

# Entwicklung eines *in situ* Sensors zur Messung der metabolischen Aktivität in Bioprozessen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

**Christoph Busse, M.Sc.**

geboren am 01.06.1986 in Bad Oeynhausen

2017

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 16.01.2017

## Kurzfassung

Um biotechnologische Prozesse sicher und effizient zu gestalten sind Sensoren nötig, die den Prozess- und besonders den Zellzustand möglichst nicht-invasiv und *in situ* erfassen. Vor Allem Sensoren zur Beobachtung der metabolischen Aktivität der Zellen und zur Beurteilung des Zustands des Gesamtprozesses fehlen bisher.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuartiger *in situ* Kombi-Sensor (ISICOM) präsentiert und charakterisiert, der den spezifischen Sauerstoffverbrauch (qOUR) der Zellpopulationen direkt im Reaktor (*in situ*) während des Kultivierungsprozesses erfasst. Der ISICOM ist so konzipiert, dass nicht die gesamte Zellsuspension im Reaktor vermessen wird, sondern ein definiertes, zeitlich segmentiertes Volumen. Dazu besteht der Sensor aus einer kurzzeitig, dicht verschließbaren, durchmischten Messkammer, die mit einem pO<sub>2</sub>- Sensor basierend auf Glasfaseroptik versehen wird. Über eine integrierte Streulichtoptode ist außerdem die Biomassekonzentration bestimmbar. Bei geschlossener Kammer wird die spezifische Sauerstoffaufnahme rate somit direkt, mittels der dynamischen Methode, zugänglich, ohne den Kultivierungsprozess zu beeinflussen oder eine Probe aus dem Reaktor zu nehmen. Ein dritter Sensorzugang erlaubt die Nutzung weiterer faseroptischer Sensoren, was in der vorliegenden Arbeit am Beispiel einer pH-Optode gezeigt wird.

Die technische Charakterisierung hinsichtlich mechanischer Funktion und Sterilsicherheit des ISICOM sowie Langzeitstabilität und Antwortverhalten der integrierten optischen Sensoren zeigte, dass der Kombi-Sensor für den Einsatz im Bioprozess geeignet ist. Limitierungen treten lediglich bei geringen Trübungen OD<sub>600</sub> < 2,58 oder sehr hohen Sauerstoffverbrauchsraten OUR > 22 mmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> auf.

Dies wurde durch Einsatz des ISICOM an verschiedenen biotechnologisch relevanten Kultivierungsprozessen (*E. coli*, *P. pastoris*, *Chinese Hamster Ovary* (CHO)) bestätigt. Während auf Basis der Trübungsmessung bei den mikrobiellen Prozessen lineare Kalibrationsmodelle bis zu optischen Dichten von 135 möglich sind, ist die OUR aufgrund des hohen Verbrauchs der Organismen nur eingeschränkt bestimmbar. Im Gegensatz dazu ist die OUR während der CHO-Kultivierung sehr gut messbar, da die Verbrauchsraten mit maximal 2,5 mmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> deutlich niedriger sind. Mit einem polynomischen, bivariaten Modell kann zudem die Zellkonzentration aus den Trübungsmessungen zwischen 1 · 10<sup>6</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup> und 18,6 · 10<sup>6</sup> Zellen·mL<sup>-1</sup> ermittelt werden. Dadurch ist die qOUR während des Prozesses erstmals *online, in situ* bestimmbar und eine Beschreibung der biologischen Aktivität hinsichtlich Wachstumsphase oder Nährstoffmangel wird möglich.

**Stichwörter:** Bioprozessüberwachung, *in situ* spezifische Sauerstoffaufnahme rate, Sensor Systeme



## Abstract

To design biotechnological processes safely and effectively sensors are needed, that monitor the process- and especially the cell-condition non invasive and *in situ*. Particularly sensors for monitoring the metabolic activity of the cells and for evaluating the state of the overall process are missing.

This work presents the development of a new *in situ* Combi Sensor (ISICOM) to measure the specific oxygen uptake rate (qOUR) of cell populations in the bioreactor (*in situ*) directly during a cultivation process. The ISICOM is designed in a way, that not the whole cell suspension in the reactor is measured, but a defined temporary segmented volume. The Sensor consists of a sealable, mixed measurement chamber that is equipped with a pO<sub>2</sub>-optode. The integrated backscattered light detector is used to determine biomass. When the chamber is closed the specific oxygen uptake rate is accessible directly by using the dynamic method, without disturbing the cultivation process or sample taking. A third sensor port allows the implementation of another optical sensor, which is demonstrated by the use of a pH-optode in this work.

The technical characterization in terms of mechanical functionality and sterility safety of the ISICOM as well as long term stability and response time of the integrated optical sensors showed that the Combi Sensor is suitable for the use in bioprocesses. Limitations just occur when it comes to little turbidities of OD<sub>600</sub> < 2,58 or very high oxygen uptake rates OUR > 22 mmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>.

This could be confirmed by using the ISICOM with different biotechnologically relevant cultivation processes (*E. coli*, *P. pastoris*, *Chinese Hamster Ovary* (CHO)). Whereas the turbidity measurement during the microbial processes allowed linear calibration models up to optical densities of 135, the OUR was determinable only to a limited extend, due to high oxygen uptake by the organisms. On the contrary the OUR was measurable very well during the CHO cultivation, because the oxygen uptake is much lower (max. 2,5 mmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>). By the use of a polynomial, bivariate calibration model the cell concentration was determinable in the range of 1 · 10<sup>6</sup> cells·mL<sup>-1</sup> to 18,6 · 10<sup>6</sup> cells·mL<sup>-1</sup> from the turbidity measurement. Thus the qOUR can be monitored during the process *online, in situ* for the first time and a description of the biological activity in terms of growth phase determination or nutrient depletion becomes possible.

**Keywords:** Bioprocess monitoring, *in situ* specific oxygen uptake rate, sensor systems



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Bioprozessüberwachung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Sensoren zur Bestimmung der Biomasse.....	3
2.1.1 Trübungssensoren .....	4
2.1.2 Impedanzspektroskopie .....	5
2.1.3 In situ Mikroskopie .....	5
2.2 Sensoren zur Sauerstoffmessung .....	6
2.2.1 Clark-Elektrode .....	6
2.2.2 Sauerstoffoptoden .....	7
2.3 Sensoren zur pH-Wert Messung.....	9
2.3.1 Elektrochemische Sensoren .....	9
2.3.2 Optoden .....	10
2.4 Bestimmung der metabolischen Aktivität in Bioprozessen.....	11
2.4.1 Kalorimetrie.....	12
2.4.2 Spektroskopie .....	13
2.4.3 NMR Spektroskopie .....	13
2.4.4 Bestimmung der Sauerstoffaufnahme.....	14
2.4.4.1 Gasmassenbilanzierung.....	15
2.4.4.2 Flüssigphasenbilanz .....	17
2.4.4.3 Dynamische Methode.....	18
2.4.4.4 Spezifische Sauerstoffaufnahme.....	19
<b>3. Konzept und Design des ISICOM</b> .....	<b>21</b>
3.1 Technische Umsetzung des Konzepts.....	23
3.2 Sensorsteuereinheit.....	26
3.3 Sensorintegration .....	27
3.4 Aufbau des Verschlussmechanismus .....	30
3.5 Aufbau des Rührmechanismus.....	32
<b>4. Charakterisierung des Sensors</b> .....	<b>34</b>
4.1 Verschlussmechanismus.....	34
4.1.1 Sterilfunktion.....	34
4.1.2 Gasdichtheit .....	34

4.2	Rührmechanismus.....	36
4.2.1	Einfluss des Rührers auf die Trübungsmessung.....	36
4.2.2	Ermittlung der optimalen Rührfrequenz.....	37
4.2.3	Zellschädigung durch den Rührmechanismus.....	38
4.3	Trübungssonde .....	40
4.3.1	Kalibrationen mit Trübungsstandard .....	40
4.3.2	Kalibrationen mit <i>E. coli</i> .....	43
4.3.3	Langzeitstabilität und Temperaturabhängigkeit.....	44
4.4	Bestimmung der Sauerstoffkonzentration.....	45
4.4.1	Ansprechverhalten des pO <sub>2</sub> -Sensors.....	46
4.4.2	Langzeitstabilität.....	48
4.4.3	Temperaturabhängigkeit .....	49
4.4.4	Ermittlung der Sauerstoffaufnahme im Modell .....	49
4.5	Nutzung des dritten Sensorports zur Messung des pH-Werts.....	52
4.6	Zusammenfassung der Sensorcharakterisierung.....	53
<b>5.</b>	<b>Anwendung zur Bioprozessüberwachung .....</b>	<b>58</b>
5.1	Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> K1 zur Produktion von Polysialinsäure	58
5.1.1	Kalibration der Trübungssonde .....	59
5.1.2	Messung des pH-Werts.....	61
5.1.3	Bestimmung der Sauerstoffaufnahme .....	63
5.1.4	Zusammenfassung der Bioprozessüberwachung von <i>E. coli</i> K1 .....	65
5.2	Batch-Kultivierung von <i>P. pastoris</i> zur Erzeugung hoher Biomasse.....	66
5.2.1	Kalibration der Trübungssonde .....	66
5.2.2	Bestimmung der Sauerstoffaufnahme .....	68
5.2.3	Zusammenfassung der Bioprozessüberwachung von <i>P.</i> <i>pastoris</i> .....	70
5.3	Batch-Kultivierung von CHO K1.....	70
5.3.1	Kalibration der Trübungssonde .....	70
5.3.2	Bestimmung der Sauerstoffaufnahme .....	74
5.3.3	Betrachtung der spezifischen Sauerstoffaufnahme.....	77
5.3.4	Zusammenfassung der Bioprozessüberwachung von CHO K1	80
5.4	Zusammenfassung der Anwendung des ISICOM zur Bioprozessüberwachung.....	81

---

<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>85</b>
<b>7. Ausblick.....</b>	<b>89</b>
<b>8. Literatur.....</b>	<b>91</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>105</b>
9.1  Material.....	105
9.1.1  Lösungen und Kulturmedien.....	105
9.1.2  Formazin Standarddispersion nach ISO 7027.....	107
9.1.3  Materialien und Geräte.....	107
9.1.4  Materialien und Bauteile für den ISICOM.....	110
9.1.5  Chemikalien .....	112
9.2  Methoden.....	114
9.2.1  Konstruktion, Messung und Datenauswertung des ISICOM ...	114
9.2.1.1  Konstruktion und Bau.....	114
9.2.1.2  Messstation zur Sensorcharakterisierung im 0,5 L Maßstab.....	114
9.2.1.3  Sensorkalibration und Installation.....	115
9.2.1.4  Messparameter, Datenauswertung und OUR- Berechnung.....	115
9.2.2  Messung mit Formazin als Kalibrationsstandard .....	116
9.2.3  Messung von Zellsuspensionen mit konstanter Konzentration .....	117
9.2.4  Mikrobielle Arbeiten.....	118
9.2.4.1  Stammhaltung.....	118
9.2.4.2  Schüttelkolben Kultur <i>E. coli</i> .....	119
9.2.4.3  Schüttelkolben Kultur <i>P. pastoris</i> .....	119
9.2.4.4  Schüttelkolben Kultur <i>S. cerevisiae</i> .....	119
9.2.4.5  Schüttelkolben Kultur CHO K1 .....	119
9.2.5  Reaktorkultivierungen.....	120
9.2.5.1 <i>E. coli</i> K1 .....	120
9.2.5.2 <i>P. pastoris</i> .....	121
9.2.5.3  CHO K1.....	122
9.2.5.4  Datenaufzeichnung .....	123
9.2.5.5  Abgasanalytik und Gasmassenbilanzierung .....	123

9.2.6	Offline Analytik .....	124
9.2.6.1	Bestimmung der optischen Dichte.....	124
9.2.6.2	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	124
9.2.6.3	Zellkonzentrationsmessungen .....	125
9.2.6.4	Nährstoff- und Metabolitkonzentrationsmessungen .....	125
9.3	Ergänzende Graphen .....	127
9.3.1	Ermittlung der optimalen Rührfrequenz mit <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	127
9.3.2	Langzeitstabilität der Trübungsmessung mit dem ISICOM....	127
9.3.3	Variable lineare oder polynomische Auswertung der Steigung .....	128
9.3.4	Typische Kalibrationsfunktion einer pH-Optode .....	128
9.3.5	Abhängigkeit der Trübungsmessung von der Reaktor- Rührerdrehzahl.....	129
9.3.6	Vergleich der offline OUR Bestimmung mit den ISICOM Messwerten für drei CHO K1 Batch-Kultivierungen .....	129
9.3.7	qOUR Verläufe von drei CHO K1 Kultivierungen.....	130
9.4	Technische Zeichnungen des ISICOM .....	131
9.5	Schaltplan der Elektronik der Streulichtsonde des ISICOM.....	146
9.6	Unterstützende Arbeiten .....	147

## Abkürzungen

%-sat	Sättigungsprozent
°C	Grad Celsius
$\mu$	spezifische Wachstumsrate [ $d^{-1}$ ]
$\mu A$	Mikroampere
$\mu L$	Mikroliter
$\mu m$	Mikrometer
2D	Zweidimensional
a	Austauschfläche [ $m^2$ ]
BMMY	<i>Buffered Methanol Complex Medium</i>
BMYG	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BTM	Biotrockenmasse [ $g \cdot L^{-1}$ ]
CAD	<i>computer aided design</i>
CCD	<i>charged coupled device</i>
$c_G$	Sauerstoffkonzentration in der Gasphase [ $mol \cdot L^{-1}$ ]
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
$c_L$	Konzentration in der Flüssigkeit [ $mol \cdot L^{-1}$ ]
$c_L^*$	Sauerstoffsättigungskonzentration [ $mol \cdot L^{-1}$ ]
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPP	<i>critical process parameter</i>
$c_X$	Biomasse bzw. Zellkonzentration [ $g \cdot L^{-1}$ bzw. Zellen $\cdot mL^{-1}$ ]
d	<i>day</i> , Tag
DCU	<i>digital computation unit</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk
et al.	<i>lat. et alii</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FDM	<i>Fused Deposition Modeling</i>
FNU	<i>Formazin Nephelometrie Units</i>
g	Gramm
GMB	Gasmassenbilanzierung
GOD	Glukoseoxidase
H	Henry-Koeffizient [ $bar \cdot L \cdot mol^{-1}$ ]
h	<i>hour</i> , Stunden
HTPS	8-Hydroxyl-1,3,6-Pyrentrisulfonsäure
IR	Infrarot (Licht)
ISFET	Ionen selektiver Feldeffekttransistor
ISICOM	<i>in situ</i> Kombi-Sensor
ISM	<i>in situ</i> Mikroskop

