Sonden untersucht werden.



## 7 Anhang

### 7.1 Theorie

#### 7.1.1 Diodenarray und optisches Gitter

Im Gegensatz zu den FT-IR-Spektrometern besteht ein Diodenarray-Spektrometer aus einem optischen Gitter und einer Diodenarray.

Im NIR-Bereich werden Diodenarrays aus InGaAs (Indium-Gallium-Arsenid) verwendet, die bis zu einer Wellenlänge von ca. 2.000 nm eingesetzt werden können. Das Funktionsprinzip einer Diode ist im folgenden Schema dargestellt (s. Abb. 7.1.)

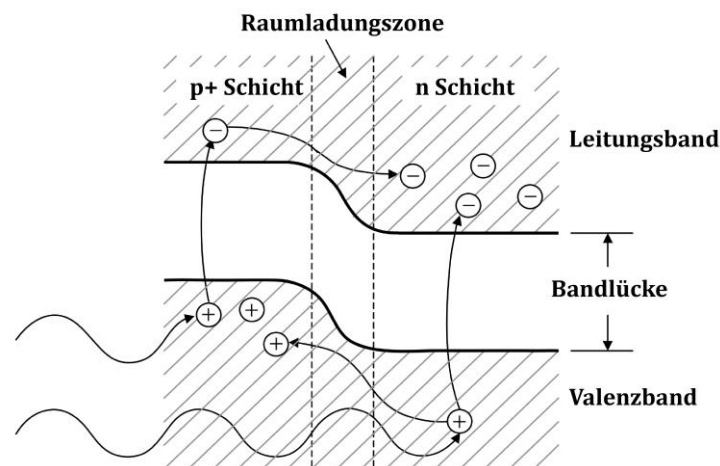


Abb. 7.1: Schema des pn-Übergangs eines Halbleiters [29]

Ein Vorteil gegenüber FT-IR-Spektrometern liegt darin, dass keine beweglichen Teile eingesetzt werden und Messzeiten in der Größenordnung von Millisekunden möglich sind. Im Gegenzug ist die spektrale Auflösung eines Diodenarray-Spektrometers durch das optische Gitter und die Diodenarray fest vorgegeben.

Ein weiterer Nachteil eines Diodenarray-Spektrometers liegt darin, dass das Licht durch das optische Gitter gespalten wird. Somit trifft nicht die gesamte Lichtintensität von der Quelle auf den Detektor, sondern nur auf eine der vielen Dioden der Array. Hierdurch verringert sich das Signal-Rausch-Verhältnis.

#### 7.1.2 Mutarotation – Glucose

Werden Standards mit Glucose angesetzt und spektroskopisch vermessen, müssen diese mehrere Stunden vor der Messung angesetzt werden. Grund dafür ist die als Mutarotation bezeichnete Änderung der Molekülstruktur bei Hexosen [48]. In

kristalliner Form liegt Glucose als ein bestimmtes Stereoisomer vor. Beim Lösen in Wasser, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucose, mit einem Verhältnis von  $\alpha:\beta = 38:62$ , aus (s. Abb. 7.2).

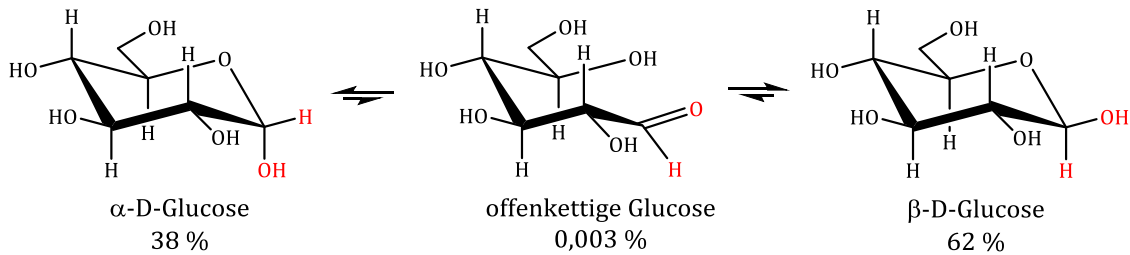


Abb. 7.2: Mutarotation der D-Glucose und der damit verbundenen Gleichgewichtsreaktion zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucose [48], [56].

Beide Anomere können mittels der MIRS und NIRS unterschieden werden [57], [58], weswegen bei allen Versuchen darauf geachtet werden muss, dass der Gleichgewichtszustand erreicht wird. In der Literatur [48] wird eine Dauer von etwa 3 h angegeben bis sich ein Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucose eingestellt hat. Diese Zeitdauer konnte durch eine eigene Versuchsreihe bestätigt werden.

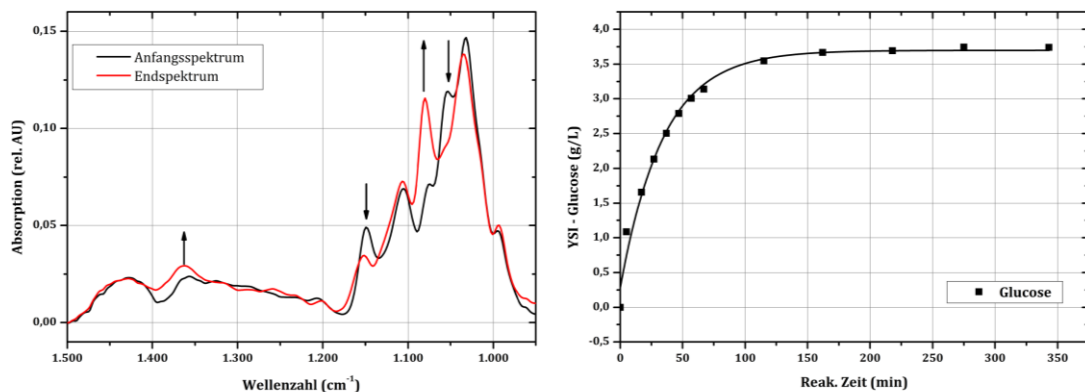


Abb. 7.3: MIR-Spektrum Glucose direkt nach Lösungsvorgang und nach Erreichen des Gleichgewichtes (links); zeitliche Änderung der Konzentration einer frisch angesetzten Glucose-Lösung (rechts)

Für jeden Ansatz wurde die entsprechende Glucosemenge 24 h vor der Messung in etwa 500 mL vollentsalztem (VE) Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert. Vor jeder Messung wurden die Lösungen auf 5 L verdünnt (Messkolben) und sofort in den Reaktor überführt, temperiert und bei Standardparametern (37 °C, 0,3 L/min, 200 rpm) vermessen.

## 7.2 Ergebnisse – Vorversuche

### 7.2.1 LOD und LOQ für Glucose – 5 mm NIR

Das PLS-Modell für das NIR mit 5 mm Messspalt benötigt insgesamt fünf Faktoren. Der 1. Faktor beschreibt 77,65 % der spektralen Varianz, aber lediglich 19,4 % der Glucose. Erst der 2. Faktor beschreibt den vorwiegenden Anteil der Glucose-Varianz. Bei genauerer Betrachtung zeigen die PLS-Scores zwei getrennte Gruppen (s. Abb. 7.4), die sich den jeweiligen Messtagen zuordnen lassen.

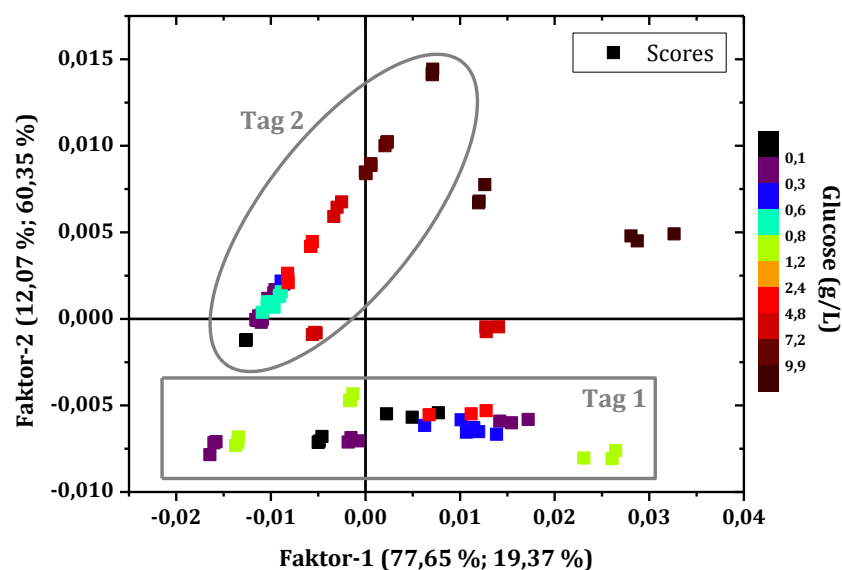


Abb. 7.4: PLS-Scores des Kalibrationsmodells von Glucose für das 5 mm NIR (SNV).

Im Rechteck eingerahmt befinden sich die Spektren der Proben, die am ersten Tag gemessen wurden. Deren Verteilung entlang des 1. Faktors korreliert nicht mit der Konzentration von Glucose. Die eingekreisten Scores der Spektren vom zweiten Tag zeigen einen Verlauf entlang der Winkelhalbierenden. Die nicht markierten Scores gehören ebenfalls zu Tag 1, unterscheiden sich jedoch stark von den restlichen Scores. Von Tag 1.

Das Loading des 1. Faktors weist einen starken Einfluss der Wellenlänge zwischen 1.330 bis 1.350 nm auf. Die Ursache für diesen Unterschied in den Messtagen ist unklar. Ein Fehler bei der Einwaage kann ausgeschlossen werden, da sonst beide NIR (1 mm und 5 mm) betroffen gewesen wären. Beide NIR-Spektrometer wurden zudem gleichzeitig am Reaktor betrieben, in gleicher Höhe in Relation zum Rührer sowie Ringsparger.

Ein Vergleich der Mittelwertabweichung der NIR-Spektren vom ersten Tag und vom zweiten Tag zeigt, dass die Abweichungen an Tag 1 größer waren als an Tag 2.

Demnach streuten die Messungen am ersten Tag stärker als am zweiten Tag. Wodurch die Streuungen verursacht wurden konnte nicht geklärt werden. Deshalb wurden die Ergebnisse aus dem PLS-Modell für das 5 mm NIR-Spektrometer nicht in die Auswertung übernommen.

## 7.2.2 Reinstspektren

Von jedem Analyten wurden Reinstspektren angefertigt. Hierzu wurde jeder Analyt einzeln in VE-Wasser gelöst und mittels MIRS und NIRS vermessen. Reinstspektren helfen bei der Validierung eines Kalibrationsmodells, indem diese mit den Loadings oder den Regressionskoeffizienten verglichen werden.

Anhand der Reinstspektren lassen sich die exakten Positionen der Absorptionsbanden eines Analyten ohne Interferenz durch andere Analyten identifizieren. Die Reinstspektren der Analyten Glucose, Lactat, Ammonium, Glutamat und Glutamin sind für das MIR in Abb. 7.5 und für das NIR in Abb. 7.6 gezeigt.