K <sub>auf</sub>	ISICOM Messkammer geöffnet
kHz	Kilohertz
K <sub>La</sub>	Volumenbezogener Sauerstoffübertragungskoeffizient [h <sup>-1</sup> ]
K <sub>zu</sub>	ISICOM Messkammer geschlossen
L	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LED	<i>Light emitting diode</i>
M	Molar [mol·L <sup>-1</sup> ]
mA	Milliampere
MHz	Megahertz
min	Minute
MIR	Mittleres Infrarot
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar [mmol·L <sup>-1</sup> ]
mmol	Millimol
NADH/NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NIR	Nahes Infrarot
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
OTR	<i>oxygen transfer rate</i>
OUR	<i>oxygen uptake rate</i> [mmol L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]
PAT	Prozess Analysen Technologien
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PG	Panzergewinde
pH	<i>lat. Potentia Hydrogenii</i>
PLA	Polylactide
pmol	Picomol
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck [%-sat]
polySia	Polysialinsäure, α2,8-verknüpfte 5-N-Acetylneuraminsäure
POM	Polyoxymethylen
Pt100	Platinmesswiderstand mit 100 Ohm
PTFE	Polytetrafluorethylen
<i>p<sub>tot</sub></i>	Umgebungsdruck [bar]
Qbd	<i>Quality by design</i>
qOUR	<i>specific oxygen uptake rate</i>
R	Gaskonstante [8,214·10 <sup>-2</sup> bar L·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
rel. AU	<i>relative amplitude units</i>

RMSEC	<i>root-mean-square error of calibration</i>
RMSEV	<i>root-mean-square error of validation</i>
rpm	<i>Revolution per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S/N	<i>signal to noise ratio</i> , Signal-Rauschverhältnis
SIP	<i>steam in place</i>
SMA	Sub-Miniature-A
STR	<i>stirred tank reactor</i>
t	Zeit
T	Temperatur [°K]
t <sub>90</sub>	Ansprechzeit bei der 90% einer Sprunghaften Änderung erreicht sind
TCC	<i>total cell concentration</i> [Zellen·mL <sup>-1</sup> ]
TiAlN	Titanaluminiumnitrid
USB	Universal Serial Bus
UV/VIS	<i>ultraviolet and visible (light)</i>
(v/v)	<i>volume to volume</i>
VCC	<i>viable cell concentration</i> [Zellen·mL <sup>-1</sup> ]
VE	Deionisiertes Wasser
$\dot{V}_{G_{aus}}$	Gasvolumenstrom am Ausgang
$\dot{V}_{G_{ein}}$	Gasvolumenstrom am Eingang
V <sub>G</sub>	Kopfraumgasvolumen [L]
V <sub>L</sub>	Flüssigkeitsvolumen [L]
vvm	Belüftungsrate in Volumen Luft pro Volumen Kulturmedium pro Minute
x <sub>G</sub>	Gravitation
y <sub>aus</sub>	Stoffmengenanteil Sauerstoff am Ausgang [%]
y <sub>ein</sub>	Stoffmengenanteil Sauerstoff am Eingang [%]
y <sub>G</sub>	Stoffmengenanteil Sauerstoff in der Gasphase [%]
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>



## 1. Einleitung und Zielsetzung

Aktivitätsmessung ist modern. Seien es Armbänder, Uhren oder Smartphones, sie alle versuchen über integrierte Sensoren die körperliche Aktivität ihres Trägers zu ermitteln. Dadurch, so das Versprechen der Hersteller, soll sich langfristig die Fitness und Gesundheit verbessern oder aber der Schlaf erholsamer werden.

Auch in der Biotechnologie gewinnt die Aktivitätsmessung immer mehr an Bedeutung. In Bioprozessen werden gentechnisch veränderte Mikroorganismen in Bioreaktoren kultiviert und produzieren dabei ein wertschöpfendes Erzeugnis, wie zum Beispiel hochwertige biopharmazeutische Arzneimittel. Besonders die metabolisch aktiven Zellen sind an dieser Produktbildung beteiligt, weshalb es entscheidend ist, ihren Anteil möglichst hoch zu halten.

Damit dies noch besser gelingt und für die Zellen optimale Wachstums- und Produktbildungsbedingungen herrschen, sind Sensoren nötig, die den Prozess- und insbesondere den Zellzustand möglichst in Echtzeit, nicht-invasiv und *in situ* erfassen. Mit den bislang gut etablierten Sensoren können verschiedene Größen wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt oder Nährstoffkonzentration überwacht und geregelt werden. Speziell Sensoren zur Beobachtung der metabolischen Aktivität der Zellen fehlen jedoch bisher.

Eine Vielzahl von mikrobiellen Prozessen, die meisten Pilzkulturen und alle Säugerzellkulturen sind aerob und verbrauchen während des Wachstums Sauerstoff. Verglichen mit den höheren Lebewesen, wie zum Beispiel uns Menschen, steigt der Sauerstoffbedarf bei erhöhter körperlicher – also metabolischer – Aktivität an. Daher ist die Sauerstoffaufnahme (*oxygen uptake rate*, OUR) bzw. die spezifische Sauerstoffaufnahme pro Zelle (*qOUR*) ein robuster Indikator zur Bestimmung zellulärer Aktivität.

Zur *online* Messung der OUR sind bisher in der Regel teure, komplexe Analysesysteme, wie zum Beispiel Massenspektrometer oder störende Eingriffe in den Bioprozess nötig, die sich zudem nicht bei jedem Prozess integrieren lassen. Neue Messsysteme zur Echtzeitbestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme sind daher notwendig, um Bioprozesse in Zukunft effizienter überwachen und regeln zu können. Auf dieser Basis können zum Beispiel Zufütterungs (engl. *Feed*) -Strategien entwickelt oder der optimale Erntezeitpunkt am Ende eines Bioprozesses ermittelt werden, wodurch sich die Prozessproduktivität langfristig erhöht.

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Charakterisierung eines neuartigen *in situ* Kombi-Sensors (im Folgenden als ISICOM bezeichnet), der den spezifischen Sauerstoffverbrauch der Zellpopulationen direkt im Reaktor während des Kultivierungsprozesses erfasst. Das verwendete Messprinzip basiert auf dem kurzzeitigen Stopp der Gaszufuhr und Auswertung des Abfalls der Sauerstoffkonzentration, bedingt durch die respiratorische Aktivität der Organismen (dynamische Methode, siehe Kapitel 2.4.4.3). Der ISICOM ist so konzipiert, dass nicht die gesamte Zellsuspension im Reaktor vermessen wird, sondern ein definiertes, zeitlich segmentiertes Volumen. Dazu besteht der Sensor aus einer kurzzeitig dicht verschließbaren Messkammer, die mit einem auf Glasfaseroptik basierenden Sauerstoffsensor beobachtet wird. Über eine integrierte Streulichtoptode ist außerdem die Biomassekonzentration bestimmbar. Zusätzlich ist ein Multisensorport vorgesehen, mit dem ein dritter optischer Sensor, wie zum Beispiel eine pH-Optode, ergänzt werden kann. Bei geschlossener Kammer wird die spezifische Sauerstoffaufnahme somit direkt, mittels der dynamischen Methode, zugänglich, ohne den Kultivierungsprozess zu beeinflussen oder eine Probe aus dem Reaktor zu entnehmen.

## 2. Bioprozessüberwachung

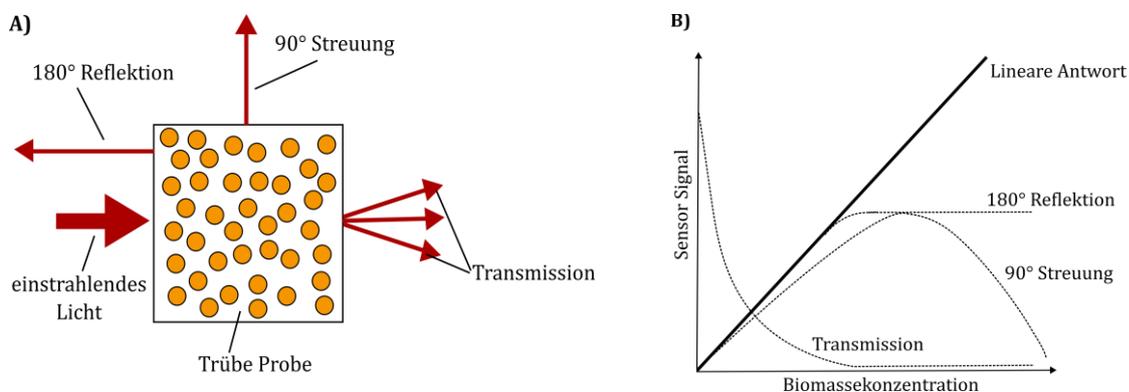
Biotechnologische Prozesse werden in verschiedensten Bereichen der chemischen und pharmazeutischen Industrie eingesetzt. Es handelt sich dabei um komplexe Mehrphasenprozesse, deren Beschreibung in ihrer Gesamtheit, wenn überhaupt nur mit erheblichem Zeit- und Kostenaufwand möglich ist. Hieraus resultiert der Bedarf an Sensoren, die detaillierte Echtzeitinformationen über den Prozess liefern. Eine umfassende Prozessüberwachung ist fundamental für eine verlässliche Prozessbeschreibung und -regelung [1]. Neben Prozessgrößen wie Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), pH und Temperatur sind insbesondere die chemischen und biologischen Zustandsgrößen des Systems für die Prozessregelung relevant. Hierbei ist die Bestimmung der Biomassekonzentration von besonderer Bedeutung, wobei aber nur der Anteil an lebenden und metabolisch aktiven Zellen in der Lage ist, weitere Biomasse oder das wertschöpfende Produkt zu bilden [2, 3]. Die Bestimmung dieser Größe – möglichst *online* – stellt eine der Herausforderungen in der Bioprozessbeobachtung dar.

### 2.1 Sensoren zur Bestimmung der Biomasse

Für die *online* Bestimmung der Biomasse in mikrobiellen Fermentationen kommen häufig optische Sensoren zum Einsatz, mit denen die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) der Kulturbrühe bestimmt wird. Auch kapazitive Sensoren oder *in situ* Mikroskopiesysteme sind für die online Messung geeignet. Alle Systeme müssen für das jeweilige biologische System gegen die üblichen mikroskopischen, gravimetrischen oder photometrischen *offline* Referenzmessungen kalibriert werden [4].

## 2.1.1 Trübungssensoren

Kommerziell erhältliche Trübungssonden basieren entweder auf einer Messung in Transmission, Reflektion oder Streulicht bzw. einer Kombination daraus (Abbildung 1 A) [2]. Die Emission des Lichts erfolgt in der Regel durch eine LED (*light emitting diode*) oder einen Laser mit einer Wellenlänge im nahen Infrarot (840 - 910 nm), da viele Medienbestandteile in diesem Bereich kaum Absorption zeigen [5]. Bei geringen bis mittleren Trübungen wird vorzugweise in Transmission oder im 90°-Winkel gemessen. Die 180° Reflexionsmessung wird für hochdichte Suspensionen genutzt (Abbildung 1 B). Der Vorteil der Reflexionsmessung ist, dass lediglich ein Lichtwellenleiter für Emission und Detektion benötigt wird [6]. Hauptsächlich für die Überwachung von mikrobiellen Kultivierungen entwickelt, finden diese Sensoren auch Anwendung in der tierischen Zellkultur. Merten *et al.* konnten bei einer Hybridoma-Zellkultivierung eine lineare Kalibration zur Bestimmung der Zellzahl von  $0,4$  bis  $2 \times 10^6$  Zellen·mL<sup>-1</sup> ermitteln [7, 8]. Ein Beispiel für eine Sonde, die nach dem Reflexionsprinzip arbeitet, ist der InPro 8100 Sensor der Mettler-Toledo GmbH, Gießen.



**Abbildung 1:** (A) Verschiedene Anordnungsmöglichkeiten von eingestrahlt zu detektiertem Licht. (B) Sensorsignal als Funktion der Biomassekonzentration für verschiedene Trübungsmessungen. Modifiziert nach [9].

Mit der Trübungsmessung kann nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Auch Zelltrümmer, Partikel und Luftblasen beeinflussen das Signal, sodass dies bei der Kalibrierung und Auswertung berücksichtigt werden muss.

### 2.1.2 Impedanzspektroskopie

Bei der Impedanzmessung im Bioreaktor wirkt die intakte Zellmembran wie ein Dielektrikum im elektrischen Feld und sorgt für einen Polarisierungseffekt, der mit der Biomasse korreliert.

Zur Messung wird ein sinusförmiges, elektrisches Feld mit Hilfe zweier Platin-Elektroden gebildet, die direkt mit der Probe in Kontakt stehen. Die elektrische Permittivität der Probe wird durch die Biomassekonzentration beeinflusst und gemessen [9].

Da die Plasmamembran von toten Zellen nicht mehr intakt ist, beeinflussen diese das Signal nicht und nur lebende Zellen werden von der Messung erfasst [10, 11]. Diese Technologie eignet sich besonders für größere Zellen, wie z.B. tierische Zelllinien [12], ist aber durch die Leitfähigkeit des verwendeten Mediums limitiert. Außerdem beeinflussen Änderungen der Begasung das Signal, da Gasblasen das Flüssigkeitsvolumen in der Messzone verändern [3].

Kommerziell erhältliche, moderne Impedanzsensoren nutzen Frequenz-*Scanning* Techniken in Bereichen zwischen 100 KHz und 20 MHz (Dielektrische Spektroskopie). Dadurch sind nicht nur Rückschlüsse auf die Zellgröße und Volumen möglich, sondern auch Informationen über den metabolischen Zustand einer Kultur zugänglich [10]. Beispielsweise konnte zwischen wachsenden und sporulierenden Zellen sowie ausgereiften Sporen von *Bacillus thuringiensis* während der Endotoxinproduktion unterschieden werden [13, 14]. Auch die Lipideinlagerung in Hefen wurde erfolgreich mit der Impedanzspektroskopie beobachtet [15].

### 2.1.3 *In situ* Mikroskopie

Bei der *in situ* Mikroskopie (ISM) werden mikroskopische Systeme in den Bioreaktor eingebaut. Sie erlauben die kontinuierliche Aufnahme von Bildern der Organismen in der Kulturbrühe während des Bioprozesses. Daraus können mittels Bildverarbeitungsalgorithmen Informationen über die Zellkonzentration, Zellgröße oder Morphologie gewonnen werden [16].

Üblicherweise befindet sich am reaktorseitigen Ende des ISM ein Messspalt, welcher aus zwei gegenüberliegenden Saphirglasscheiben gebildet wird. Die Messspaltbreite ist variabel und wird entsprechend der beobachteten Organismen und deren

Konzentration angepasst. Zur Fokussierung der Aufnahmen wird die Position des Objektivs zum Messspalt angepasst. Der Messspalt wird durch eine LED ausgeleuchtet und die Bilder mit einer CCD (*charged coupled device*) Kamera aufgezeichnet [17].

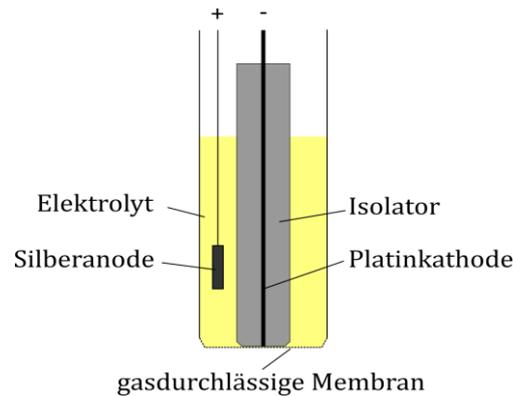
ISM Systeme wurden bereits zur *online* Überwachung einer Vielzahl von Bioprozessen genutzt [17–23]. Durch die Kombination mit weiterer *online* Sensorik (MIR (*mid-infrared*)-Spektroskopie) konnte z.B. der Prozessstatus von CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Kultivierungen verlässlich ermittelt und zur Regelung genutzt werden [24].

### 2.2 Sensoren zur Sauerstoffmessung

Der Gelöst-Sauerstoffgehalt bzw. der hierzu korrelierende Sauerstoffpartialdruck in der Kulturbrühe ist eine der wichtigsten chemischen Größen in der Bioprozessüberwachung und muss insbesondere während aerober Prozesse genau erfasst und geregelt werden. Die Sauerstofflöslichkeit und somit der  $pO_2$  hängt stark von der Medienzusammensetzung und Temperatur ab, weshalb die Messung durch diese Parameter beeinflusst wird. Zur Bestimmung des  $pO_2$  in Bioprozessen dienen üblicherweise elektrochemische, amperometrische Clark-Elektroden oder optische Chemosensoren (Optoden). [9, 25]

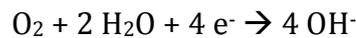
#### 2.2.1 Clark-Elektrode

Eine Clark-Elektrode besteht aus einer Platin-Kathode und einer Referenzanode aus Silber. Die Anode ist umgeben von einer Elektrolytlösung und durch eine isolierende Glasschicht von der Kathode getrennt. Die Kathode endet kurz vor einer sauerstoffdurchlässigen PTFE (Polytetrafluorethylen) Membran, die den Messraum von der flüssigen Phase (z.B. Kulturmedium) trennt. Der Sauerstoff diffundiert aus der flüssigen Phase durch die PTFE Membran in den Elektrolytraum, wobei die Diffusionsrate von dem Sauerstoffpartialdruck abhängig ist. Abbildung 2 zeigt den Aufbau einer Clark-Elektrode schematisch. [26–29]

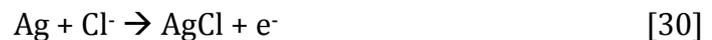


**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau amperimetrischen Sauerstoffelektroden, nach [29].

Durch Anlegen einer Polarisationsspannung wird Sauerstoff an der Kathode reduziert, während an der Anode Silber-Ionen in Lösung gehen. Wenn die Polarisationsspannung konstant und die Reaktion diffusionskontrolliert ist, ist der Stromfluss allein von der Konzentration des Sauerstoffs abhängig. Es ergibt sich die Reaktionsgleichung an der Kathode:



Und an der Anode:



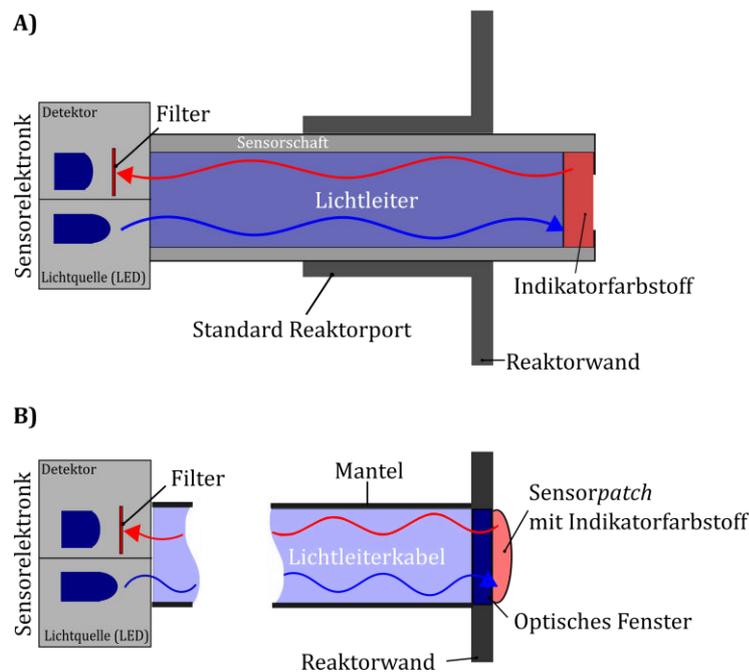
Aufgrund der diffusionsbasierten Messung weisen Clark-Elektroden relativ hohe Ansprechzeiten von bis zu 90 Sekunden auf und sind damit für Anwendungen in denen sehr schnelle Änderungen des Sauerstoffpartialdrucks gemessen werden müssen ungeeignet. Trotzdem sind diese Sensoren in der Bioprozessüberwachung weit verbreitet und somit die Referenzmethode zur Messung des Gelöst-Sauerstoffpartialdrucks.

### 2.2.2 Sauerstoffoptoden

Neben klassischen, amperimetrischen Clark-Elektroden sind faseroptische Sensoren erhältlich. Besondere Vorteile dieser Sensoren sind die sauerstoffverbrauchs-freie Messung, schnellere Ansprechzeit und die gute Miniaturisierbarkeit, was sie

für den Einsatz bei geringen Konzentrationen sowie in kleinen Volumina prädestiniert [31]. Die Messung beruht auf dem dynamischen *Quenching* der Fluoreszenz von Farbstoffen in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff. Der Farbstoff ist dazu an der Spitze eines Lichtwellenleiters immobilisiert und wird z.B. mit Hilfe einer LED zur Fluoreszenz angeregt. Ein häufig verwendeter Farbstoff ist Tris-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin-Ruthenium(II), welcher in einem sauerstoffdurchlässigen hydrophoben Polymer immobilisiert ist. [32–36]

Zur Detektion des emittierten Lichts dient in der Regel eine Photodiode. Die Exzitation und Emission ist durch einen dichroitischen Spiegel oder optischen Filter voneinander getrennt, sodass beide Wellenlängen mit nur einem Lichtleiter gemessen werden können. Der prinzipielle Aufbau von Optoden wird in Abbildung 3 gezeigt.



**Abbildung 3:** Schematischer Aufbau einer Optode für standard Reaktorports (A) und einer modularen Optode mit Sensorpatch an einem optischen Fenster (B). [9]

Neben konventionellen *in situ* Sonden für Standardports von Bioreaktoren sind sogenannte *Sensorpatches* erhältlich (Abbildung 3 B). Diese ermöglichen einen modularen Aufbau, bei dem das Sensorelement durch Aufbringen auf ein optisches Fenster vom Lichtleiter und der Auswerteelektronik getrennt werden kann. Diese An-

ordnung ist bei Einwegbioreaktoren weit verbreitet, bei denen der *Sensorpatch* zusammen mit dem Reaktor mittels  $\gamma$ -Strahlung sterilisiert und im Anschluss an die Kultivierung entsorgt wird. [9]

Die kommerziell erhältlichen Sonden und *Patches* können auch problemlos autoklaviert werden, ohne dass die Sensitivität verloren geht, jedoch ist ihre Langzeitstabilität aufgrund von *Photobleaching* limitiert. Dieser Effekt kann durch Fluoreszenzlebenszeitmessungen anstatt von -intensitätsmessungen reduziert werden [31, 37]. Auch chemische Modifikationen des Indikatorfarbstoffs, wie z.B. mehrfach fluoriertes Platin-Porphyrin können die Signaldrift reduzieren [9].

Messungen bei hohen oder niedrigen pH-Werten beeinflussen die Systeme nicht, jedoch besteht eine starke Temperaturabhängigkeit. Moderne Systeme sind in der Lage, diesen Effekt über die *Gerätesoftware* zu kompensieren. Falls die Medien, in denen gemessen wird, eine intrinsische Fluoreszenz aufweisen, können optische Isolatoren in den Aufbau ergänzt werden, um Störungen zu vermeiden [38].

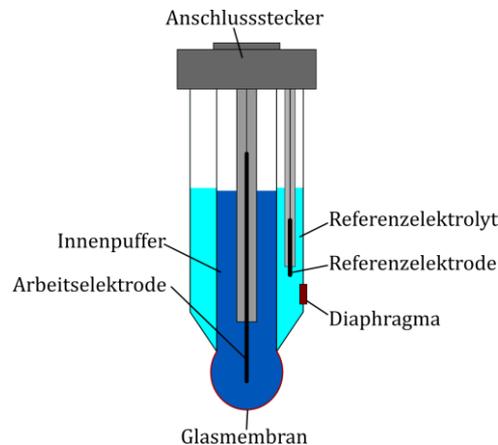
## 2.3 Sensoren zur pH-Wert Messung

In nahezu allen Bioprozessen in wässrigen Lösungen wird neben dem Sauerstoffgehalt auch der pH-Wert kontrolliert. Hierfür steht eine Vielzahl von Messtechniken zur Verfügung. Am verbreitetsten sind elektrochemische Sensoren, aber auch Optoden sind erhältlich.

### 2.3.1 Elektrochemische Sensoren

Die in Bioprozessen am häufigsten verwendeten elektrochemischen Sensoren basieren auf potentiometrische Messmethoden (i.d.R. pH-Glaselektroden). Hierzu wird die Potentialänderung zwischen einer Arbeitselektrode und Referenzelektrode gemessen, die mit dem pH-Wert korreliert. Der Temperatureffekt wird dabei kompensiert [30]. Glaselektroden sind meist als Einstabmesskette gefertigt, wobei das sensitive Element aus einer Membran aus pH-sensitivem Silikatglas besteht. Zwischen den in der Probe befindlichen Protonen und den im Silikatglas gebundenen Alkaliionen bildet sich ein Gleichgewicht, welches eine Potentialänderung hervorruft. Dieses wird mit der Arbeitselektrode gemessen, die sich auf der gegenüberliegenden Seite der Glasmembran in einer Puffer-Lösung mit bekanntem pH-Wert

(z.B. KCL) befindet. Die Referenzelektrode (meist eine Ag/AgCl-Elektrode) befindet sich im Referenzelektrolyt und ist über ein Diaphragma mit der Messlösung verbunden, sodass die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden mit dem pH-Wert in Bezug gesetzt werden kann [39]. Abbildung 4 zeigt den Aufbau einer pH-Einstabmesskette schematisch.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Aufbaus einer pH-Einstabmesskette.

Neben klassischen Glas-Elektroden sind Einweg pH-Einstabmessketten aus Glas oder Kunststoff erhältlich, die z.B. in *Single-Use*-Bioreaktoren der ambr<sup>®</sup>-Serie (Sartorius AG, Göttingen) Verwendung finden [40, 41].

Weitere elektrochemische pH-Sensoren sind bislang vor allem in der Forschung verbreitet. Mittels ionenselektiver Feldeffektransistoren (ISFETs), bei denen die *Gatespannung* vom pH-Wert abhängig ist, kann ein Potentialbezug zum pH-Wert der Messlösung hergestellt werden. ISFETs sind gut miniaturisierbar und zeigen ein schnelles Ansprechverhalten, benötigen jedoch relativ große Referenzelektroden, deren Langzeitstabilität begrenzt ist [9, 30].

Für weitere Informationen zur Messung des pH-Werts in der Biotechnologie geben Henkel *et. al* [39] eine umfangreiche Übersicht über die hier erläuterten und weitere pH-Messtechniken (u.a. Leitfähigkeit, Redoxelektroden, Hydrogele, etc.).

### 2.3.2 Optoden

Der apparative Aufbau von pH-Optoden ist dem von pO<sub>2</sub>-Optoden sehr ähnlich (vgl. Abbildung 3B). Ein absorbierender oder fluoreszierender Indikatorfarbstoff ist in einem Trägerpolymer immobilisiert, welches direkt auf einem Lichtleiter oder in

Form eines *Patches* auf ein optisches Fenster aufgebracht wird [42]. Für Absorptionsmessungen werden beispielsweise Kresolrot, Phenolrot, Bromphenolblau oder Chlorophenolrot als Indikatorfarbstoffe verwendet [43, 44]. Für die bei pH-Optoden häufig verwendete Fluoreszenzmessungen eignen sich z.B. Fluoresceinamin, Fluorescein Derivate oder HTPS (8-Hydroxyl-1,3,6-Pyrentrisulfonsäure) [39].

pH-Optoden weisen mit  $pO_2$ -Optoden vergleichbare Vorteile wie Miniaturisierbarkeit, Störunanfälligkeit gegenüber elektromagnetischen Feldern, Druckunabhängigkeit und Modularisierung auf. Nachteilig ist, dass pH-Optoden stark von der Ionenstärke beeinflusst werden und einen geringen dynamischen Bereich von wenigen pH-Einheiten aufweisen. Außerdem verlieren sie ihre Sensitivität durch Sterilisations- und Reinigungsprozesse, da der Indikatorfarbstoff dadurch ausgewaschen wird. Die Farbstoffe unterliegen zudem einem *Bleaching*effekt, welcher durch ratiometrische Messungen ausgeglichen werden kann. Dazu muss der Farbstoff eine pH-abhängiges und ein pH-unabhängiges Intensitätsmaximum aufweisen, aus denen das Intensitätsverhältnis errechnet wird [25, 32, 39]. Für weitere Informationen über optische pH-Wertmessung in Bioprozessen geben Lam und Rao eine umfangreiche Übersicht [45].