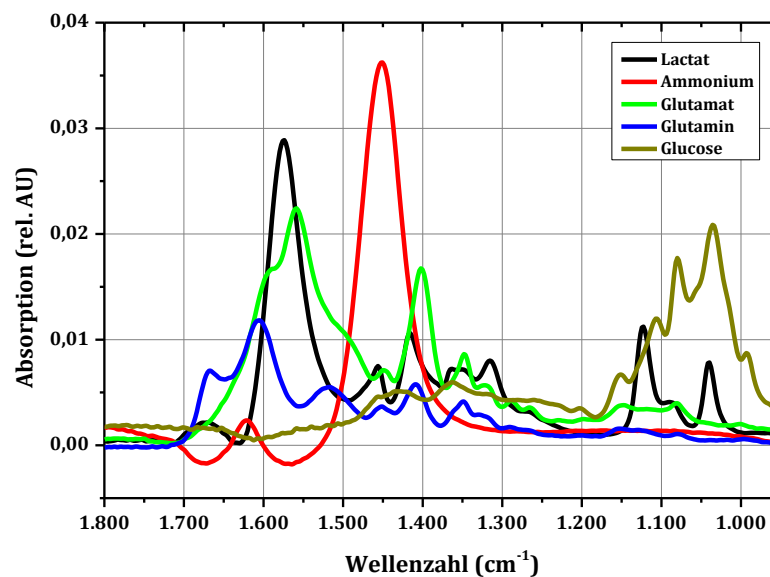


Abb. 7.5: MIR-Reinstspektren der Analyten Glucose, Lactat, Ammonium, Glutamat und Glutamin.

Die Absorptionen der NIR-Spektren oberhalb von 1,400 nm sind annähernd 0. In diesem Bereich gibt es keine Änderungen zwischen den Spektren, da hier eine Totalabsorption vorliegt. Die jeweiligen Spektren zeigen zwischen 1,400 und 1,650 nm keine typische spektrale Information, sondern ein Rauschen vom Detektorsignal.

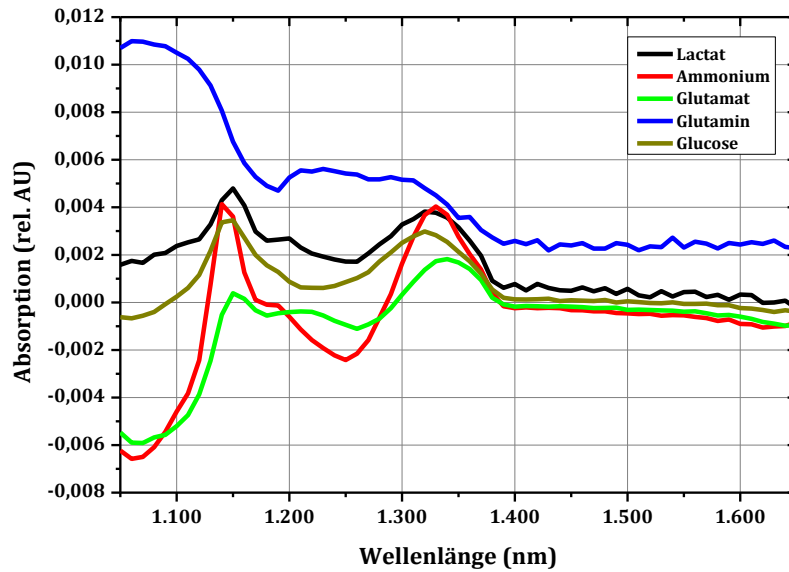


Abb. 7.6: NIR-Reinstspektren der Analyten Glucose, Lactat, Ammonium, Glutamat und Glutamin.

### 7.2.3 Versuchsplan – MIR - Reaktorparameter

Alle Modelle bezüglich der Reaktorparameter beziehen sich auf den Spektralbereich zwischen  $1800 - 950 \text{ cm}^{-1}$  – dem sogenannten fingerprint-Bereich. Wie bereits die qualitativen Untersuchungen in Kapitel 4.1 zeigten, wird die MIR-Messung im BIOSTAT® Cplus nur von der Temperatur beeinflusst. Begasungsrate und Rührerdrehzahl haben hingegen einen sehr geringen Einfluss auf die Messung. Das zeigen auch die PLS-Modelle für die jeweiligen Reaktorparameter.

Nur für die Temperatur kann ein valides Modell erstellt werden. Die Vorhersagen in Abb. 7.7 A streuen stark, aber unter Berücksichtigung der ungenauen Temperaturregelung ( $\pm 0,3 \text{ K}$ ) ist der RMSECV mit  $0,32 \text{ }^\circ\text{C}$  gering. Mit einem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) von 0,35 für die Begasung bzw. 0,55 für die Rührerdrehzahl sind die jeweiligen PLS-Modelle ungenügend. Die Vorhersagewerte (s. Abb. 7.7 B/C) streuen sehr stark. Die aus den Vorhersagen- und Referenzwerten berechneten Regressionslinien in Abb. 7.7 B/C weichen deutlich von dem idealen linearen Verhalten ( $y = x$ ) ab. In Abb. 7.7 D ist für die Rührerdrehzahl der mittlere Fehler aus der Quadratwurzel (RMSE – *root mean square error*) gegen die Anzahl der PLS-Faktoren aufgetragen. Bei drei Faktoren durchläuft der RMSECV ein Minimum. Werden mehr PLS-Faktoren eingesetzt, verbessert sich lediglich der RMSEC, wohingegen der RMSECV deutlich ansteigt. Eine Vorhersage der Rührerdrehzahl ist anhand der MIR-Spektren nicht möglich.

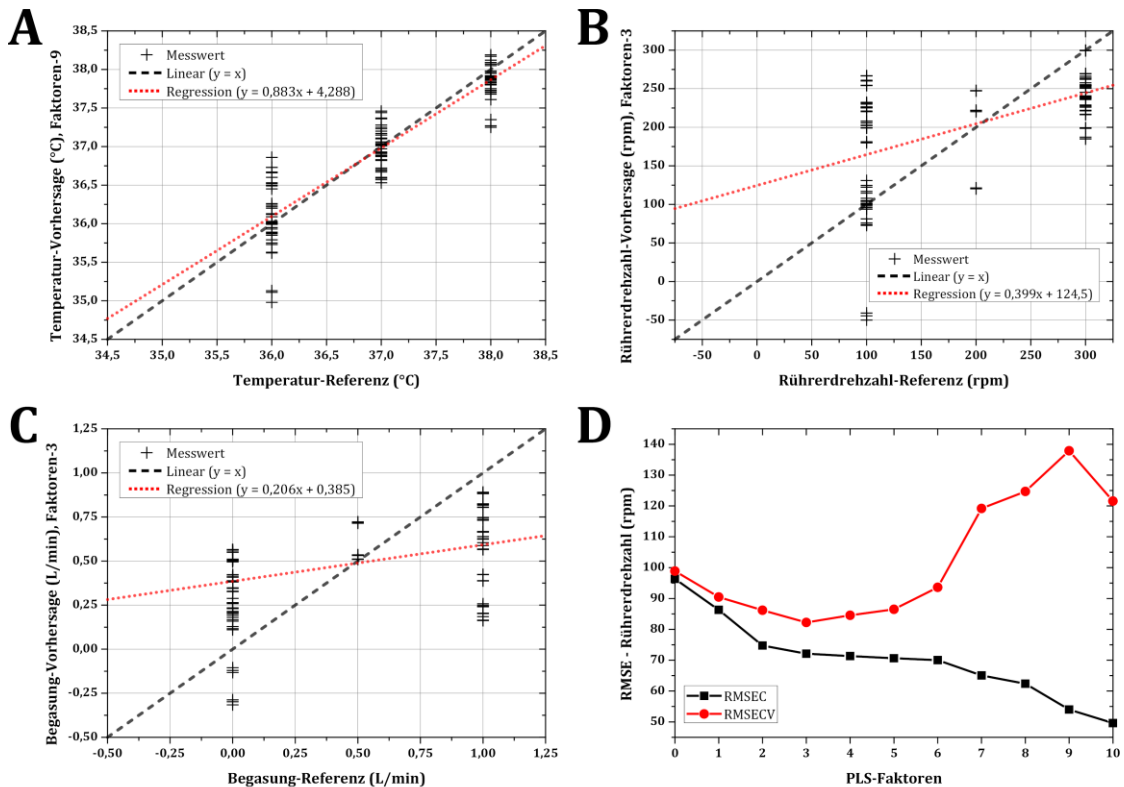


Abb. 7.7: PLS-Vorhersagen gegen die Referenzwerte aufgetragen für die Temperatur (A), Rührerdrehzahl (B) und Begasung (C); RMSEC und RMSECV des Kalibrationsmodells der Rührerdrehzahl aufgetragen gegen die Anzahl der PLS-Faktoren (D).

## 7.2.4 Versuchsplan – NIR - Reaktorparameter

Die Ergebnisse der NIR-Auswertung des Versuchsplanes haben ergeben, dass die NIR-Messung durch die Reaktorparameter stark beeinflusst wird. Für alle Analyten, ausgenommen Ammonium (s. Kapitel 4.3.3), konnten keine validen PLS-Modelle erzeugt werden. Als repräsentatives Negativbeispiel wird das Modell für Glucose vorgestellt.

Die Änderungen der Rührerdrehzahl führen zu starken Varianzen innerhalb der Spektren, die sich als Verschiebung der Basislinie bemerkbar machen. Ein valides Modell für Glucose kann, auch unter Hinzunahme verschiedener Vorverarbeitungsmethoden, nicht erstellt werden. Die Vorhersage aus der Kreuzvalidierung veranschaulicht die Ungenauigkeit des Modells (s. Abb. 7.8 A). Die berechnete Regressionslinie hat eine Steigung von etwa 0,3 und einen Achsenabschnitt bei 2,6 g/L Glucose und weicht damit stark von der idealen Regressionslinie ab. Eine Hinzunahme weiterer PLS-Faktoren verbessert zwar den RMSEC, doch der für das Modell ausschlaggebende RMSECV bleibt in etwa konstant (s. Abb. 7.8 B).

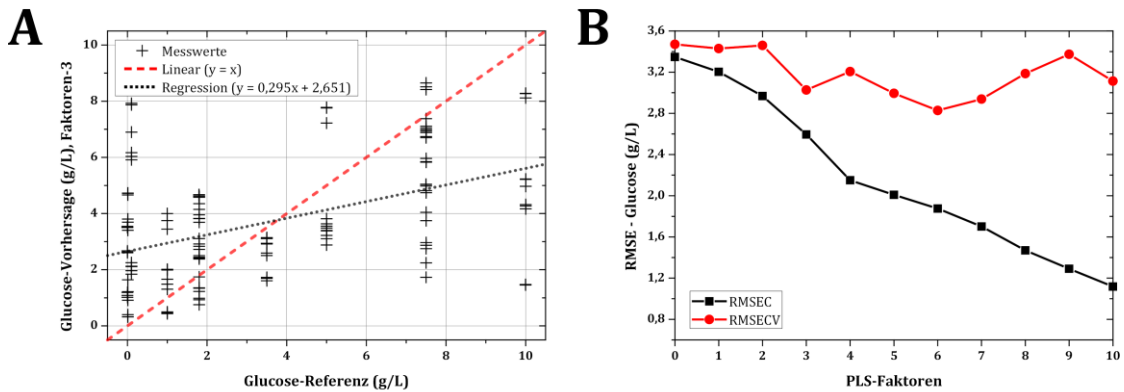


Abb. 7.8: Abbildung 7.A: Glucose – Referenz gegen PLS-Vorhersage (A); Verlauf der RMSEs in Abhängigkeit von der verwendeten Zahl an PLS-Faktoren (B).

## 7.3 Ergebnisse - Hauptteil

### 7.3.1 Konzentrationsverläufe – Analyten und Zellgrößen

Im Nachfolgenden sind die Konzentrationsverläufe der Analyten Lactat, Glutamin und Glutamat sowie die GZK und Viabilität für sämtliche Kultivierungen (K02 bis K10) zusammengefasst.