#### **2.4 Bestimmung der metabolischen Aktivität in Bioprozessen**

Die *in situ* Bestimmung der Konzentration an viablen, metabolisch aktiven Zellen ist in der Bioprozessüberwachung von besonderem Interesse, denn nur diese bilden das gewünschte Produkt.

Einige der in Kapitel 2.1 präsentierten Biomassesensoren erlauben bereits Rückschlüsse auf die Bioaktivität. So können zum Beispiel mit der Trübungsmessung Informationen über Zellgröße und Morphologie erlangt werden, wenn sich das Sensorsignal schneller ändert als das tatsächliche Zellwachstum. Impedanzsensoren messen per se nur viable Zellen und können unter anderem zur Messung der Lipideinlagerung in Hefen genutzt werden. Auch ISM Messungen liefern direkt Informationen über Zellgröße und Morphologie.[9]

Für die spezifische Analyse der metabolischen Aktivität eignen sich darüber hinaus *in situ* Techniken, die in Tabelle 1 zusammen mit den genannten Biomassesensoren aufgeführt sind und in der Folge präsentiert werden.

**Tabelle 1:** *In situ* Messtechniken und Zielgrößen zur Biomassebeschreibung, nach[9]

Methode	Zielgröße			Literatur Beispiele
	Konzentration	Morphologie	Aktivität	
ISM	X	X	X	[17, 19, 21–23, 46, 47]
Trübung	X	X		[7]
Impedanz	X			[10, 14, 15]
Kalorimetrie	X		X	[48–50]
Spektroskopie	X		X	[32, 51–61]
NMR-Spektr.			X	[62, 63]
OUR/qOUR	X		X	[64–73]

#### 2.4.1 Kalorimetrie

Zu den Verfahren, mit denen die metabolische Aktivität der kultivierten Zellen nicht invasiv – also ohne Probenahme - bestimmt werden kann, gehört die Kalorimetrie. Sie basiert auf der Messung der Wärme, die von der biologischen Aktivität, der Biomassekonzentration und dem Stoffwechselumsatz der Organismen abhängig ist. Die Schwierigkeit bei diesen Messungen ist, dass die Gesamtwärmeproduktion erfasst wird. Die wärmeproduzierenden zellbasierten Prozesse müssen aus der Gesamtwärmeentwicklung hergeleitet werden [4]. Spezielle apparative Aufbauten sind nötig und eine Anpassung an verschiedene Prozesstypen und -verfahren ist nur begrenzt möglich. Es konnte zum Beispiel eine Schätzung der Biomasse und der spezifischen Wachstumsrate von *crabtree*-negativen Hefezellen durchgeführt werden, in dem der metabolische Wärmefluss mit einem hochauflösenden Biokalorimeter gemessen wurde [48]. Für Organismen mit komplexerem Metabolismus sind allerdings aufwändige Modelle nötig und eine direkte Korrelation ist meistens nicht

möglich. Pionierarbeiten auf diesem Gebiet wurden von Stockar und Marison geleistet [49, 50, 74–76].

#### 2.4.2 Spektroskopie

Andere Möglichkeiten zur nicht-invasiven Messung metabolischer Aktivitäten bieten die *in situ* Spektroskopie-Verfahren. Sie umfassen eine Vielzahl von Methoden wie Fluorometrie, UV/VIS-, IR- oder Raman- Spektroskopie. IR-Sonden erlauben die Detektion von extrazellulären Komponenten wie Glukose, Laktat oder Acetat und die Biomasse als wichtige biologische Größe [51–54]. 2D-Fluoreszenzsensoren ermöglichen dagegen die simultane Detektion einer Vielzahl biogener Fluorophore wie der Konzentration von Aminosäuren/Proteinen, Vitaminen und Coenzymen innerhalb und außerhalb der Zellen und lassen damit Rückschlüsse auf die biologische Aktivität zu [32, 55, 56]. Neben dem Monitoring von Zellwachstum und Stressreaktion von Hefen [57] konnte beispielsweise die Stabilität eines plasmidhaltigen *E. coli* Stammes untersucht [58] oder die *online* Überwachung von Lebendzellzahl sowie (rekombinante) Proteinproduktion in Säugerzellkulturen durchgeführt werden [59, 60]. Auch das NAD(P)H-abhängige Fluoreszenzsignal kann genutzt werden, um metabolische Veränderungen zu detektieren und es gibt Informationen über den Redoxstatus der Kultur [61]. Die (Fluoreszenz-)Spektren der Fermentationsbrühen zeigen oft komplexe Wechselwirkungen und Überlagerungen, sodass eine genaue Bestimmung der Prozessgrößen nur mit multivariaten Auswerteverfahren und chemometrischen Modellen in genau definierten Experimentalräumen möglich ist. [32, 77]

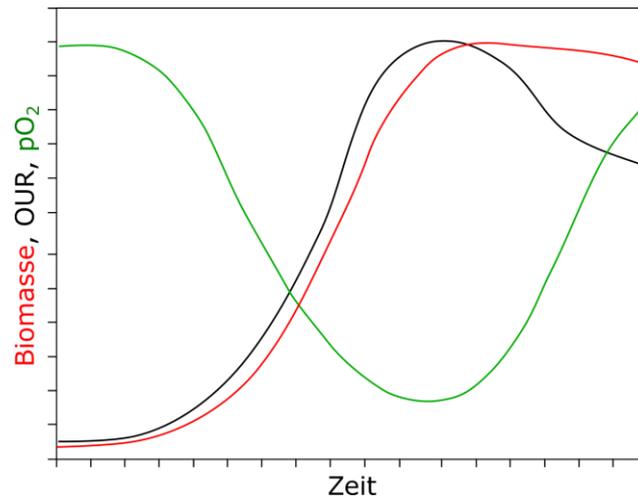
#### 2.4.3 NMR Spektroskopie

Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie ist eine direkte, nicht invasive Technik, um Informationen über den Zellmetabolismus zu erlangen [78, 79]. Brecker *et al.* [62] nutzte H-NMR zur Bestimmung eines metabolischen Wechsels vom Citrat- zum Glukosemetabolismus von *E. coli*. Auch eine Methode zur Überwachung von tierischen Zellkulturen wurde von Bradley *et al.* vorgestellt [63]. Die Nachteile dieser Technologie sind hohe Anschaffungskosten und vor allem die tech-

nische Umsetzung am Bioprozess. Es sind nur Messungen in sehr kleinen Durchflusszellen in Magnetfeldern möglich (keine Stahleinbauten, etc.), die Messzelle ist meist mit einem Kultivierungsreaktor verbunden, aus dem die Zellsuspension durch die Messzelle gepumpt wird. Die Messbedingungen in der NMR-Kammer spiegeln somit nicht unbedingt die Bedingungen im Kultivierungsreaktor wider. Trotz hoher Biomassekonzentration sind die Messzeiten mit über 10 Minuten pro Messpunkt sehr hoch. [80, 81]

### 2.4.4 Bestimmung der Sauerstoffaufnahme

Die Sauerstoffaufnahme bzw. die spezifische Sauerstoffaufnahme ist ein robuster Indikator zur Bestimmung zellulärer Aktivität, denn eine Vielzahl von mikrobiellen Prozessen, die meisten Pilz- und Pflanzenkulturen und alle Säugerzellkulturen sind aerobe Prozesse. Als eine der fundamentalen physiologischen Charakteristiken des Kulturwachstums kann sie zur Optimierung von Bioprozessen verwendet werden [66, 82, 83]. Auf Basis der OUR wurde eine *online* Vorhersage der Viabilität und der Wachstumsphase von Insekten und tierischen Zellkulturen ermöglicht [68, 82]. Zudem konnte die Zufütterung von Säugerzellkulturen mit Aminosäuren auf Basis der Sauerstoffaufnahme durchgeführt werden [84] oder sie diene als Faktor zur Bestimmung des hydrodynamischen Stresses, der Zellschädigung und des Zelltods [69], [64]. Auch die Charakterisierung und Aktivität der organischen Zusammensetzung in der Abwasserverarbeitung wurden mittels OUR-Messungen bestimmt [65, 85–88]. Abbildung 5 zeigt den typischen Verlauf der OUR,  $q_{OUR}$  und des  $pO_2$  im unregulierten Bioprozess. Während die Zellen wachsen steigt die Sauerstoffverbrauchsrate exponentiell an. Aufgrund des gestiegenen  $O_2$ -Bedarfs sinkt der  $pO_2$  in diesem Zeitraum ab. Sobald die Organismen das Wachstum reduzieren, steigt auch die OUR nicht weiter an. Anschließend ist in der Regel ein Absinken der OUR sowie ein Anstieg des  $pO_2$  zu verzeichnen, da die Zellen aufgrund von Nährstoffmangel absterben und weniger Sauerstoff verbrauchen.

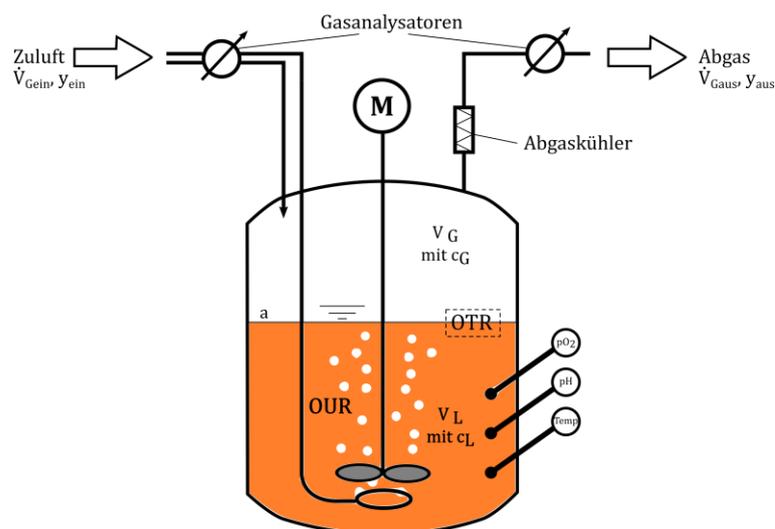


**Abbildung 5:** Typischer Verlauf der OUR,  $pO_2$  und Biomasse im Bioprozess.

Verschiedene Methoden zur Bestimmung der OUR, basierend auf der Sauerstoffbilanz über den gesamten Reaktor oder in der flüssigen Phase, sowie mit variablem Gelöst-Sauerstoffpartialdruck, sind bekannt. Die gängigsten Methoden sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

#### 2.4.4.1 Gasmassenbilanzierung

Bei der Gasmassenbilanzierung wird der Sauerstoffpartialdruck in den Zu- und Abluftströmen des Reaktors bestimmt und aus der Differenz der Verbrauch errechnet. Abbildung 6 zeigt schematisch einen typisch instrumentierten Bioreaktor inklusive Begasung.



**Abbildung 6:** Schematischer Überblick über einen typisch instrumentierten Bioreaktor und dessen Begasung.

Der Gasstrom  $\dot{V}_{G_{ein}}$  [mol·h<sup>-1</sup>] mit dem Stoffmengenanteil an Sauerstoff  $y_{ein}$  [%] strömt über den Kopfraum und/oder einer Submersbegasung (*Sparger*) in den Reaktor. Im Kopfraumvolumen  $V_G$  [L] beträgt die Sauerstoffkonzentration  $c_G$  [mol·L<sup>-1</sup>]. Der Sauerstoff löst sich in der flüssigen Phase  $V_L$  [L] mit einer Konzentration  $c_L$  [mol·L<sup>-1</sup>] über die Austauschfläche  $a$  [m<sup>2</sup>], welche der Flüssigkeitsoberfläche und/oder der Oberfläche der Gasblasen entspricht (*oxygen transfer rate, OTR*). In der flüssigen Phase verbrauchen ausschließlich die Zellen den Sauerstoff. Der Gasstrom verlässt schließlich den Reaktor mit dem Volumenstrom  $\dot{V}_{G_{aus}}$  [mol·h<sup>-1</sup>] und dem O<sub>2</sub> Stoffmengenanteil  $y_{aus}$  [%] [89]. Die OUR lässt sich daher mittels einer globalen Massenbilanzierung über die Flüssig- und Gasphase gemäß Gleichung ( 1 ) ermitteln:

$$\frac{dc_L}{dt} \cdot V_L + \frac{dc_G}{dt} \cdot V_G = \dot{V}_{G_{ein}} \cdot y_{ein} - \dot{V}_{G_{aus}} \cdot y_{aus} - OUR \cdot V_L \quad (1)$$

Wenn die O<sub>2</sub>-Konzentrationen im Reaktor konstant sind ( $\frac{dc_L}{dt} = 0$  und  $\frac{dc_G}{dt} = 0$ ), kann die Gleichung wie folgt vereinfacht werden.

$$OUR = \frac{\dot{V}_{G_{ein}} \cdot y_{ein} - \dot{V}_{G_{aus}} \cdot y_{aus}}{V_L} \quad (2)$$

Mit den Kenntnissen des Gasfluxes und der Zusammensetzung in den Zu- und Abgängen kann somit die OUR errechnet werden.[64, 89]

Dies ist eine verlässliche und exakte Methode, benötigt aber teure, sehr genaue Messinstrumente. Üblicherweise kommen hierbei Massenspektrometer oder Gasanalysatoren zum Einsatz, die zudem auf eine vorherige Trocknung des Gases angewiesen sind. Die Abgasanalysatoren *BlueInOne Cell* bzw. *BlueInOne Ferm* der BlueSens gas sensor GmbH, sind Beispiele für kommerziell erhältliche Systeme zur Abgasanalyse.

Insbesondere bei kleinen Reaktorsystemen oder tierischen Zellkulturen ist die Anwendung dieser Methode schwierig, da die Konzentrationsunterschiede zwi-

schen Zu- und Abluft sehr gering sind [64]. Variable Zuluftmenge, große Kopfraumvolumina oder Perfusionsprozesse, bei denen Sauerstoff mit dem Medium ausgeschleust wird, bereiten zusätzliche Schwierigkeiten [90].