Die Lactat-Konzentration erreicht nach 82-92 h ein Maximum (s. Abb. 7.9). Der Verlauf ist innerhalb der ersten 48 h einer Kultivierung ähnlich. Auffällig ist bei K07 ein deutlich langsamerer Anstieg des Lactats. Bei K07 wurde neben Glucose auch Glutamin hinzugegeben. Da Glutamin erst nach 60 h zu K07 gegeben wurde, kann die Zugabe nicht für den langsameren Anstieg des Lactats verantwortlich gemacht werden. Im Vergleich zu den übrigen Kultivierungen ist die max. Konzentration von Lactat bei K07 mit 2,5 g/L deutlich niedriger.

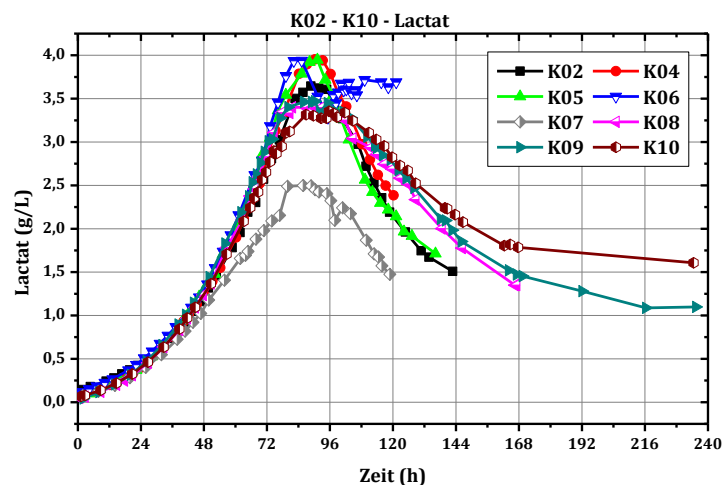


Abb. 7.9: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Lactat.

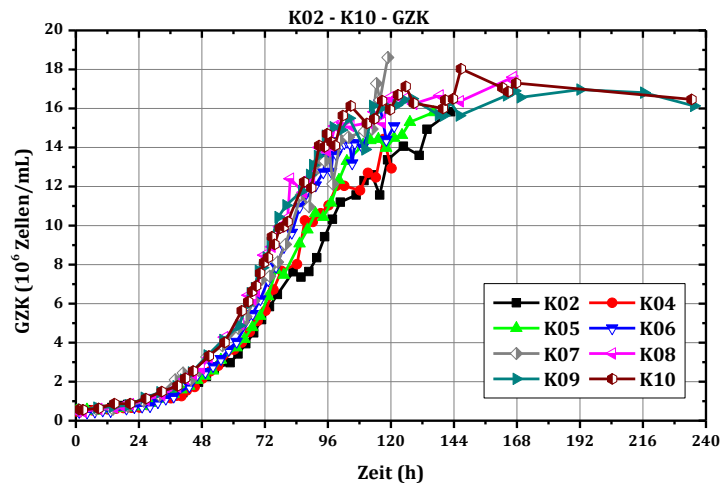


Abb. 7.10: Übersicht der Verläufe der GZK.

Die GZK hat einen ähnlichen Verlauf wie die LZK (s. Abb. 7.10). Die max. GZK wird mit über  $18 \cdot 10^6$  Zellen/mL bei K07 erreicht. Die optimierte Begasung ab K06 sowie die Zugaben von Glucose führten zu höheren Zelldichten.

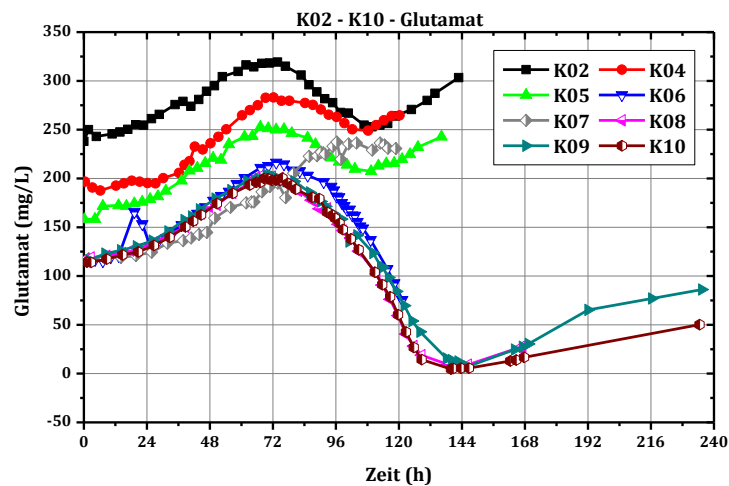


Abb. 7.11: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Glutamat

Die Anfangskonzentrationen von Glutamat variieren teilweise stark untereinander (s. Abb. 7.11). Bei K02, K04 und K05 liegen die Konzentrationen von Glutamat zwischen 150 und 250 mg/L und damit deutlich höher als bei den restlichen Kultivierungen (125 mg/L). Da die Anfangskonzentrationen von Glutamat von K02, über K04 bis K05 abnehmen ist es denkbar, dass die Konzentration im Medium abnimmt. Für sämtliche Versuche wurde dieselbe Charge des Mediums verwendet. Obwohl die Haltbarkeitszeit des Mediums nicht überschritten wurde, ist es möglich, dass sich durch Zersetzungsprozesse die Konzentration von Glutamat verringert.



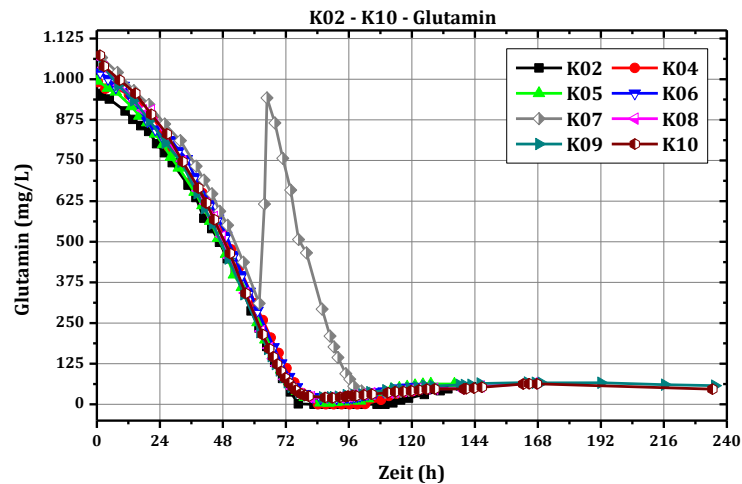


Abb. 7.12: Übersicht der Konzentrationsverläufe von Glutamin

Für Glutamin zeigen sich keine großen Differenzen beim Konzentrationsverlauf (s. Abb. 7.12). Eine Ausnahme bildet K07, da bei dieser Kultivierung Glutamin nach ca. 60 h Kultivierungsdauer supplementiert wurde.

Die Viabilität wurde aus der GZK und LZK ermittelt. Abhängig von der Kultivierungsdauer nimmt die Viabilität unterschiedlich stark ab (s. Abb. 7.13). Außerdem bewirkt die Zugabe von Glucose ein langsames Abfallen der Viabilität. Ein Vergleich zwischen den reinen batch Kultivierungen (K02, K04 und K05) und den fed-batch Kultivierungen (K06 - K10) verdeutlichen dies. Eine zu späte Zugabe von Glucose hat keine Auswirkungen auf die Viabilität. Bei K06 wurde Glucose erst nach seinem Verbrauch zugegeben und die Abnahme der Viabilität wurde dadurch nicht beeinflusst.

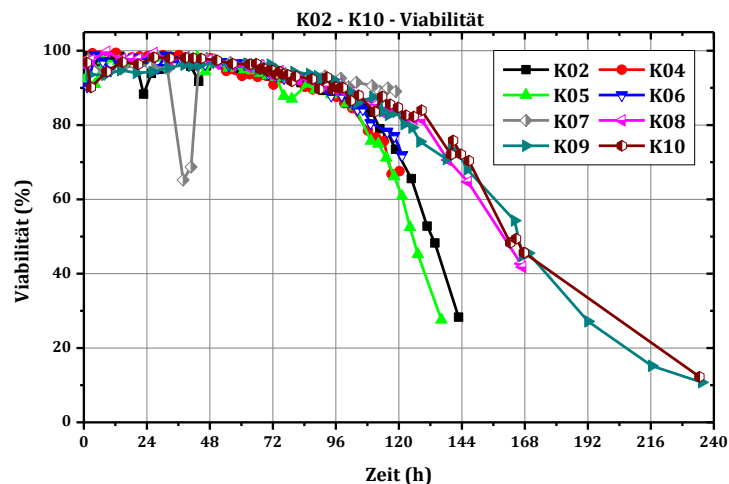


Abb. 7.13: Entwicklung der Zellviabilität während der einzelnen Kultivierungen.

### 7.3.2 PCA - MIR

Ein Vergleich zwischen den Loadings (PC-1 und PC-2) und den Referenzspektren von Glucose und Lactat zeigt mehrere Übereinstimmungen. Die Loadings der 1. PC

zeigen eine Übereinstimmung bei 1.080 und 1.040  $\text{cm}^{-1}$ . Diese Wellenzahlen entsprechen der Absorption von Glucose. Das Loading der 2. PC zeigt zwei eindeutige Peaks bei 1.124 und 1.040  $\text{cm}^{-1}$ . Beide Banden stimmen mit dem Referenzspektrum von Lactat überein.

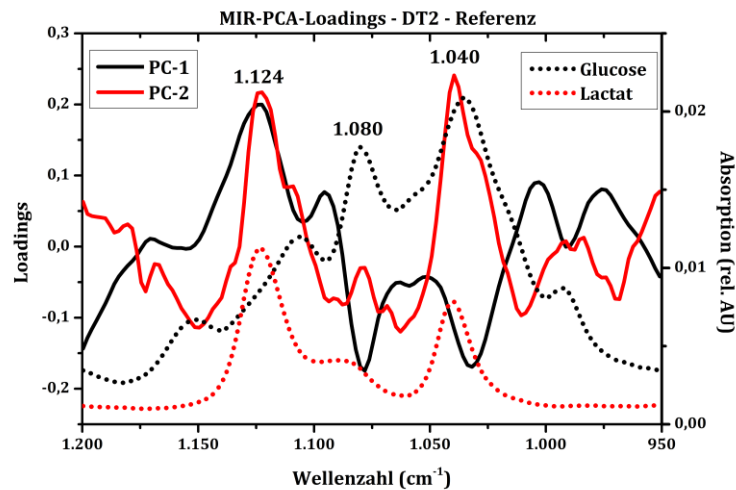


Abb. 7.14: Vergleich – MIR-PCA-Loadings mit Referenzspektren von Glucose und Lactat

### 7.3.3 PCA – NIR

Die NIR-Loadings der 1. und 2. PC geben die Einflüsse der Wellenlänge auf die jeweilige PC wieder (s. Abb. 7.15). Demnach ist der Einfluss der 1. PC über den gesamten Messbereich positiv. Die Loading-Werte im Bereich zwischen 1.050 bis 1.350 nm sind deutlich höher, was darauf schließen lässt, dass in diesem Teil des Spektrums Streueffekte einen größeren Einfluss auf die spektrale Varianz haben. Das Loading der 2. PC ähnelt dem Wasserspektrum, wobei der Bereich unterhalb von 1.350 nm negativ und der Bereich oberhalb von 1.350 nm positiv ist.

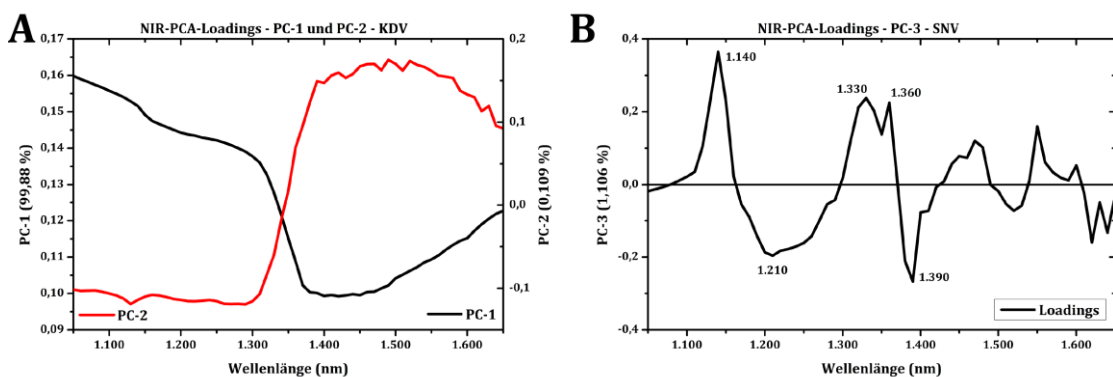


Abb. 7.15: NIR-Loadings der 1. und 2. PC der PCA-Auswertung – KDV (A); PCA-Loadings der SNV vorverarbeiteten Spektren – 3. PC (B).

Streueffekte können durch eine SNV-Datenvorbehandlung kompensiert werden. Die SNV vorverarbeiteten Spektren der K02 sind in Abb. 7.16 A gezeigt. Alle Spektren

der K02 liegen nahezu aufeinander. Die PCA-Scores der SNV vorverarbeiteten Daten unterscheiden sich zu den nicht vorverarbeiteten PCA-Scores dahingehend, dass der Versatz der Basislinie nicht auftaucht.

Werden die Scores der 1. gegen die 3. PC (SNV) aufgetragen, ergibt sich ein Trend zwischen den Kultivierungen (Abb. 7.16 B). Zum Zeitpunkt der Inokulation sind alle Kultivierung entlang der 3. PC versetzt und dieser Versatz bleibt auch im weiteren Kultivierungsverlauf bestehen. Dabei ist die Anordnung der Scores vom Zeitpunkt der Kultivierungen abhängig. Die Scores (3. PC) der ersten drei Kultivierungen (K02, K04 und K05) sind positiv, gefolgt von der K06 bis zur letzten Kultivierung K10. Für alle Kultivierungen wurde das Medium aus derselben Charge genommen, um Varianzen zwischen unterschiedlichen Chargen auszuschließen.

Dieser Versatz entlang der 3. PC lässt die Vermutung zu, dass sich innerhalb von ca. sechs Monaten an der Zusammensetzung des Mediums etwas geändert hat, was durch die NIRS erfasst wird. Die Änderung bezieht sich nicht auf die untersuchten Analyten, sondern ist vermutlich ein Resultat eines Summensignals der verschiedenen Bestandteile des Mediums. Neben einem Summensignal enthält die 3. PC auch Informationen über die Glucosekonzentration. Am Beispiel von K06 ist der Glucose Feed eindeutig an den Scores zu erkennen (s. Abb. 7.16 B).

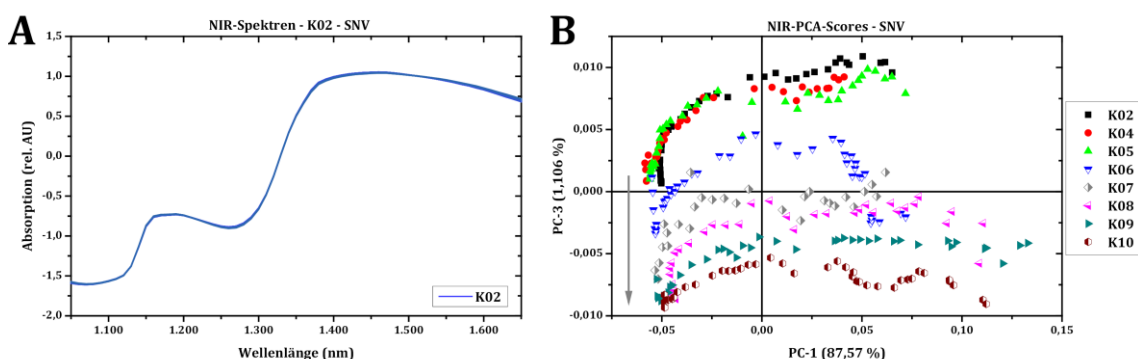


Abb. 7.16: NIR-Spektren von K02 – SNV vorverarbeitet (A); 1. PC gegen 3. PC der SNV vorverarbeiteten PCA-Scores aufgetragen (B).

### 7.3.4 Permutationsanalyse

Die Permutationsanalyse wurde in MATLAB (Version 7.10.0.499) entwickelt und wird verwendet, um die bestmöglichen Kombinationen der acht Kultivierungen zu ermitteln. Als Bewertungskriterium dienen der RMSEP und die Zahl der PLS-Faktoren.

Nachfolgend ist der MATLAB-Code für die Permutationsanalyse von Glucose und Lactat der MIR-Spektren gezeigt:

```
clc; clear all; close all
```

```
[num,text] = xlsread('K02-K10_SNV_1200-950.xlsx');

glukose=num(2:end,2);

laktat=num(2:end,3);

zellzahl=num(2:end,7);

viabilitaet=num(2:end,9);

glutamin=num(2:end,4);

glutamat=num(2:end,5);

spektren=num(2:end,10:end);

Wavelength = num(1,10:end);

ProbeIndex = [];
for i =2:size(text,1)
    ID = char(text(i,1));
    splitstring = regexp(ID,'K','split');
    Probe = str2num(char(splitstring(1,2)));
    if isempty(Probe)
        else
            ProbeNumber(i) = Probe;
            ProbeIndex = [ProbeIndex, i];
        end
    end
end

for k =2:10

    Kulti(k).Index = find(k*100<ProbeNumber & ProbeNumber<k*100+100);
    Kulti(k).Spektren = spektren(Kulti(k).Index-1,:);
    Kulti(k).Glukose = glukose(Kulti(k).Index-1,:);
    Kulti(k).Laktat = laktat(Kulti(k).Index-1,:);
    Kulti(k).Zellzahl = zellzahl(Kulti(k).Index-1,:);
    Kulti(k).Viabilitaet = viabilitaet(Kulti(k).Index-1,:);
    Kulti(k).Glutamin = glutamin(Kulti(k).Index-1,:);
    Kulti(k).Glutamat = glutamat(Kulti(k).Index-1,:);
end

GlukoseCombi = 1;
for np = 1:8
    c = nchoosek(2:10,np)
    for row = 1:size(c,1)
        X = [];
```

```

Y = [];
c(row,:);
for col = 1:size(c,2)
    k = c(row,col);
    X = [X; Kulti(k).Spektren];
    Y = [Y; Kulti(k).Glukose];
end
for r = 1:15
    M = DoPLS(X, Y, r);
    for k = 2:10
        if ~eq(k,c(row,:))
            Xval = Kulti(k).Spektren;
            Yval = Kulti(k).Glukose;
            Yp = [ones(size(Xval,1),1),Xval]*M.B;
            RMSEPvalGlukose(GlukoseCombi, k) = sqrt(mean((Yp-Yval).*(Yp-Yval)));
            Fac(r).ValGlukose(GlukoseCombi, k) = RMSEPvalGlukose(GlukoseCombi, k);
        else
            Xval = Kulti(k).Spektren;
            Yval = Kulti(k).Glukose;
            Yp = [ones(size(Xval,1),1),Xval]*M.B;
            RMSEPCalGlukose(GlukoseCombi, k) = sqrt(mean((Yp-Yval).*(Yp-Yval)));
            Fac(r).CalGlukose(GlukoseCombi, k) = RMSEPCalGlukose(GlukoseCombi, k);
        end
    end
end
end
GlukoseCombi = GlukoseCombi + 1;
end
end

LaktatCombi = 1;
for np = 1:8
    c = nchoosek(2:10,np)
    for row = 1:size(c,1)
        X = [];
        Y = [];
        c(row,:);
        for col = 1:size(c,2)
            k = c(row,col);
            X = [X; Kulti(k).Spektren];
            Y = [Y; Kulti(k).Laktat];
        end
        for r = 1:10;
            M = DoPLS(X, Y, r);
            for k = 2:10
                if ~eq(k,c(row,:))
                    Xval = Kulti(k).Spektren;
                    Yval = Kulti(k).Laktat;
                    Yp = [ones(size(Xval,1),1),Xval]*M.B;

```

```

RMSEPvalLaktat(LaktatCombi, k) = sqrt(mean((Yp-Yval).*(Yp-Yval)));
Fac(r).ValLaktat(LaktatCombi, k) = RMSEPvalLaktat(LaktatCombi, k);
else
Xval = Kulti(k).Spektren;
Yval = Kulti(k).Laktat;
Yp = [ones(size(Xval,1),1),Xval]*M.B;
RMSEPCalLaktat(LaktatCombi, k) = sqrt(mean((Yp-Yval).*(Yp-Yval)));
Fac(r).CalLaktat(LaktatCombi, k) = RMSEPCalLaktat(LaktatCombi, k);
end
end
end
end
LaktatCombi = LaktatCombi + 1;
end
end

```

### 7.3.5 PLS-MIR

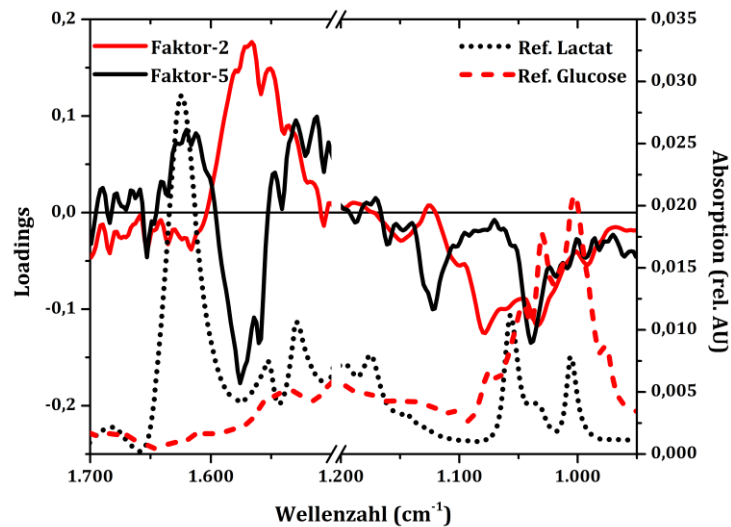


Abb. 7.17: MIR-PLS-Loadings des 2. und 5. Faktors des Ammonium-Kalibrationsmodells zusammen aufgetragen mit den MIR-Referenzspektren von Glucose und Lactat.