#### 2.4.4.2 Flüssigphasenbilanz

Die Sauerstoffaufnahme rate ist auch durch ausschließliche Bilanzierung der flüssigen Phase ermittelbar. Dies hat den Vorteil, dass einfachere und weniger genaue Messgeräte verwendet werden können. Die Sauerstoffbilanz der Flüssigphase im Reaktor ergibt sich aus Gleichung ( 3 ).

$$\frac{dc_L}{dt} = OTR - OUR \quad (3)$$

mit

$$OTR = k_L a \left( \frac{p_{tot} \cdot y_G}{H} - c_L \right) \quad (4)$$

Wobei  $p_{tot}$  den Umgebungsdruck in bar beschreibt und  $H$  den Henry-Koeffizienten in  $\text{bar} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Der  $k_L a$  fasst den Stofftransportkoeffizienten  $k_L$  (Proportionalitätsfaktor) und die Stoffaustauschfläche  $a$  zu einem volumenbezogenen Sauerstoffübergangskoeffizienten zusammen. Je Größer dieser Koeffizient ist, desto höher ist der Sauerstofftransport von der Gasphase in das Medium. Wenn die Gelöst-Sauerstoffkonzentration im Reaktor konstant (stationär) gehalten wird ( $\frac{dc_L}{dt} = 0$ ), kann die OUR aus der OTR entsprechend Gleichung ( 5 ) bestimmt werden.

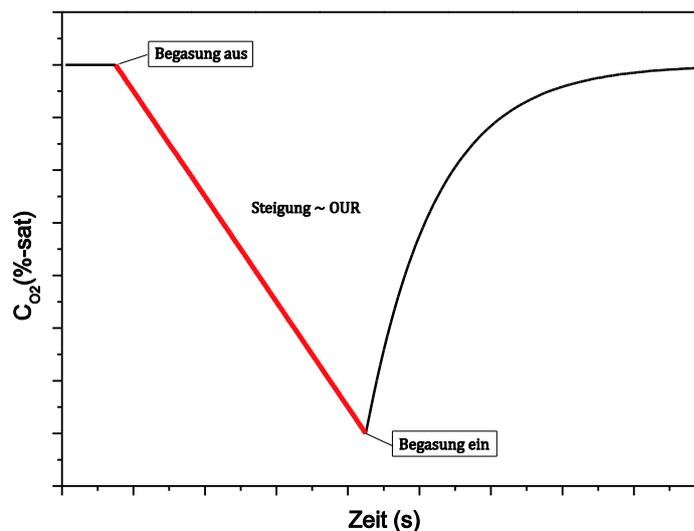
$$OTR = k_L a (c_L^* - c_L) = OUR \quad (5)$$

Dabei steht  $c_L^*$  für die  $\text{O}_2$ -Sättigungskonzentration in  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Nachteil bei dieser Methode ist, dass der  $k_L a$  und  $c_L^*$  über den gesamten Bioprozess bekannt sein müssen. Besonders in Prozessen, die über *Sparger* begast werden, kann der  $k_L a$  stark variieren, da sich die Gasblasengröße im Prozessverlauf aufgrund von physikalischen Veränderungen des Mediums wie Dichte, Viskosität oder Oberflächenspannung ändert.

Deshalb eignet sich die Methode am besten für oberflächenbegaste Prozesse, bei denen der  $pO_2$  durch Regelung der Gaszusammensetzung im Prozess konstant gehalten wird. Die jeweilige  $O_2$ -Sättigungskonzentration  $c_L^*$  lässt sich aus dem Stoffmengenanteil  $y_G$  in der Gasphase mittels Massendurchflussregler bestimmen, wenn der Henry-Koeffizient bekannt ist. [64, 89]

#### 2.4.4.3 Dynamische Methode

Die dynamische Methode ist eine der einfachsten zur direkten Bestimmung der OUR. Sie basiert auf der respiratorischen Aktivität der Organismen in der Kultur und ist unabhängig von der Begasungsstrategie [64]. Hierfür wird die Sauerstoffzufuhr unterbrochen und der Abfall des Gelöst-Sauerstoffpartialdrucks in der Kulturbrühe (flüssige Phase) beobachtet. Abbildung 7 zeigt einen typischen  $pO_2$ -Verlauf während der dynamischen OUR-Messung.



**Abbildung 7:** Verlauf des Gelöst-Sauerstoffpartialdrucks während einer dynamischen Messung der OUR im Bioprozess.[64]

Die Steigung der Kurve ist proportional zu dem Sauerstoffverbrauch der Organismen. In diesem Fall vereinfacht sich Gleichung ( 3 ) zu,

$$\frac{dc_L}{dt} = -OUR \quad (6)$$

da  $OTR = 0$ . Eine solche Messung der Sauerstoffaufnahme in einem Produktionsbioreaktor verursacht allerdings unerwünschte Störungen des Systems, welche sich negativ auf die Produktbildung oder das Wachstum der Zellen auswirken können [89, 90].

Die OUR kann daher auch dynamisch *inline* bestimmt werden. Dazu wird eine Sauerstoffelektrode am Ende eines Bypasses vom Bioreaktor installiert, durch den die zellhaltige Kulturbrühe gefördert wird. Die Sauerstoffaufnahme wird aus dem  $pO_2$ -Unterschied zwischen Bioreaktor- und Bypasselektrode sowie der Aufenthaltszeit der Zellen im Bypass berechnet. Der Nachteil dieser Methode ist, neben dem instrumentellen Aufbau, dass die Elektroden sehr exakt auf einander abgestimmt sein müssen [91].

Die dynamische Methode wird zudem zur *offline* Bestimmung der OUR genutzt. Hierbei wird bei einer Probe aus dem Bioreaktor der Sauerstoffabfall in einem vollständig gefüllten Gefäß überwacht, welches über eine Temperatur- und Rührersteuerung verfügt [92, 93]. Das *FOL oxygen monitoring system* der Instech Laboratories, Inc., USA ist ein Beispiel für ein kommerziell erhältliches System zur *offline* Messung der Sauerstoffaufnahme [94, 95].

#### 2.4.4.4 Spezifische Sauerstoffaufnahme

Die spezifische Sauerstoffaufnahme ( $qOUR$ ) beschreibt den  $O_2$ -Verbrauch pro Zeiteinheit und Zelle bzw. Biomasse. Sie ist charakteristisch für jeden Mikroorganismus und liefert wichtige Informationen über den Zellmetabolismus und die Zellphysiologie, auf deren Basis beispielsweise *Feed*-Strategien oder Prozessteuerung entwickelt werden können [96].

Für die Ermittlung der spezifischen Sauerstoffaufnahme aus der OUR ist deshalb die Kenntnis der aktuell vorhandenen Biomasse bzw. Zellkonzentration  $c_X$  nötig. Die Berechnung der  $qOUR$  wird durch Gleichung ( 7 ) beschrieben. [64]

$$-qOUR = \frac{OUR}{c_X} \quad (7)$$

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bis heute kein robustes und einfaches Verfahren zur direkten, automatisierten *online* Bestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme von Zellpopulationen und Mikroorganismen auf Basis der dynamischen Methode verfügbar ist. Zwar existieren *in situ* Sensorkonzepte, die die OUR auf dem Prinzip einer verschließbaren Messkammer ermitteln. Jedoch erlauben diese nicht die simultane Bestimmung der Biomasse, weshalb für eine qOUR Messung dabei weiterhin zusätzliche Sensoren oder eine *offline* Probenahme nötig ist [71, 97].

Die Entwicklung eines Messsystems zur *online* qOUR-Bestimmung, das in verschiedenen Reaktortypen und bei unterschiedlichen Begasungsstrategien angewendet werden kann, ist somit für ein besseres Prozessverständnis und zur Kontrolle von Kultivierungsprozessen unabdingbar.

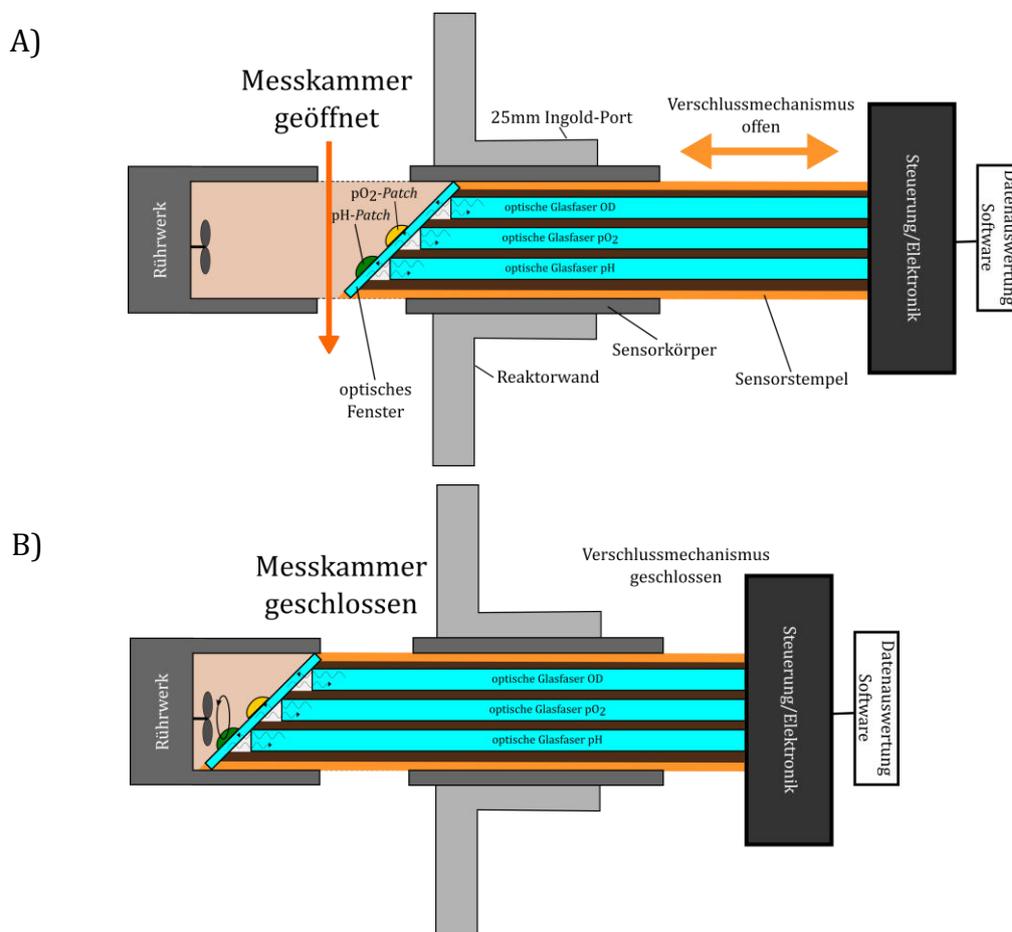
### 3. Konzept und Design des ISICOM

Mit dem nicht-invasiven *in situ* Kombi-Sensor (ISICOM) zur Bioprozessüberwachung sollen der  $pO_2$ -Wert und die Biomassekonzentration simultan bestimmt werden, optional sollen über einen sogenannten Multisensorport weitere Messungen, wie z.B. des pH-Werts möglich sein. Die Messung der Prozessvariablen erfolgt sowohl *inline* im Bioprozess als auch in einem kurzzeitig gasdicht abgeschlossenen Volumenelement, wodurch die spezifische Sauerstoffaufnahme über die dynamische Methode *online* zugänglich wird. Der metabolische Zustand der Zellen im Bioprozess ließe sich so über den gesamten Prozessverlauf in regelmäßigen Abständen ohne Probenahme ermitteln.

Der Sensor ist so konzipiert, dass ein definiertes Volumenelement gasdicht abgeschlossen und so von der Sauerstoffbegasung getrennt wird. In diesem Volumenelement erfolgt die Bestimmung der Biomassekonzentration (Trübungsmessung) und des Sauerstoffgehalts über einen definierbaren Zeitraum. In der abgeschlossenen Kammer ist dadurch der  $qOUR$ -Wert aus der Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks in Bezug auf die Biomassekonzentration zugänglich. Wenn im Multisensorport zusätzlich eine pH-Sonde integriert ist, könnten im geschlossenen Zustand auch pH-Wert-Änderungen durch Übergänge der Stoffwechselforgänge erfasst werden (Acetatbildung, Lactatbildung etc.).

Nach einem möglichst kurzen, aber für die Messung ausreichenden Zeitraum, wird die Kammer geöffnet und die separierte Zellsuspension wieder mit dem Gesamtreaktorvolumen vermischt, bevor eine Schädigung der Zellen auftritt. Bei offener Kammer können die Sensoren den  $pO_2$ -Wert, die Trübung und ggf. den pH-Wert kontinuierlich messen und mit den Standardsensoren im Reaktor abgeglichen werden. Damit ist prinzipiell eine ständige Rekalibrierung der Sensoren im ISICOM Sensor möglich, was vor allem bei Langzeitprozessen relevant sein kann.

Für die Bestimmung der Biomasse wird eine faseroptische Trübungssonde eingesetzt. Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert werden über die in Kapitel 2.2.2 und 2.3.2 beschriebenen Optoden gemessen. Alle drei optischen Sensoren sind im Sensorkopf integriert und können gleichzeitig betrieben werden. Abbildung 8 gibt einen schematischen Überblick über die Funktionsweise des Sensors.