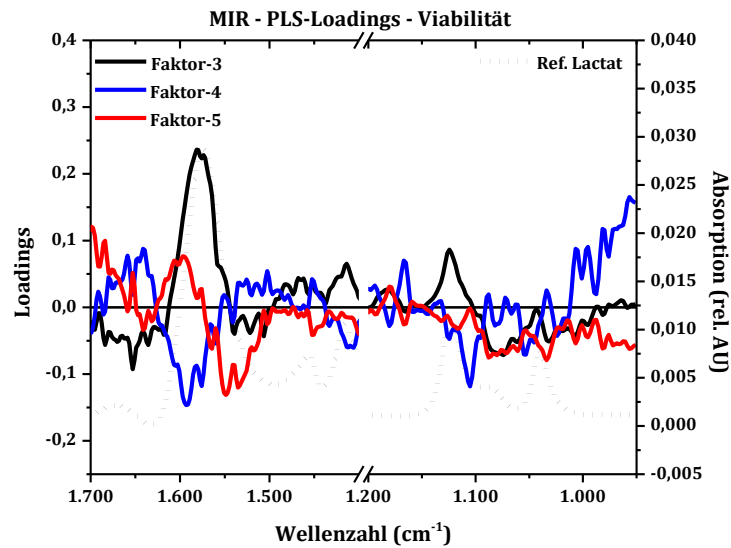


Abb. 7.18: MIR-PLS-Loadings des 3., 4. und 5. Faktors des Kalibrationsmodells für die Viabilität ist gemeinsam aufgetragen mit dem MIR-Referenzspektrum von Lactat.

### 7.3.6 PLS-NIR

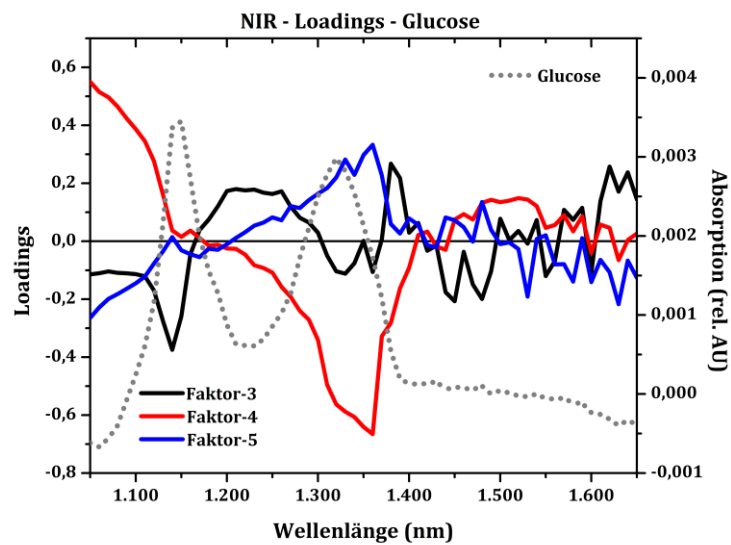


Abb. 7.19: Loadings des 3., 4. und 5. Faktors des NIR-Kalibrationsmodells von Glucose aufgetragen gegen ein Referenzspektrum von Glucose.

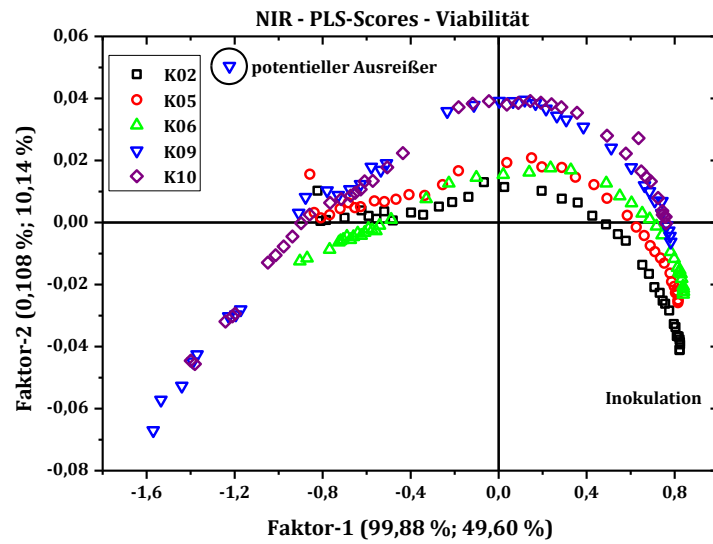


Abb. 7.20: 1. und 2. Faktor der PLS-Scores des Kalibrationsmodells für die Viabilität. K09 zeigt einen potentiellen Ausreißer. Die Scores sind entlang des 2. Faktors hinsichtlich des Zeitpunktes der Inokulation angeordnet (K02, K05, K06, K09 und K10).



## 7.4 Methoden und Versuchsvorschriften

### 7.4.1 Bestimmung von LOD und LOQ – Glucose

Für diese Versuchsreihe wurde ein weiteres NIR getestet. Da nur zwei Spektrometer gleichzeitig am Reaktor angeschlossen werden konnten, wurden die Versuche aufgeteilt.

Tabelle 7.1: NIR-Versuchsplan zur Bestimmung des LOD und LOQ für Glucose; Vorgabe und tatsächlich eingewogene Menge angegeben.

<i>Nr.</i>	<i>Glucose (g/L)</i>	<i>Glucose tatsächlich (g/L)</i>	<i>Nr.</i>	<i>Glucose (g/L)</i>	<i>Glucose tatsächlich (g/L)</i>
1	0,25	0,251	16	7,5	7,50
2	1,0	1,001	17	0,25	0,251
3	5,0	5,00	18	0,75	0,751
4	2,5	2,497	19	5,0	5,00
5	10	10,02	20	7,5	7,50
6	0,5	0,499	21	0,75	0,750
7	0	0	22	0,1	0,101
8	0,5	0,502	23	0	0
9	5,0	5,00	24	2,5	2,503
10	0,1	0,101	25	0,1	0,101
11	0	0	26	0,75	0,751
12	10	10,00	27	10	10,00
13	1	1,001	28	2,5	2,501
14	0,25	0,250	29	7,5	7,50
15	1	1,000	30	0,5	0,500

Tabelle 7.2: MIR-Versuchsplan zur Bestimmung des LOD und LOQ für Glucose; Vorgabe und tatsächlich eingewogene Menge angegeben.

Nr.	Glucose (g/L)	Glucose tatsächlich (g/L)	Nr.	Glucose (g/L)	Glucose tatsächlich (g/L)
1	0,25	0,252	16	0,1	0,100
2	1,0	1,000	17	2,5	2,499
3	7,5	7,50	18	0,75	0,751
4	0	0	19	0,1	0,100
5	2,5	2,498	20	7,5	7,50
6	5,0	5,00	21	1,0	0,999
7	0,1	0,102	22	1,0	1,000
8	0,25	0,252	23	5,0	5,00
9	5,0	5,03	24	0,5	0,499
10	10,0	9,98	25	2,5	2,500
11	0,5	0,499	26	0,5	0,501
12	0,75	0,750	27	7,5	7,50
13	10,0	10,00	28	0	0
14	0,25	0,251	29	0,75	0,753
15	0	0	30	10,0	10,01

#### 7.4.2 Versuchsvorschrift – synthetische Standards

Die Konzentrationsstufen für die verschiedenen Kalibrationsstandards werden so gewählt, dass bei Konzentrationsänderungen der einzelnen Analyten Korrelationen möglichst niedrig sind. Der PLS-Algorithmus sucht gezielt nach Korrelationen zwischen den spektralen Absorptionen und den Konzentrationen eines Analyten. Wenn die Konzentrationen mehrerer Analyten zueinander korrelieren ist es nicht möglich für einen Analyten ein selektives Kalibrationsmodell zu erstellen.

Nachfolgend ist der von Dr. Dörte Solle (Institut für Technische Chemie, Hannover) entwickelte MATLAB-Code gezeigt, mit dem es möglich ist Konzentrationsstufen zu bestimmen, die nicht oder nur leicht zueinander korrelieren:

```
clc; clear all; close all;
```

```
%% Programmparameter
```

```
a = 5; % Analyten
```

```
k = 9; % Konzentrations-Levels
```

```
y = -1; % Optimierungskriterium: erklärte Varianz der a-ten PC
```

```
iter = 10000;
```

```
%% Setup
```

```
X = zeros(k,a);
```

```
figure('NumberTitle', 'off', 'Name', 'ErklärteVarianz');
```

```
warning off;
```

```
%% Hauptschleife
```

```
for j = 1:iter
for i = 1:a
    X(:,i) = randperm(k)'; % zufällige Konz-Levels
end;
%% PCA
[coefs,scores,variances,t2] = princomp(X);
if (variances(a) > y)
    y = variances(a)
Xbest = X
    j
    %% Erklärte Varianz pro Hauptkomponente (HK) anzeigen
percent_explained = 100*variances/sum(variances);
pareto(percent_explained);
xlabel('Hauptkomponente');
ylabel('Erklärte Varianz (%)');
drawnow;
end;
end
```

Für den DoE-Plan ist im Vorfeld eine eigene Versuchsvorschrift entwickelt worden mit dem Ziel eine höchstmögliche Reproduzierbarkeit und Genauigkeit einzuhalten. Glucose wird einen Tag vor der Messung im Reaktor in etwa 1 L PBS (50 mM) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt. Damit wird sichergestellt, dass sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Anomeren  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Glucose einstellt. Kurz vor der Messung jedes Standards werden die restlichen Feststoffe gemeinsam mit der Glucose-Lösung in PBS (50 mM) vollständig gelöst (5 L Messkolben). Anschließend wird der Standard in den Bioreaktor überführt. Entsprechend des Versuchsplanes werden die Reaktorparameter eingestellt und der Standard auf die vorgegebene Temperatur erwärmt. Da Glutamin thermisch instabil ist, wird die maximale Manteltemperatur (engl. *jacket temperature* – JTEMP) des Reaktors auf 42 °C begrenzt [52]. Nach Erreichen der Solltemperatur werden die Lösungen mit 3 M NaOH auf pH = 7,1 titriert. Bei einem maximalen Verbrauch von 5 mL wird der Verdünnungseffekt der 3 M NaOH bezogen auf das Gesamtvolumen von 5.000 mL vernachlässigt.

## 7.5 CHO-Kultivierung

### 7.5.1 Vorkultur

Für jede Reaktorkultivierung werden CHO-K1-Zellen (AG Zellkulturtechnik, Universität Bielefeld) für die Vorkultur aufgetaut. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen werden im Wasserbad erwärmt. Anschließend wird die Zellsuspension in 4 mL kaltes Kulturmedium (TC-42, Teutocell GmbH, Bielefeld)

überführt und zentrifugiert (5 min, 200 g). Zelltoxisches DMSO wird mit dem Überstand entfernt und das Zellpellet wird in 30 mL frischem Zellkulturmedium suspendiert und in einem Schüttelkolben (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 160 rpm, 95 % relative Luftfeuchte) inkubiert. Die Zelldichte beträgt nach Inokulation etwa  $4 \cdot 10^5$  N/mL. Nach vier Tagen ist eine Zelldichte von etwa  $1 \cdot 10^7$  N/mL erreicht, die Zellen werden passagiert und für weitere vier Tage bei gleichen Bedingungen inkubiert. Im letzten Schritt wird die Vorkultur expandiert. Hierzu wird die Vorkultur auf fünf 250 mL Schüttelkolben mit je 100 mL TC-42 passagiert. Nach weiteren vier Tagen werden die Vorkulturen in einen Kolben (500 mL) überführt und die Zelldichte wird bestimmt. Basierend auf diesem Ergebnis wird das notwendige Volumen der Zellsuspension für die Reaktorkultivierung berechnet.