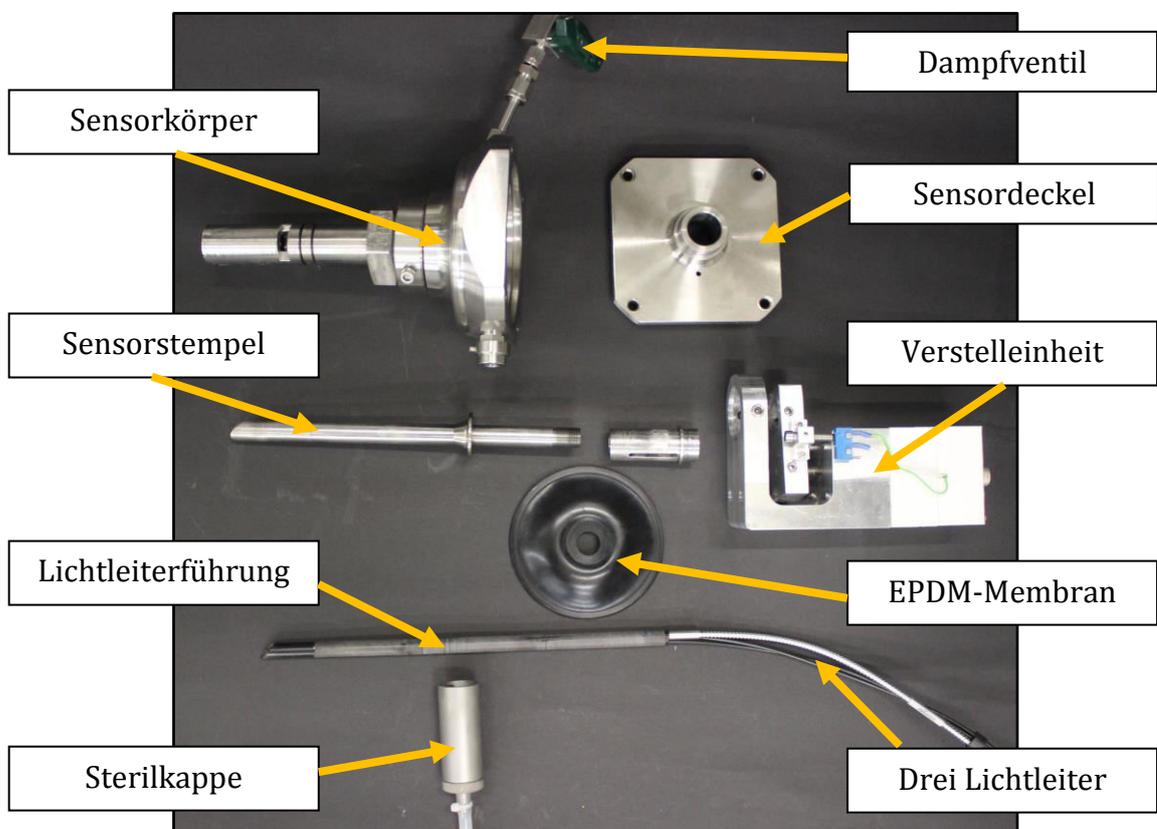
**Abbildung 8:** Schematisierte Darstellung der Funktionsweise des ISICOM Sensors. (A) zeigt das Durchströmen der Kultursuspension bei geöffneter Probenkammer mit gleichzeitiger Sauerstoff-, pH- und Biomassemessung. (B) zeigt die durchmischte Messkammer des Sensorkopfes bei geschlossener Probenkammer während der qOUR Messung.

Bei geöffneter Kammer durchströmt die Zellsuspension die Messkammer. Ist die Kammer geschlossen sorgt der integrierte Rührmechanismus für eine ausreichende, aber schädigungsfreie Durchmischung, um eine Sedimentation oder einen Sauerstoffgradienten zu verhindern. Das Schließen der Kammer erfolgt durch das Verschieben des Sensorstempels mit der Sensorik in das Innere der Messkammer.

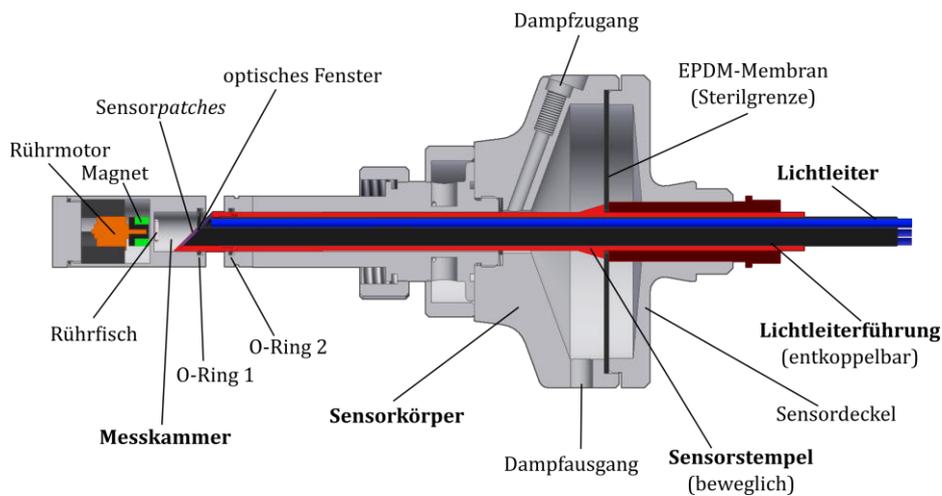
Durch automatisches Zurückziehen des Sensorstempels wird der Messspalt im Sensorkopf wieder freigegeben und durch die Konvektion im Reaktor erneut von der Zellsuspension durchströmt.

### 3.1 Technische Umsetzung des Konzepts

Der ISICOM Sensor ist für den Einsatz im 25 mm Ingold-Port entworfen und besteht aus drei Hauptbauteilen: Dem Sensorkörper mit Messkammer, dem beweglichen Sensorstempel und den drei optischen Sensoren mit den Lichtleitern. In Abbildung 9 sind die einzelnen Komponenten des demontierten Sensors dargestellt. Abbildung 10 zeigt einen Halbschnitt des zusammengebauten Sensors.



**Abbildung 9:** Bauteile des demontierter ISICOM Sensors.



**Abbildung 10:** Halbschnitt durch den ISICOM Sensor ohne Verstellereinheit des Verschlussmechanismus, Dampfventil und Verschlusskappe. Die Sterilkappe am Dampfaustritt ist nicht gezeigt.

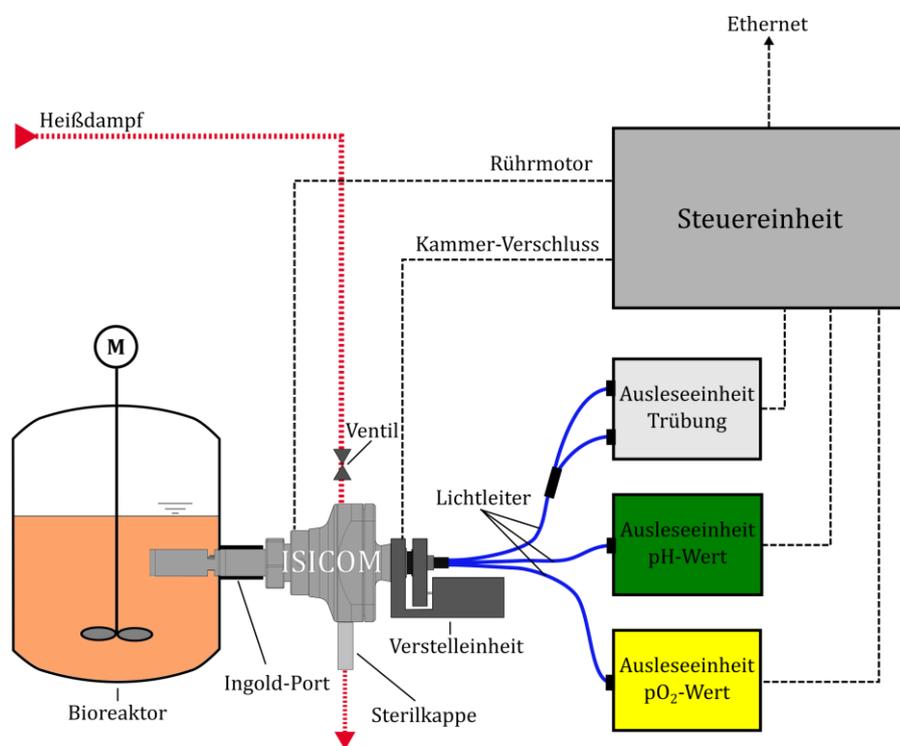
Zur Integration des Rührmechanismus wird ein Magnetrührsystem genutzt, weshalb am Kopf des Sensorkörpers ein Rührmotor in einem dicht verschlossenen Raum fixiert ist. Der Rührfisch befindet sich in der Messkammer des ISICOM, die durch den beweglichen Sensorstempel mittels der Verstellereinheit geöffnet und geschlossen wird.

Dieser Verschlussmechanismus basiert folglich auf einem beweglichen Bauteil, das regelmäßig mit dem Reaktorinhalt in Kontakt kommt und zum Teil wieder in den Sensorkörper zurückgezogen wird. Damit dieser Prozess steril ablaufen kann, darf die Sterilgrenze nicht am O-Ring 2 (vgl. Abbildung 10) liegen, sondern muss innerhalb des Sensorkörpers platziert werden. Dazu dient eine EPDM (Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk) Flachmembran, die zwischen Sensorkörper und Sensordeckel sowie dem Sensorstempel fixiert ist. Ähnlich der Funktionsweise eines kommerziell erhältlichen Probenahmeventils, bewegt sich diese Membran zusammen mit dem Stempel und gewährleistet, dass das Sensorinnere reaktorseitig stets vom Deckel und der Verstellereinheit separiert wird. Der Durchmesser der Membran beträgt 10 cm, damit die Bewegung des Stempels vollständig aufgenommen werden kann.

Über den Dampfzu- und abgang des Sensorkörpers kann das Sensorinnere einmalig vor Prozessbeginn für 30 Minuten sterilisiert werden. Der Heißdampfeingang

kann über ein Ventil geöffnet werden und mündet in einem Winkel auf dem Sensorstempel. So wird dem Dampf bereits eine Flussrichtung vorgeben, die gewährleistet, dass der Sensorstempel vollständig umströmt ist. Am Dampfausgang befindet sich eine handelsübliche Sterilkappe (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen), gefüllt mit Glasseide, welche die Bildung von Unterdruck beim Abkühlen verhindert.

Am schrägen, reaktorseitigen Ende des Sensorstempels ist das optische Fenster integriert, auf dem die *Sensorpatches* für  $pO_2$ - und pH-Messung befestigt sind. Innerhalb des Stempels sind die drei Lichtleiter der optischen Sensoren mit Hilfe einer Führung positioniert, die aus dem Sensor entfernt werden kann. Abbildung 11 zeigt den vollständigen Aufbau des Sensors schematisch.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung des gesamten ISICOM Aufbaus. Die gestrichelten Linien versinnbildlichen Kabelverbindungen zur Kommunikation und Steuerung der Einheiten. Die rote, gestrichelte Linie stellt eine Heißdampfleitung dar und die blauen, durchgezogenen Linien symbolisieren die Lichtleiter der optischen Sensoren.

Die Lichtleiter werden aus dem Sensor zu den Ausleseeinheiten der optischen Sensoren geführt, die mit der ISICOM-Steureinheit verbunden sind. Die Steureinheit

kontrolliert zudem den Rührmotor und die Verstelleinheit des Verschlussmechanismus. Zur Kommunikation mit der externen Peripherie dient eine Ethernet-Schnittstelle. Ein Video veranschaulicht die Funktionsweise des Sensors, welches über den QR-Code in Abbildung 12 abgerufen werden kann.

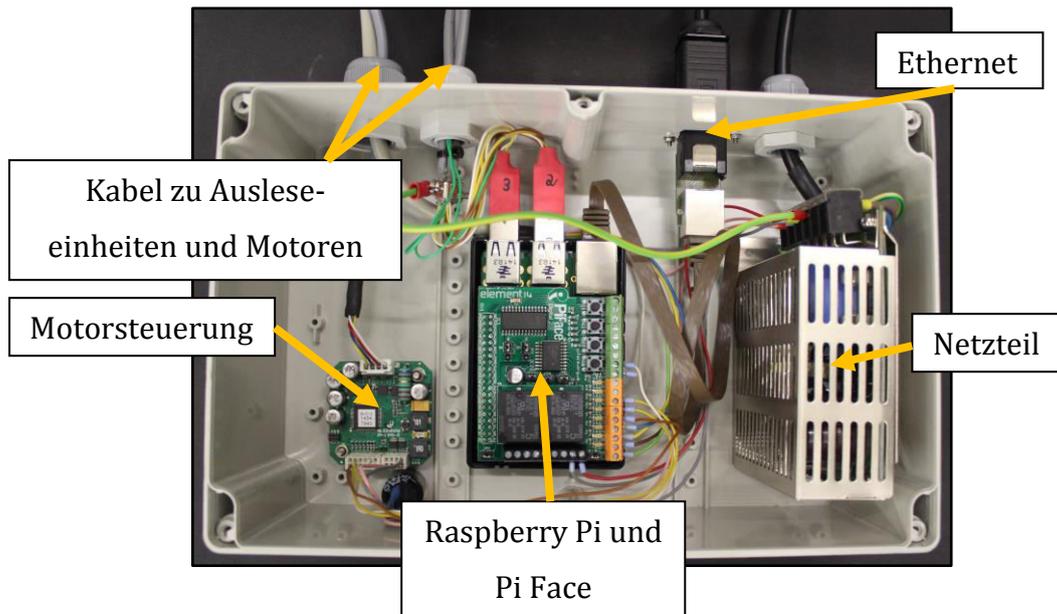


Abbildung 12: QR-Code zum Video, das die Vorbereitung und Anwendung des ISICOM zeigt, Link: <https://youtu.be/G2flbDkOyFE>

### 3.2 Sensorsteuereinheit

Die Sensorsteuereinheit dient zur Kontrolle des Öffnens und Schließens der Messkammer sowie zur Steuerung des Rührmechanismus. Auch die Datenaufzeichnung, Datenauswertung und -weitergabe wird durch diese Einheit gewährleistet. Sie besteht aus einem Gehäuse, in dem ein Raspberry Pi (Model B+, *Raspberry Pi Foundation*, UK) mit Pi Face Erweiterungskarte (*OpenLX SP Ltd*, UK), die Motorsteuerung des Rührmotors sowie eine Spannungsversorgung eingebaut sind.

Der kompakte Einplatinencomputer Raspberry Pi bietet viele Schnittstellen, wie z.B. USB oder Ethernet zur Kommunikation mit anderen Geräten. Das Linux Betriebssystem (Rasbian, *Raspberry Pi Foundation*, UK) ist ideal zur Anbindung aller benötigten Komponenten des ISICOMs, da auf umfangreiche Funktionserweiterungen zur Implementierung von Protokollen zurückgegriffen werden kann. Abbildung 13 zeigt das System mit geöffnetem Gehäuse.



**Abbildung 13:** Steuereinheit des ISICOM Sensors im geöffneten Zustand.

Alle Prozessabläufe sind in Python programmiert, da diese Programmiersprache eine betriebssystemunabhängige Entwicklungsumgebung und vielseitige Funktions- und Protokollbibliotheken bietet. Zur Datenauswertung wird die Open Source Softwareumgebung SciPy (<http://www.scipy.org>) genutzt, die umfangreiche Python-Bibliotheken mit mathematischen Werkzeugen beinhaltet.

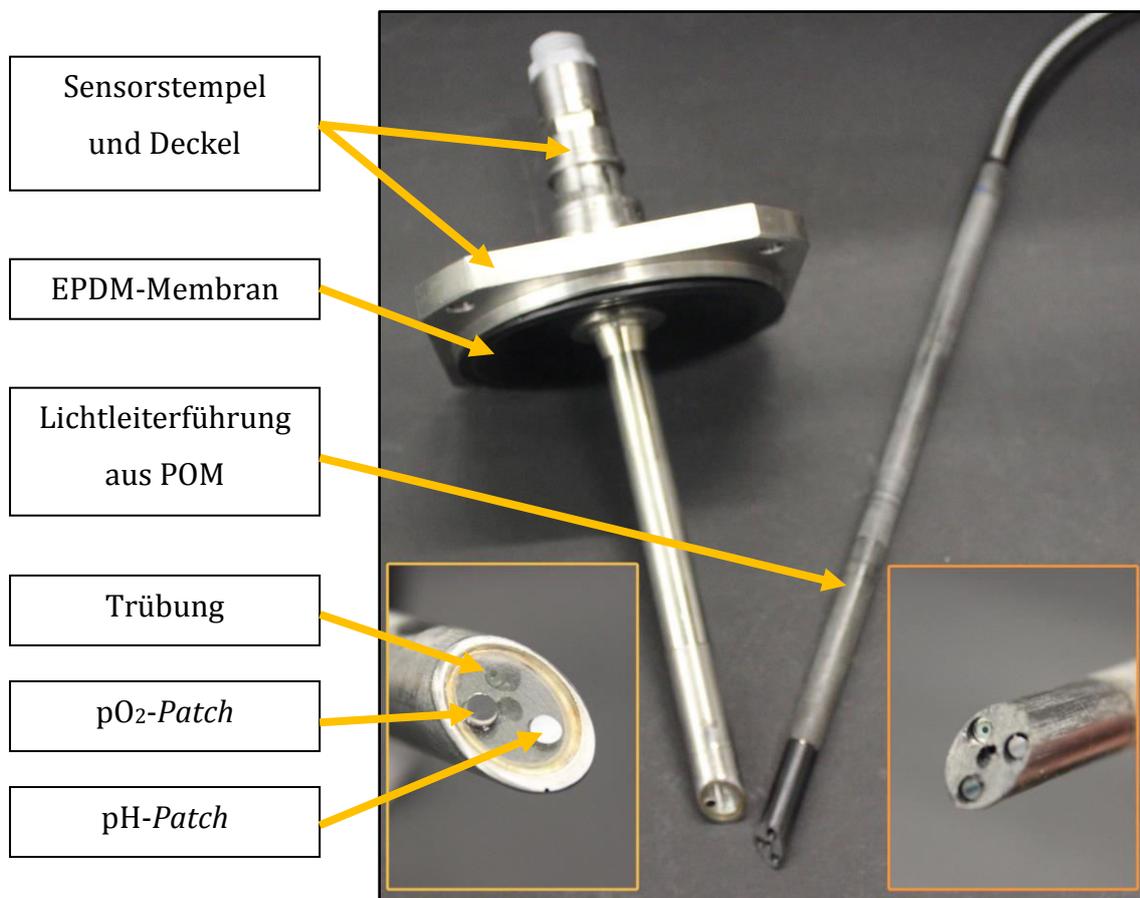
Über Kabelverbindungen sind die Auslese-einheiten der drei optischen Sensoren und die Schrittmotoren von Rühr- und Verschlussmotor flexibel angeschlossen. Die Kommunikation mit den Auslese-einheiten erfolgt über eine serielle Schnittstelle (via USB-Seriell-Wandler) und eines am Institut für Technische Chemie (Universität Hannover) entwickelten MODBUS-Treibers. Schließlich ermöglicht ein Ethernetanschluss die Verbindung mit externen Geräten sowie die Integration in Prozessleitsysteme.

### 3.3 Sensorintegration

Für die Erfassung des  $pO_2$ -Wertes, des pH-Wertes und der Trübung kommen optische Sensoren zum Einsatz. Die Sensoren werden als pH- und  $pO_2$ -Optoden (Fluoreszenzprinzip) der Firma Presens GmbH, Regensburg (pH-4 Mini und OXY4-Mini) verwendet. Die Biomasse bzw. optische Dichte ( $OD_{600}$ ) wird über einen faseroptischen LED-Streulichtsensor via Reflexionsmessungen bestimmt.

Optische Sensoren bieten den Vorteil, dass die Lichtleiter und Elektronik vom eigentlichen Sensorelement entkoppelt werden können. Daher entsteht die Möglichkeit kostengünstigere Bauteile zu verwenden, die nicht hitzebeständig und während des Sterilisationsprozesses aus dem ISICOM entfernbar sind.

Die Integration wird im ISICOM mit Hilfe eines optischen Fensters am reaktorseitigen Ende des Sensorstempels umgesetzt. Die Lichtleiter der drei Sensoren werden mit Hilfe einer schwarzen Kunststoffführung aus Polyoxymethylen (POM) im Sensorstempel positioniert, sobald die Sterilisation abgeschlossen ist (Abbildung 14).

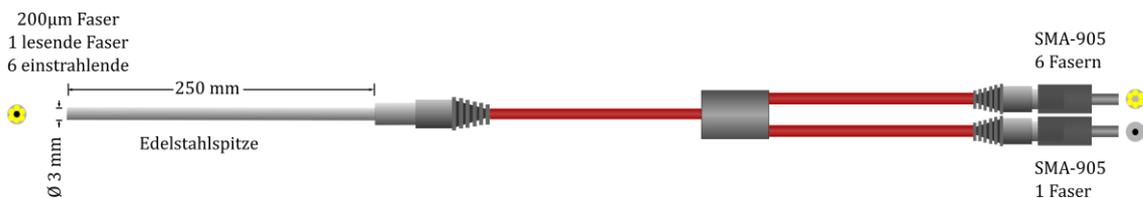


**Abbildung 14:** Sensorstempel mit optischem Fenster und Lichtleiterführung aus POM. Die Enden der beiden Bauteile sind noch einmal vergrößert abgebildet.

Auf der medienberührenden Seite des Fensters befinden sich die *Sensorpatches* der pO<sub>2</sub>- und pH-Optode (SP-PSt3-YAU-D3-YOP und SP-HP5-D3-US, *Presens GmbH*, Regensburg), welche mit Silikonkleber (SG1 Silicone Glue, *Presens GmbH*, Regensburg) befestigt werden. Aufbau und Funktion der Optoden wurde bereits in Kapitel 2.2.2

und 2.3.2 erläutert. Aufgrund des abgeschrägten Endes der Führung und des Stempels ist eine korrekte Orientierung der Lichtleiter zu den *Patches* stets gewährleistet.

Die Trübungssonde basiert auf einer Freistrahloptik. Der Lichtleiter ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt. Sechs 200  $\mu\text{m}$ -Glasfasern dienen zur Einstrahlung des Lichts und eine Faser dient zur Detektion (FCR-71R200-2-ME-3X250, *Avantes, Inc.*, Niederlande).



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung des Lichtleiters der entwickelten Trübungssonde.

Als Lichtquelle dient eine LED (SFH480-2 TO18, *OSRAM Opto Semiconductors*, Regensburg) mit einer Wellenlänge im nahen Infrarot von 890 nm, da handelsübliche Kulturmedien bei dieser Wellenlänge kaum Absorption zeigen [5]. Die Detektion erfolgt mittels einer Photodiode mit integriertem Verstärker (SD 112-45-11-221, *Advanced Photonix, Inc.*, USA). Beide sind an die Elektronik zur Ansteuerung und Signalauswertung gekoppelt (Schaltplan im Anhang 9.3). Die Verbindung des Lichtleiters zur LED und zum Detektor erfolgt über SMA-905 Konnektoren. Die Lichtemission ist moduliert und wird mit Hilfe eines Lock-in-Verstärkers elektronisch gefiltert, sodass störendes Umgebungslicht bei der Messung effektiv eliminiert wird.

Die optimale LED-Intensität und -Orientierung des Lichtleiters zum optischen Fenster wurden im Rahmen der Bachelorarbeit „Technische Charakterisierung eines neu entwickelten Sensors zur Bestimmung zellulärer Aktivität“ von E. Kesdiren (2015, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) ermittelt [98]. Dabei zeigte sich, dass eine im  $45^\circ$ -Winkel zur Lichtleiterachse orientierte 1 mm dicke Quarzglasscheibe (*Aachener Quarz-Glas Technologie Heinrich*, Aachen) für eine störungsarme Einstrahlung und Detektion am besten geeignet ist. Bei einer Orientierung im  $180^\circ$  Winkel zur Einstrahlrichtung wird dagegen ein Großteil des Lichts direkt an der Glasscheibe zurück zum Detektor reflektiert. Spezielle optische Klebstoffe oder Kontaktmittel können diesen Effekt zwar verhindern, erschweren jedoch

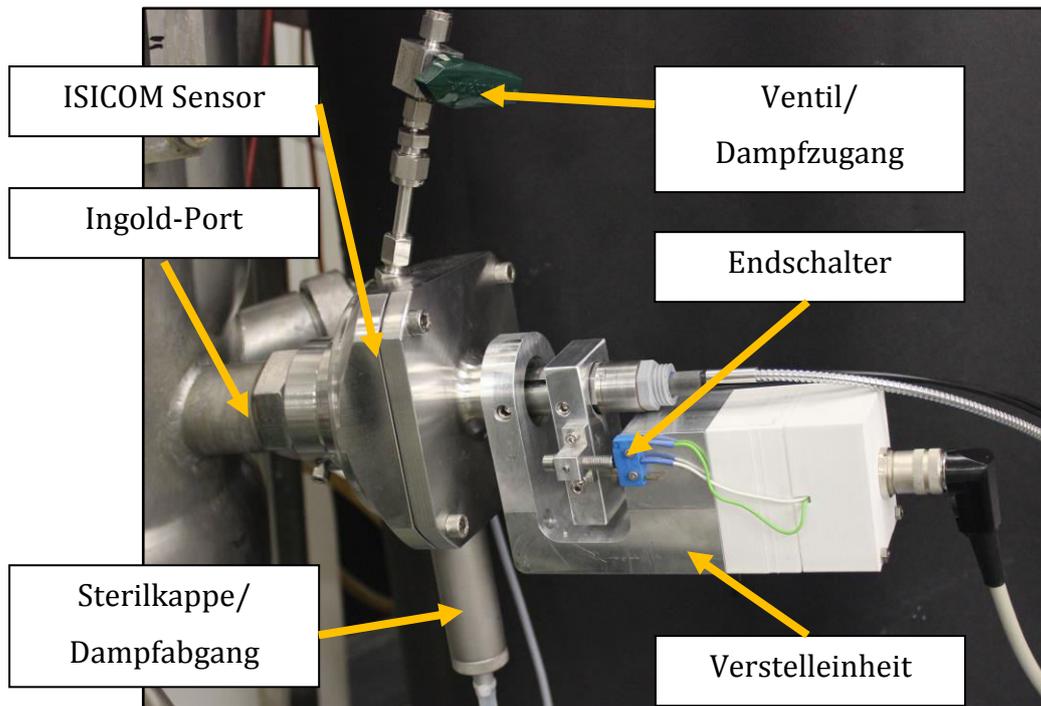
das Entfernen der Lichtleiter aus dem Sensorstempel während des Sterilisationsprozesses deutlich.

Aus diesem Grund ist das optische Fenster am Sensorstempel im  $45^\circ$  Winkel zur Sensorachse montiert (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 11B). Der Nachteil dieser Anordnung ist, dass das eingestrahelte Licht nicht vollständig zur Streulichtmessung genutzt wird, da ein Teil des Lichts an dem Fenster gebrochen wird. Der LED-Strom wurde daher auf die mit der Elektronik maximal möglichen 60 mA gesetzt, wodurch eine ausreichende Sensitivität der Messung gewährleistet ist. Damit das eingestrahelte Licht möglichst weit in die Kammer strahlt, ist der Lichtleiter so im Stempel positioniert, dass die Pfadlänge zur Rückwand der Messkammer maximiert wird.

#### **3.4 Aufbau des Verschlussmechanismus**

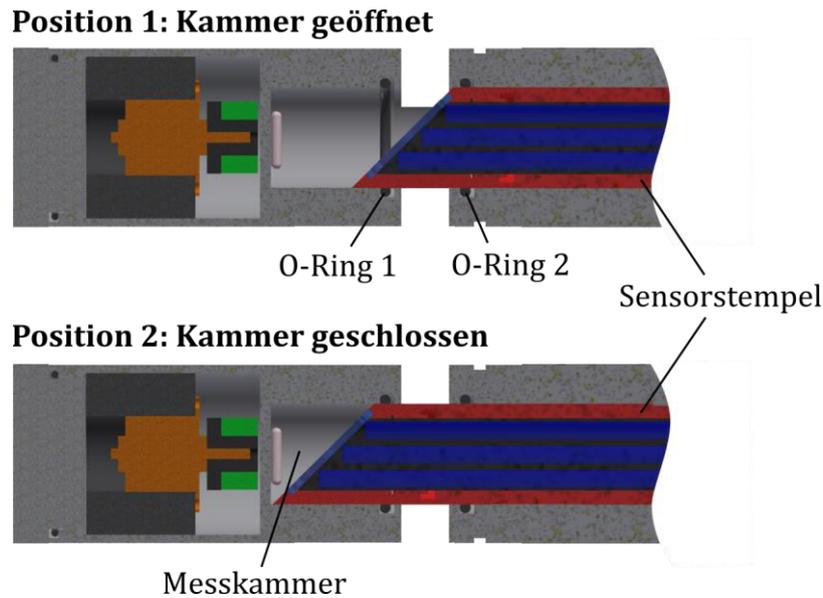
Der Verschlussmechanismus des ISICOM muss gasdicht, autoklavierbar und über den gesamten Kultivierungszeitraum steril zu betreiben sein. Außerdem müssen in der geschlossenen Sensorkammer die verschiedenen optischen Sensoren untergebracht werden, um eine Messung des  $pO_2$ -Werts, der Trübung und ggf. des pH-Werts zu jedem Zeitpunkt zu ermöglichen.