### 7.5.2 Reaktor Kultivierung

Bevor der Reaktor für die Sterilisation vorbereitet wird, wird mit dem MIR ein Hintergrundspektrum aufgenommen. Es muss sichergestellt sein, dass sich das Spektrometer in einem stabilen Zustand befindet und der ATR-Kristall trocken ist. Anschließend wird der Edelstahlreaktor sterilisiert. Der Reaktor wird dazu mit etwa 5 L vollentsalztem (VE) H<sub>2</sub>O befüllt und das automatische Sterilisationsprogramm gestartet. Nach erfolgreicher Sterilisation wird im Reaktor ein Überdruck von 0,1 bar gehalten.

Am Tag der Inokulation wird der Reaktor über das vorher sterilisierte Bodenventil (20 min, 121 °C) entleert. Um sicherzustellen, dass durch das Ablassen keine kontaminierte Luft in den Reaktor gelangen kann wird zuvor ein Überdruck von 1,5 bar aufgebaut.

Nach Ablassen des Reaktors wird Kulturmedium (4.500 mL TC-42) zugegeben und temperiert (37 °C, 200 rpm). Sobald sich eine stabile Temperatur eingestellt hat wird ein weiteres Hintergrundspektrum des TC-42 Mediums ohne Zusätze mittels MIR aufgenommen. Anschließend wird weiteres Medium (1.500 mL), L-Glutamin (300 mL, 0,2 M) und Antischaum (Pluronic® F-68, 10 %, 30 mL) zugegeben. Parallel dazu wird die Zellkonzentration der Vorkultur bestimmt und daraus das notwendige Volumen für eine Inokulation des Reaktors mit  $4 \cdot 10^5$  Zellen/mL berechnet. Der Reaktor wird mit der entsprechenden Menge der Vorkultur (etwa 300 mL) inokuliert und das Reaktorvolumen wird mit TC-42 Medium auf 7.500 mL aufgefüllt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Übersicht der Kultivierungsbedingungen im Edelstahlreaktor.

Tabelle 7.3: Reaktorkultivierung - Parameter

<i>Parameter</i>	<i>Eigenschaft</i>
Kulturmedium	TC-42 + 8 mM L-Glutamin
Rührwerk	6-Blatt Rushton oberhalb des Ringspargers + 3-Blatt Propeller nah an der Oberfläche zur Durchmischung von Feed oder Base
Rührergeschwindigkeit	200 rpm
Temperatur	37 °C
pH-Wert	7,1
pH-Regelung	Base: NaCO <sub>3</sub> (1 M) Säure: CO <sub>2</sub> (über Ringsparger)
Begasung Ringsparger	pO <sub>2</sub> 40 % Regelung; max. 0,5 L/min; bei Erreichen der max. Rate Zumischung von reinem Sauerstoff in 10 % Schritten
Begasung Kopfraum	0,2 L/min kontinuierlich
Überdruck	0,1 bar (Kopfraum)
Animpfdichte	4 · 10 <sup>5</sup> Zellen/mL

## 7.6 Referenzanalytik

Entscheidend für verlässliche Referenzmessungen ist zum einen eine reproduzierbare Probennahme sowie die gleiche Ausführung sämtlicher Schritte, unabhängig vom Operator.

Für die Probennahme wird ausschließlich das Probennahmeventil am Reaktor verwendet. Ein Vorlauf (etwa 15 mL) wird verworfen und die Probe wird in Falcon Röhrchen gesammelt. Anschließend wird das Probennahmeventil sterilisiert (20 min, 121 °C), damit das Ventil bis zur nächsten Probennahme abkühlt.

Jeder Analysenwert wird 3-fach bestimmt, um mögliche Ausreißer erkennen zu können sowie eine Aussage hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Analytik machen zu können. Eine Übersicht der mittleren Standardabweichung der einzelnen Analysemethoden ist in der nachfolgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 7.4: Übersicht der prozentualen mittleren Standardabweichungen über alle Kultivierungen für jeden Analyten

	Glucose	Lactat	Glutamin	Glutamat	Ammonium	Zellzahl
Mittelwert der STABW [%]	0,70	0,95	1,08	0,71	2,47	3,93

### 7.6.1 Zellkonzentration und Viabilität

Direkt nach der Probennahme wird ein Teil der zellhaltigen Probe abgenommen (etwa 1,5 mL). Die restliche Probe (etwa 13 mL) werden für die YSI Analyse zentrifugiert (4 °C, 1000 g, 5 min).

Die Zellkonzentration wird mit einem automatischen Zellzähler (TC10 Automated Cell Counter, Bio-Rad) bestimmt. Dazu werden 20 µL Probe mit 20 µL Trypanblau (0,2 %) durchmischt. Von dieser 1 : 1 Lösung werden weniger als 10 µL auf einen Messstreifen mit einem vordefinierten Volumen gegeben. Der Teststreifen mit einem definierten Innenvolumen wird in den Schacht des Zellzählers gesteckt und eine automatische Auswertung erfolgt. Durch die Einfärbung der Zellen mit Trypanblau ist eine lebend-tot Unterscheidung möglich. Aus einer Messung resultieren somit drei Werte, die Gesamtzellkonzentration, Lebendzellkonzentration und Viabilität.

Liegt der Wert der Zellkonzentration oberhalb von  $10 \cdot 10^6$  N/mL, wird die zellhaltige Probe auf 2 : 1 verdünnt (500 µL Probe und 500 µL deionisiertes Wasser). Dieser Verdünnungsschritt ist notwendig, da bei zu hohen Zellkonzentrationen die Bestimmung fehlerhaft sein kann.

### 7.6.2 YSI – Glucose, Lactat, Glutamin, Glutamat

Nach der Zentrifugation wird der Überstand ohne Zellen dekantiert. Vom Überstand werden etwa 2 mL für die Analyse abgenommen, die restliche Menge der zellfreien Probe wird eingefroren (-20 °C).

Die Bestimmung der chemischen Komponenten Glucose, Lactat, Glutamin und Glutamat erfolgt mit dem biochemischen Analysator YSI 2700 (KREIENBAUM Wissenschaftliche Messsysteme e.K., Langenfeld). Der Analysator verfügt über zwei Kanäle, somit können zwei Analyten gleichzeitig analysiert werden. Das Messprinzip basiert auf einer enzymatisch katalysierten Oxidation des Analyten an einer Membran.

Bei der Oxidation des Analyten mit Sauerstoff wird  $H_2O_2$  in stöchiometrischen äquivalenten Mengen freigesetzt, welches an der Elektrode reduziert und amperometrisch detektiert wird. Die Zweipunktkalibration des Gerätes wird mit einem Standard durchgeführt, der beide zu messenden Analyten enthält.

Glucose und Lactat werden als Paar direkt nach der Probennahme quantifiziert, wohingegen die Metabolite Glutamin und Glutamat erst nach Abschluss einer Kultivierung vermessen werden. Der ideale Messbereich liegt für Glucose bei 1,8 g/L und für Lactat bei 0,5 g/L. Dies entspricht den Konzentrationen des Kalibrierstandards. Weichen die tatsächlichen Konzentrationen davon ab, muss die Probe verdünnt werden. Jede Probe wird somit sechs Mal vermessen. Nach jeder zweiten Messung erfolgt eine automatische Kalibration des Gerätes.

Im Anschluss der Kultivierungen werden die Enzymmembranen ausgewechselt und ein Glutamin/Glutamat-Standard vorgelegt. Auf Grund der Zersetzung von Glutamin sollte der Standard, auch wenn dieser bei 4 °C gelagert wird, möglichst frisch angesetzt werden. Die gefrorenen Proben von Glutamin und Glutamat werden bei Raumtemperatur aufgetaut und rasch vermessen.

Für Glutamin und Glutamat werden separate Kalibrationslösungen benötigt, die jeweils nur eine der Chemikalien beinhalten. Im Gegensatz zu dem kombinierten Glucose-Lactat Standard müssen die Standards jeweils etwa 0,7 g/L Glutamin oder Glutamat enthalten.

### 7.6.3 Ammonium

Die Bestimmung von Ammonium erfolgte extern beim Kooperationspartner Sartorius mit Hilfe eines BioProfile® 100 Plus (I&L Biosystem GmbH, Königswinter) <sup>1</sup>.

Das Analysengerät verfügt über eine ionenselektive Elektrode, mit welcher anhand einer potentiometrischen Messung die Konzentration von Ammonium-Ionen selektiv in Lösung bestimmt werden kann.

## 7.7 Multivariate Methoden

### 7.7.1 Fehlerberechnung - RMSE

In der multivariaten Analyse wird der mittlere Fehler (RMSE – *root mean square error* = Wurzel aus dem mittleren quadratischen Fehler) als Fehlerangabe verwendet [30]. Die allgemeine Berechnung erfolgt nach Gl. A.2:

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \text{Gl. 7.1}$$

Der mittlere Fehler wird aus der Probenzahl  $n$ , den Referenzwerten  $y$  und den aus einem Modell berechneten Wert  $\hat{y}$  errechnet. In der Auswertung wird der RMSE in drei Kategorien unterteilt [30]:

- Mittlerer Fehler der Kalibration → RMSEC
- Mittlerer Fehler der Kreuzvalidierung → RMSECV
- Mittlerer Fehler der Vorhersage → RMSEP

---

<sup>1</sup> Die Messungen wurden von Dr. Roland Bienert bei Sartoris Stedim am Standort Göttingen durchgeführt.

In dieser Arbeit wird der RMSEP stets aus einem Validierset berechnet, das nicht Teil der Kalibration ist.

## 7.7.2 Korrelationsanalysen

Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse wird überprüft, ob ein linearer Zusammenhang zwischen zwei Datensätzen vorliegt. Als Maß für den linearen Zusammenhang liefert die Korrelationsanalyse einen Wert für den Korrelationskoeffizienten  $\rho$ . Die Werte liegen zwischen  $-1$  und  $+1$ , was einem vollkommen linearen Zusammenhang entspricht. Für  $\rho = -1$  korrelieren die Datensätze negativ, für  $\rho = +1$  ist die Korrelation positiv. Ist  $\rho = 0$  liegt kein linearer Zusammenhang zwischen den Datensätzen vor und es besteht keine Korrelation zwischen den Daten. Berechnet wird  $\rho$  nach der folgenden Gleichung:

$$\tilde{n}_{X,Y} = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sigma_X \sigma_Y} \quad \text{Gl. 7.2}$$

Aus der Kovarianz  $\text{Cov}$  einer X- und Y-Matrix und der Standardabweichung  $\sigma$  für X und Y wird der Korrelationskoeffizient berechnet.

## 7.7.3 Vorverarbeitungsmethoden

### 7.7.3.1 Detrending

Mit Hilfe des Detrending (DT) lassen sich nichtlineare Verläufe in den Spektren eliminieren. Beim DT wird eine Polynomfunktion n-ter Ordnung zu jedem Spektrum mittels der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet. Je nach Ordnung des Polynoms werden unterschiedliche Basislinieneffekte entfernt. Für jedes einzelne Spektrum wird eine eigene Polynomfunktion berechnet.

Beim Polynom 0. Ordnung wird ein Versatz der Grundlinie berechnet, bei einem Polynom 1. Ordnung wird neben dem Versatz noch die Steigung herausberechnet. Mit Polynomfunktionen höherer Ordnung ist es zudem möglich die Schräge einer Basislinie zu minimieren [59].

### 7.7.3.2 SNV – engl. Standard Normal Variate

Die SNV wird zur Korrektur von Streueffekten verwendet. Streueffekte treten z. B. bei Transflexionsmessungen auf, wo Partikel oder Luftblasen das Licht streuen. Für jede Absorption  $x_i$  bei der Wellenzahl  $i$  wird der Wert  $x_{i,SNV}$  nach folgender Formel berechnet [30]:



$$x_{i,SNV} = \frac{(x_i - \bar{x})}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2}{p-1}}} \quad \text{Gl. 7.3}$$

Dabei ist  $\bar{x}$  der Mittelwert der Absorptionen über den ausgewählten Wellenzahlbereich. Die Differenz aus  $x_i$  und  $\bar{x}$  wird durch die Standardabweichung dividiert. Durch eine SNV werden die Spektren um den Wert Null zentriert wodurch die absoluten Absorptionsintensitäten verloren gehen. Eine SNV wird individuell für jedes Spektrum einzeln berechnet.

### 7.7.3.3 Ableitungsfunktionen

Mit Hilfe von Ableitungsfunktionen werden Basislinienversätze entfernt. Durch eine Ableitungsfunktion werden nicht-chemische Einflüsse aus einem Spektrum entfernt, wodurch das resultierende Kalibrationsmodell robuster werden soll. Eine Ableitung erhöht die spektrale Auflösung, wodurch die überlappenden Absorptionsbanden besser getrennt werden können. Ein Nachteil der Ableitungen ist der Verlust der ursprünglichen spektralen Informationen, wodurch die Zuordnung einer Bande zu funktionellen Gruppen erschwert wird.

Typischerweise wird eine Ableitung zusammen mit einer Glättungsfunktion berechnet. Ein Polynom n-ter Ordnung wird an ein gemessenes Spektrum angepasst und das Polynom wird abgeleitet [30]. Das Polynom wird nicht für das gesamte Spektrum, sondern nur für eine gewisse Fensterbreite mit  $k$  Datenpunkten berechnet. Die Fensterbreite sollte nicht größer sein als die breite einer Bande, da sonst nützliche Informationen durch die Glättung verloren gehen.

Ein Spektrum  $a$  bzw. ein spektraler Ausschnitt wird durch folgende Polynomfunktion beschrieben:

$$a = \alpha + \beta x + \gamma x^2 + \delta x^3 + \dots + \epsilon x^n \quad \text{Gl. 7.4}$$

Ähnlich wie beim DT wird über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate die Polynomfunktion angepasst. Aus Gl. 7.4 ergeben sich folgende 1. Und 2. Ableitungen:

1. Ableitung:

$$a' = 0 + \beta + 2\gamma x + 3\delta x^2 + \dots + n\epsilon x^{n-1} \quad \text{Gl. 7.5}$$

2. Ableitung:

$$a'' = 0 + 0 + 2\gamma + 6\delta x + \dots + (n-1)n\epsilon x^{n-2} \quad \text{Gl. 7.6}$$

Die konstante Basislinie  $\alpha$  wird sowohl durch die 1. als auch 2. Ableitung entfernt. Lineare Effekte  $\beta x$  werden durch die 2. Ableitung entfernt.

## 7.8 Material und Geräte

### 7.8.1 Chemikalienliste

Im Folgenden sind sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien gelistet. Sofern Lösungen aus den Chemikalien angesetzt wurden, wurde stets deionisiertes  $H_2O$  verwendet.

Tabelle 7.5: Liste der bei dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
D-(+)-Glucose wasserfrei, $C_6H_{12}O_6$	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gentamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid, KCl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin 200 mM,	Biochrom, Berlin
L-Glutamin, $C_5H_{10}N_2O_3$	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lithium L-Lactat, $C_3H_5LiO_3$	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumbenzoat, $C_7H_5NaO_2$	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumcarbonat, $Na_2CO_3$	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid, NaCl	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-L(+)-glutamat Monohydrat, $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pluronic® F68 Antischaum	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Puffer DuraCal pH 7,00 und pH 9,21	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
TC-42 Zellkulturmedium inkl. HT	TeutoCell GmbH, Bielefeld
Trypanblau, $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 7.8.2 Geräte und Materialien

Tabelle 7.6: Liste der bei dieser Arbeit verwendeten Geräte.

<i>Gerät und Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Arium® 661 Ultrapure water system	Sartorius AG, Göttingen
ATR-Sonde Diamant 2x Reflexion	art photonics GmbH, Berlin
Autoclav Systec V-150	Systec GmbH, Wettengel
BioPAT® Spectro NIR Spektrometer	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
BioProfile® 100 Plus	I&L Biosystem GmbH, Königswinter
BIOSTAT® Cplus 15 L Edelstahlreaktor	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
BioWelder® - Schlauchschweißgerät	Sartorius AG, Göttingen
C-Flex Clear 082, 3/16"x5/16" - thermoplastische Schläuche	Saint-Gobain, Courbevoie, Frankreich
EasyFerm Plus 425 - pH Elektrode	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Einkanal-Pipette Transferpette® S (versch. Größen)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Erlenmeyerkolben, 125 mL, 250 mL mit Belüftungskappe	Corning Inc., New York, USA
Feinwaage MC 1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Inkubator, Hera cell 240	Thermo Scientific, Dreieich
MATRIX-MF MIR Spektrometer mit Cryocooler	Bruker Optik GmbH, Ettlingen
Megafuge® 1.0 RS, Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Midisart® 2000, Sterilfilter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
OxyFerm FDA 425 - pO <sub>2</sub> Sonde	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Präzisionswaage Extend	Sartorius AG, Göttingen
Sacova-Ventil 3 Kanal (BB-8846066)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sartofluor® Mini, Sterilfilter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Schüttelplattform, Shaker DOS-10M	ELMI Ltd., Riga, Lettland
Sicherheitswerkbank, MSC advantage	Thermo Scientific, Dreieich
Silikonschlauch (ID 4 mm, OD 8 mm)	VWR
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad, München
Wasserbad	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
YSI 2700 Select	KREIENBAUM Wissenschaftliche Messsysteme e.K., Langenfeld)
YSI Membran-Kit Glucose und Lactat	KREIENBAUM Wissenschaftliche Messsysteme e.K., Langenfeld)
YSI Membran-Kit Glutamin und Glutamat	KREIENBAUM Wissenschaftliche Messsysteme e.K., Langenfeld)
Zentrifuge Centrifuge 5720	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Microstar 17	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex-Mixer VM-300	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg

## Literaturverzeichnis

- 1 Sheppard, N. (2002) The Historical Development of Experimental Techniques in Vibrational Spectroscopy, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 1–32.
- 2 Schultz, C.P. (2002) Role of Near-infrared Spectroscopy in Minimally Invasive Medical Diagnosis, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 3246–3265.
- 3 Atkins, P.W., Höpfner, A., Trapp, C.A. (2001) *Physikalische Chemie*, 3rd edn, Wiley-VCH, Weinheim [u.a.].
- 4 Griffiths, P.R. (2002) Introduction to Vibrational Spectroscopy, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 33–43.
- 5 Landgrebe, D., Haake, C., Höpfner, T., Beutel, S., Hitzmann, B., Scheper, T., Rhiel, M., Reardon, K.F. (2010) On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring. *Appl Microbiol Biotechnol*, **88** (1), 11–22.
- 6 Kornmann, H., Rhiel, M., Cannizzaro, C., Marison, I., Stockar, U. von (2003) Methodology for real-time, multianalyte monitoring of fermentations using an in-situ mid-infrared sensor. *Biotechnol. Bioeng.*, **82** (6), 702–709.
- 7 Griffiths, P.R. (2002) Beer's Law, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 225–2234.
- 8 Kessler, R.W. (2006) *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*, 1st edn, Wiley-VCH, Weinheim.
- 9 U.S. Department of Health and Human Services, F.a.D.A. Guidance for Industry: PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance.  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf> (12 May 2014).
- 10 Hannah, R.W. (2002) Standard Sampling Techniques for Infrared Spectroscopy, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 933–952.
- 11 Hale, G.M. and Querry, M.R. (1973) Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- $\mu$ m Wavelength Region. *Applied Optics*, **12** (3), 555–563.
- 12 Fayolle, P., Picque, D., Corrieu, G. (1997) Monitoring of fermentation processes producing lactic acid bacteria by mid-infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, **14** (2), 247–252.
- 13 Mizaikoff, B. and Lendl B. (2002) Sensor Systems Based on Mid-infrared Transparent Fibers, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 1560–1573.
- 14 Vidrine, D.W. (2002) Optical Materials for Infrared Spectroscopy, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 368–382.
- 15 Alberti, J.C. and Phillips, J. (1985) Off-Line Monitoring of Fermentation Samples by FTIR/ATR: A Feasibility Study for Real-Time Process Control. *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, **15**, 689–722.

- 16 Doak, D. and Phillips, J. (1999) In Situ Monitoring of an Escherichia coli Fermentation Using a Diamond Composition ATR Probe and Mid-infrared Spectroscopy. *Biotechnol Progress*, **15** (3), 529–539.
- 17 Lewis, I.R. and Rosenblum, S.S. (2002) General Introduction to Fiber Optics, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 1533–1540.
- 18 Lendl, B. and Mizaikoff, B. (2002) Optical Fibers for Mid-infrared Spectrometry, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 1541–1550.
- 19 Kondepoti, V.R. and Heise, H.M. (2008) The Potential of Mid- and Near-infrared Spectroscopy for Reliable Monitoring of Bioprocesses. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, **2** (1), 117–132.
- 20 Scarff, M., Arnold, S.A., Harvey, L.M., McNeil, B. (2006) Near Infrared Spectroscopy for Bioprocess Monitoring and Control: Current Status and Future Trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, **26** (1), 17–39.
- 21 DeThomas, F.A. and Brimmer, P.J. (2002) Monochromators for Near-infrared Spectroscopy, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 383–392.
- 22 Stark, E., Luchter, K., Margoshes, M. (1986) Near-Infrared Analysis (NIRA): A Technology for Quantitative and Qualitative Analysis. *Applied Spectroscopy Reviews*, **22** (4), 335–399.
- 23 Pons, M.-N., Le Bonté, S., Potier, O. (2004) Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation. *Journal of Biotechnology*, **113** (1-3), 211–230.
- 24 Todd, T.R. (2002) Fiber-optic Probes for Near-infrared Spectrometry, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 1574–1586.
- 25 Arnold, S.A., Gaensakoo, R., Harvey, L.M., McNeil, B. (2002) Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch Escherichia coli process. *Biotechnol. Bioeng.*, **80** (4), 405–413.
- 26 Cavinato, A.G., Mayes, D.M., Ge, Z., Callis, J.B. (1990) Noninvasive Method for Monitoring Ethanol in Fermentation Processes Using Fiber-Optic Near-Infrared Spectroscopy. *Anal. Chem.*, **62** (18), 1977–1982.
- 27 Vaccari, G., Dosi, E., Campi, A.L., Gonzalez-Vara, A., Matteuzzi, D., Mantovani, G. (1994) A Near-Infrared Spectroscopy Technique for the Control of Fermentation Processes: An Application to Lactic Acid Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **43** (10), 913–917.
- 28 Arnold, S.A., Crowley, J., Woods, N., Harvey, L.M., McNeil, B. (2003) In-situ near infrared spectroscopy to monitor key analytes in mammalian cell cultivation. *Biotechnol. Bioeng.*, **84** (1), 13–19.
- 29 Stark, E.W. (2002) Near-infrared Array Spectrometers, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 393–422.
- 30 Kessler, W. (2007) *Multivariate Datenanalyse: Für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*, Wiley-VCH, Weinheim.
- 31 MacDougall, D., Amore, F.J., Cox, G.V. (1980) Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry. *American Chemical Society*, **52** (14), 2242–2249.
- 32 Ostra, M., Ubide, C., Vidal, M., Zuriarrain, J. (2008) Detection limit estimator for multivariate calibration by an extension of the IUPAC recommendations for univariate methods. *The Analyst*, **133** (4), 532.

- 33 Chen, Z.-P., Zhong, L.-J., Nordon, A., Littlejohn, D., Holden, M., Fazenda, M., Harvey, L., McNeil, B., Faulkner, J., Morris, J. (2011) Calibration of Multiplexed Fiber-Optic Spectroscopy. *Anal. Chem.*, **83** (7), 2655–2659.
- 34 Schenk, J., Marison, I.W., Stockar, U. von (2007) Simplified Fourier-transform mid-infrared spectroscopy calibration based on a spectra library for the on-line monitoring of bioprocesses. *Analytica Chimica Acta*, **591** (1), 132–140.
- 35 Fairbrother, P., George, W.O., Williams, J.M. (1991) Whey fermentation: on-line analysis of lactose and lactic acid by FTIR spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol*, **35**, 301–305.
- 36 Chmiel, H. (2011) *Bioprozesstechnik*, 3rd edn, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 37 Hakemeyer, C., Strauss, U., Werz, S., Jose, G.E., Folque, F., Menezes, J.C. (2012) At-line NIR spectroscopy as effective PAT monitoring technique in Mab cultivations during process development and manufacturing. *Talanta*, **90**, 12–21.
- 38 Henriques, J.G., Buziol, S., Stocker, E., Voogd, A., Menezes, J.C. (2010) Monitoring Mammalian Cell Cultivations for Monoclonal Antibody Production Using Near-Infrared Spectroscopy, in *Optical Sensor Systems in Biotechnology* (ed G. Rao), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 29–72.
- 39 Sandor, M., Rüdinger, F., Bienert, R., Grimm, C., Solle, D., Scheper, T. (2013) Comparative study of non-invasive monitoring via infrared spectroscopy for mammalian cell cultivations. *Journal of Biotechnology*, **168** (4), 636–645.
- 40 Weyer, L.G. and Lo, S.-C. (2002) Spectra-Structure Correlations in the Near-infrared, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 1817–1837.
- 41 Butler, M. and Menezes-Acosta, A. (2012) Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, **96** (4), 885–894.
- 42 Kornmann, H., Valentinotti, S., Duboc, P., Marison, I., Stockar, U. von (2004) Monitoring and control of *Gluconacetobacter xylinus* fed-batch cultures using in situ mid-IR spectroscopy. *Journal of Biotechnology*, **113** (1-3), 231–245.
- 43 Mazarevica, G., Diewok, J., Baena, J.R., Rosenberg, E., Lendl, B. (2004) On-Line Fermentation Monitoring by Mid-infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, **58** (7), 804–810.
- 44 Doran, P.M. (2013) *Bioprocess engineering principles*, 2nd edn, Academic Press, Waltham, MA, USA.
- 45 Shurvell, H. (2002) Spectra-Structure Correlations in the Mid- and Far-infrared, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds J.M. Chalmers and P.R. Griffiths), Wiley, Chichester, pp. 1783–1816.
- 46 Maeda, H., Ozaki, Y., Tanaka, M., Hayashi, N., Kojima, T. (1995) Near infrared spectroscopy and chemometrics studies of temperature-dependent spectral variations of water: relationship between spectral changes and hydrogen bonds. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **3**, 191–201.
- 47 Tamburini, E., Vaccari, G., Tosi, S., Trilli, A. (2003) Near-Infrared Spectroscopy: A Tool for Monitoring Submerged Fermentation Processes Using an Immersion Optical-Fiber Probe. *Applied Spectroscopy*, **57** (2), 132–138.
- 48 Levy, D.E. and Fügedi, P. (2006) *The Organic Chemistry of Sugars*, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

- 49 DeBerardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., Thompson, C.B. (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current Opinion in Genetics & Development*, **18** (1), 54–61.
- 50 Sun, X. and Zhang, Y. (2004) Glutamine cannot support recombinant CHO cell growth and maintenance in the absence of glucose. *Process Biochemistry*, **39** (6), 719–722.
- 51 Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., Wurm, F.M. (2013) Lactate metabolism shift in CHO cell culture: the role of mitochondrial oxidative activity. *New Biotechnology*, **30** (2), 238–245.
- 52 Tritsch, G.L. and Moore, G.E. (1962) Spontaneous Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media. *Experimental Cell Research*, **28** (2), 360–364.
- 53 Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (2005) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7th edn, Thieme, Stuttgart, New York.
- 54 Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **74** (3-5), 141–173.
- 55 Luo, J., Vijayasankaran, N., Autsen, J., Santuray, R., Hudson, T., Amanullah, A., Li, F. (2012) Comparative metabolite analysis to understand lactate metabolism shift in Chinese hamster ovary cell culture process. *Biotechnol. Bioeng.*, **109** (1), 146–156.
- 56 Clayden, J. (2001) *Organic Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, New York.
- 57 Awichi, A., Tee, E.M., Srikanthan, G., Zhao, W. (2002) Identification of Overlapped Near-Infrared Bands of Glucose Anomers Using Two-Dimensional Near-Infrared and Middle-Infrared Correlation Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, **56** (7), 897–901.
- 58 Libnau, F.O., Christy, A.A., Kvalheim, O.M. (1994) Resolution of infrared spectra and kinetic analysis of mutarotation of D-glucose in water by sequential rank analysis. *Vibrational Spectroscopy*, **7** (2), 139–148.
- 59 Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., Lister, S.J. (1989) Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy*, **43** (5), 772–777.
- 60 Lücking, Tim H.: Entwicklung einer universellen Bypass-Messkammer und Automatisierungsplattform für die Überwachung und Regelung von Tierzellkultivierungen, unveröffentlichte Dissertation, Leibniz Universität Hannover (2015)
- 61 Sandor, Marko: ATR-FT-IR-Spektroskopie als Methode zur quantitativen Analyse bei Fermentationsprozessen, unveröffentlichte Diplomarbeit, Leibniz Universität Hannover (2010)

## Danksagung

Als allererstes möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Thomas Scheper bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte unter seiner Leitung am TCI promovieren zu können. Im gleichen Zuge möchte ich mich für die überaus gute Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen während dieser Episode meines Lebens bedanken. Ich hatte die Gelegenheit zu „kultivieren“ und dabei meinen Horizont als Chemiker zu erweitern. Dafür möchte ich mich herzlich bei Dir bedanken.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferats und für die Bereitschaft den langen Weg von Hohenheim nach Hannover auf sich zu nehmen.

Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich ebenfalls vielmals für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Christian Grimm und Dr. Roland Bienert von der Sartorius AG für die außerordentlich gute Unterstützung und Hilfe während des gesamten Projektes. Herzlichen Dank euch beiden.

Dr. Dörte Solle danke ich für die exzellente Betreuung während der gesamten Promotionszeit. Ich danke Dir vielmals für all Deine Ratschläge, Tipps, die gute Zusammenarbeit und die Einführung in die Chemometrie. Ich bin Dir auch sehr dankbar für dein offenes Ohr, du warst bei Problemen jeglicher Art immer sehr hilfsbereit!

Ich danke Dr. Michael Büring für all die Unterstützung in der Anfangszeit rund um die Reaktorkultivierung. Es hat richtig Spaß gemacht von Dir zu lernen. Auch wenn ich jetzt nicht mehr zu den *Northmen* gehöre, schätzte ich doch sehr die Freundschaft, die sich daraus entwickelt hat.

Mein herzlicher Dank gilt auch Martina Weiß, Martin Pähler, Thorsten Stempel, Friedbert Gellermann, Thorleif Hentrop und Frau Alic für die vielen kleinen Dinge, die einem das Leben am Institut vereinfacht haben.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die bei der Kultivierung geholfen und mich unterstützt haben. Dazu zählen Sophia Bonk, Dr. Ferdinand Rüdinger, Dr. Tim Lücking, Shaobin Lu, Christian Lüder und Dr. David Bulnes. Auch wenn die Nächte mal lang waren und es einige Nerven gekostet hat, ich denke sehr positiv an die Zeit zurück.

Meinen Bürokollegen Janis, Alex, Christopher und Andreas möchte ich für die tolle Atmosphäre am Arbeitsplatz danken. Wir waren schon ein verrücktes Büro, ich sage nur „ram param param...“ ☺



Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mich immer darin unterstützt meine Ziele und Träume zu erreichen. Ich danke auch meinen beiden kleinen großen Schwestern und den Familien für all die Unterstützung während dieser Zeit.

Zuletzt möchte ich einer ganz besonderen Person in meinem Leben danken. Alaa, du hast mich während der gesamten Zeit voll und ganz unterstützt und hast nie den Glauben an mich verloren – manchmal vielleicht die Nerven 😊. Wenn ich mal verzweifelt war, standst du mir stets zur Seite und hast mich aufgemuntert und mir wieder Mut gemacht. Das werde ich Dir nie vergessen!

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Marko Sandor
Geburtsdatum:	18.11.1981
Geburtsort:	Höxter
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet

### Studium und Promotion:

10/2010 – 07/2016	Promotion am Institut für Technische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper Titel: „ <i>Evaluierung der Mittel- und Nahinfrarotspektroskopie zur online Überwachung von CHO-Kultivierungen</i> “
02/2010 – 08/2010	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover Titel: „ <i>ATR-FT-IR-Spektroskopie als Methode zur quantitativen Analyse bei Fermentationsprozessen</i> “ Note: gut
10/2002 – 08/2010	Chemiestudium, Leibniz Universität Hannover Note: gut

## Publikationsliste

### Veröffentlichungen

S. Bonk, M. Sandor, F. Rüdinger, B. Tscheschke, A. Prediger, A. Babitzky, D. Solle, S. Beutel, T. Scheper (04/2011); *In-situ* microscopy and 2D fluorescence spectroscopy as online methods for monitoring CHO cells during cultivation; BMC Proceedings 2011, 5 (Suppl 8):P76; Kurzpapier zum 22. ESACT Meeting 2011; Wien

M. Sandor, F. Rüdinger, R. Bienert, C. Grimm, D. Solle, T. Scheper (06/2013); Comparative Study of Non-invasive Monitoring via Infrared Spectroscopy for Mammalian Cell Cultivations; Journal of Biotechnology  
Status: Akzeptiert

### Vorträge

M. Sandor, S. Bonk, D. Tischer, M. Büring, D. Solle, C. Endres, D. Riechers, C. Grimm, S. Beutel, T. Scheper (09/2011); Evaluation of different spectroscopic methods for quantitative analysis during cultivation processes (ECAB zusammen mit der 29. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Berlin)

### Posterbeiträge

S. Bonk, M. Sandor, F. Rüdinger, B. Tscheschke, A. Prediger, A. Babitzky, D. Solle, S. Beutel, T. Scheper (04/2011); *In-situ* microscopy and 2D fluorescence spectroscopy as online methods for monitoring CHO cells during cultivation (22. ESACT Meeting 2011; Wien)

M. Sandor; F. Rüdinger, R. Bienert, D. Riechers, D. Solle, C. Grimm, T. Scheper (09/2012); Online-Überwachung von Säugetierzellkultivierungen mittels Nah- und Mittelinfrarotspektroskopie (30. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen; Karlsruhe)

M. Sandor, F. Rüdinger, R. Bienert, D. Solle, C. Grimm, T. Scheper (03/2013); Mittel- und Nahinfrarotspektroskopie zur online Überwachung von CHO-Kultivierungen (DECHEMA Frühjahrstagung der Biotechnologen 2013; Frankfurt am Main)