Damit diese Anforderungen erfüllt werden, basiert der entwickelte Mechanismus auf einem beweglichen Sensorstempel im Inneren des Sensorkörpers. Dieser Stempel wird durch die Verstelleinheit vor- und zurückbewegt. Die Verstelleinheit wird am hinteren, äußeren Ende des ISICOMs befestigt und kann entfernt werden. Die eigentliche Bewegung wird durch einen Hohlwellen-Schrittmotor (L4118M1804-T5x5, Nanotec GmbH & Co. KG, Feldkirchen) erzeugt, der via Gewindestange mit der Halterung des Sensorstempels verbunden ist. Um den Stempel korrekt zu positionieren, ist ein Endschalter mit der Steuerelektronik des Motors gekoppelt, der die Position für eine geöffnete Kammerstellung definiert. Das Gehäuse des Motors und der Steuerelektronik ist zu einem großen Teil additiv aus Kunststoff gefertigt, um das Gewicht möglichst gering zu halten. Die Verbindung der Verstelleinheit zur Sensorelektronik erfolgt mittels eines 8-poligen Steckers. Abbildung 16 zeigt die Verstelleinheit am ISICOM, der in einen Ingold-Port eines Reaktors eingesetzt ist.



**Abbildung 16:** ISICOM-Sensor im Bioreaktor eingesetzt. Die Verstelleinheit ist am Ende des Sensors montiert. Die Dampfsterilisationsbauteile sind ebenfalls markiert.

Abbildung 17 stellt die Funktion des Verschlusses dar. Bei geöffneter Kammer befindet sich der Stempel in Position 1 und gibt den Zugang zu Messkammer frei. Damit der Reaktorinhalt nicht in den Sensorkörper läuft, dichtet ein O-Ring (2) direkt hinter dem Öffnungsspalt zwischen Sensorstempel- und Körper den Zwischenraum ab. Zum Verschluss wird der Stempel in Position 2 bewegt, sodass ein weiterer O-Ring (1) am Einlass der Messkammer den Stempel komplett umschließt und die Kammer abdichtet. Dadurch, dass das optische Fenster am Ende des Stempels montiert ist, können die Sensoren sowohl bei geöffneter als auch in der geschlossenen Messkammer Daten liefern (während der OUR-Messung).



**Abbildung 17:** Funktionsweise des Verschlussmechanismus im Halbschnitt. Der Sensorstempel wird durch die Verstelleinheit (nicht gezeigt) in die jeweilige Position gefahren.

### 3.5 Aufbau des Rührmechanismus

Um den spezifischen Sauerstoffverbrauch bei geschlossener Messkammer valide bestimmen zu können, dürfen sich keine Sauerstoff- und Biomassegradienten in der Kammer bilden. Es muss daher für eine ausreichend homogene Durchmischung des separierten Volumenelementes gesorgt sein.

Im ISICOM wurde ein magnetisches Rührsystem zur Mischung innerhalb der Messkammer gewählt. Dieses bietet den Vorteil, dass das Rührelement (Rührfisch) vom Antrieb getrennt werden kann und keine weiteren Dichtungen oder Schmiermittel nötig sind, die mit dem Reaktorinhalt in Kontakt kommen. Außerdem sind Rührfische in der Regel mit chemisch inertem, hitzebeständigem PTFE ummantelt und können bei Bedarf leicht ausgetauscht werden.

Der Rührmotor (SP1018M, Nanotec GmbH & Co. KG, Feldkirchen) ist in einer dicht verschlossenen Kammer im Sensorkopf positioniert und übersteht die Hitzeentwicklung während der Sterilisation schadlos. Die Kabel zur Stromversorgung und Steuerung sind mit Hilfe vier kleiner (2 mm) Bohrungen durch den Sensorkörper zu einer gemeinsamen Steckverbindung geführt. Auf der Rührwelle ist ein Neodym-Ringmagnet mit diametraler Polung (RM-12x04x06-N-D, *magnets4you GmbH*, Lohr a. Main) befestigt, der zur Kopplung der Drehbewegung dient. Das eigentliche

Röhrelement - der Rührfisch - befindet sich an der medienberührenden Rückwand der Messkammer und wird durch den Ringmagnet dauerhaft in Position gehalten, sodass er auch bei sehr turbulenter Strömung im Bioreaktor nicht aus der geöffneten Kammer gespült wird.



**Abbildung 18:** 1,5 x 4 mm Rührfisch des ISICOM.

Im Rahmen der Abschlussarbeit „Technische Charakterisierung eines neu entwickelten Sensors zur Bestimmung zellulärer Aktivität“ von E. Kesdiren (2015, Institut für Technische Chemie, Universität Hannover), wurden verschiedene Rührfische bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten getestet [98]. Das beste Verhältnis aus Rührleistung und Größe wurde mit einem 1,5 x 4 mm Rührfisch (Rotilabo®-Micro PK70.1, *Carl Roth GmbH & Co. KG*, Karlsruhe) erreicht (Abbildung 18).

Zur Beurteilung dieses Sensoraufbaus wird der ISICOM im Folgenden genauer charakterisiert und in verschiedenen Bioprozessen verwendet.

## 4. Charakterisierung des Sensors

Der Sensor setzt sich sowohl aus mechanischen als auch aus sensorischen Komponenten zusammen. Für die mechanischen Komponenten, den Verschluss- und den Rührmechanismus wurde untersucht, ob sie den Anforderungen wie Sterilität und Gasdichtigkeit ohne Schädigung der Zellen genügen. Die drei sensorischen Komponenten werden im Folgenden anhand von Kalibrationen in Standardlösungen auf Messbereich und Genauigkeit beschrieben.

### 4.1 Verschlussmechanismus

Der Verschlussmechanismus soll ein Volumenelement separieren, um unter Ausschluss weiterer Sauerstoffzufuhr den spezifischen Sauerstoffverbrauch der eingeschlossenen Zellen bestimmen zu können. Somit muss der Verschlussmechanismus die Gasdichtigkeit garantieren, ohne durch die mechanischen Teile die Sterilität des Bioprozesses zu gefährden.

#### 4.1.1 Sterilfunktion

Für den Test auf Sterilität wurde der Sensor-Prototyp zusammen mit 6 Litern LB-Kulturmedium in einen 10 L Rührkesselreaktor sterilisiert, während gleichzeitig der integrierte Sterilisationsmechanismus des ISICOMs ablief. Über eine Woche lang wurde die Sterilität des Systems unter Kultivierungsbedingungen - ohne Mikroorganismen - überwacht. In diesem Zeitraum öffnete und schloss sich die Sensorkammer regelmäßig. Nach Abschluss des Steriltests war keine Kontamination des Reaktors festzustellen. Somit kann der ISICOM bedenkenlos in Bioprozessen eingesetzt werden.

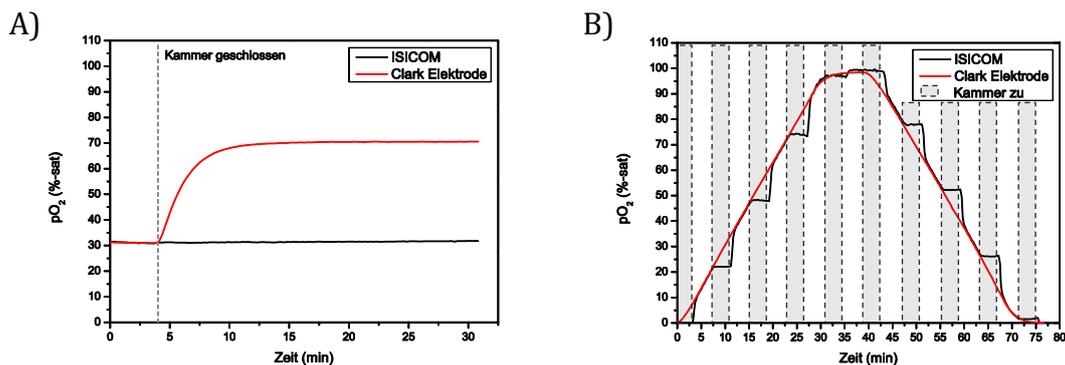
#### 4.1.2 Gasdichtheit

Damit der Sauerstoffverbrauch bestimmt werden kann, darf bei geschlossener Kammer kein Gas- und Flüssigkeitsaustausch zwischen einem separiertem und einem

gesamten Reaktorvolumen stattfinden. Um die Gasdichtigkeit zu überprüfen, wurden der Sensor-Prototyp sowie eine Referenz-Sauerstoffelektrode (Clark-Elektrode) in einen mit VE-Wasser gefüllten Rührkesselreaktor eingebaut. Der Sauerstoffpartialdruck wurde im Reaktor durch Stickstoffbegasung auf 35 %-sat geregelt und die Sensorkammer daraufhin geschlossen. Danach wurde der  $pO_2$  im Reaktor durch weitere Begasung auf 70 %-sat  $O_2$ -Sättigung eingestellt.

Bei einem gasdichten Verschluss der Sensorkammer bleibt der Sauerstoffpartialdruck innerhalb der verschlossenen Kammer konstant bei 35 %-sat, während er außerhalb ansteigt. Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 19 A dargestellt. Der Sauerstoffpartialdruck bleibt nach dem Schließen der Kammer über 30 Minuten konstant, was einen gasdichten Verschluss belegt.

In einem weiteren Experiment wurde die Kammer in regelmäßigen, zeitlich definierten Abständen geöffnet und wiederholt verschlossen. Dabei stieg der Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung von 0 %-sat auf 100 %-sat an. Der gewählte Aufbau des Experiments simuliert den Ablauf im realen Bioprozess und soll überprüfen, ob auch nach mehreren Verschlusszyklen die Funktionalität gewährleistet werden kann. Abbildung 19 B zeigt das Ergebnis dieser Messung. In der Zeit, in der die Kammer verschlossen ist, bleibt der Sauerstoffpartialdruck konstant, während er sich in der Umgebung ändert. Nach Öffnung der Kammer erreicht der mit dem ISICOM gemessene Wert sehr schnell den der Referenzelektrode.



**Abbildung 19:** Gasdichtigkeit des Verschlussmechanismus über einen Zeitraum vom 30 Minuten (A) und bei wiederholtem Öffnen und Schließen der Sensorkammer (B).

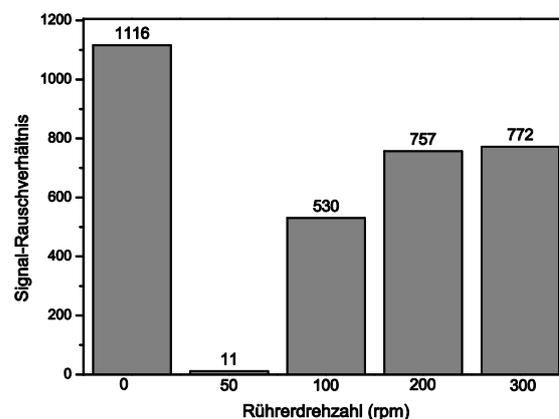
Der Verschlussmechanismus der Kammer erfüllt somit die Anforderungen und ermöglicht ein gasdichtes Separieren des zu vermessenden Volumens.

## 4.2 Rührmechanismus

Der Rührmechanismus der ISICOM-Sensorkammer verhindert ein Sedimentieren der Zellen in der geschlossenen Kammer und beugt einem Sauerstoffgradienten in der Kammer vor. Da sich der Rührfisch im Strahlengang der Trübungssonde befindet, muss zunächst sein Einfluss auf die Trübungsmessung ermittelt werden. Erst im Anschluss ist die optimale Rührfrequenz bestimmbar.

### 4.2.1 Einfluss des Rührers auf die Trübungsmessung

Welchen Einfluss der Rührer auf die Trübungsmessung tatsächlich hat, wurde mit Hilfe des Signal-Rauschverhältnisses (S/N) ermittelt. Dieses beschreibt das Verhältnis vom Messwert zu der Standardabweichung. Für die Messung wurde der Sensorstempel mit eingesetztem Sensorlichtleiter in einem mit VE-Wasser gefüllten Nachbau der Sensorkammer eingesetzt und der Rührmechanismus bei verschiedenen Rührfrequenzen für 20 Minuten betrieben. Daraufhin wurden sowohl Mittelwert als auch Standardabweichung für diesen Messzeitraum bestimmt und aus den erhaltenen Werten das S/N bestimmt. Als Referenz wurde das S/N ohne Bewegung des Rührfischs genutzt. Ein hoher Wert bedeutet, dass das gemessene Signal im Verhältnis zur Standardabweichung hoch ist. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der Messungen.



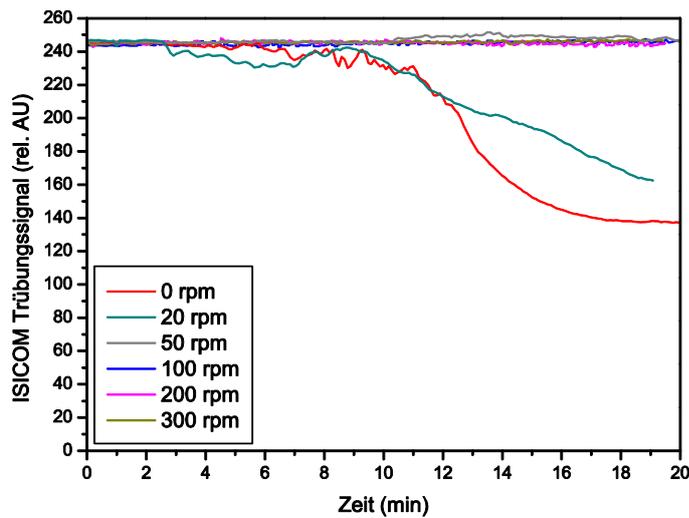
**Abbildung 20:** Das Signal-Rauschverhältnis der Trübungsmessung in Wasser bei verschiedenen Rührerdrehzahlen.

Ohne Rühren beträgt das Signal-Rauschverhältnis 1116. Der Trübungs-Messwert ist dementsprechend 1116-mal größer als das Rauschen. Bei einer Rührfrequenz von 50 rpm sinkt das Signal-Rauschverhältnis drastisch auf einen Wert von lediglich 11 ab. Die Erhöhung der Rührgeschwindigkeit verbessert das S/N wiederum deutlich. Die höchsten und damit besten Signal-Rauschverhältnisse im Vergleich zur Referenz werden bei 200 und 300 rpm erzielt und ergeben einen Wert von 757 bzw. 772. Bei dieser Einstellung interferiert der Rührfisch nur gering mit der Messfrequenz (1 s) und der elektronischen Signalfilterung der Trübungssonde. Somit sollte für die Messungen bei geschlossener Sensorkammer eine Rührfrequenz zwischen 200 und 300 rpm gewählt werden, um die Trübungsmessung nur minimal zu beeinflussen.

#### 4.2.2 Ermittlung der optimalen Rührfrequenz

Die optimale Rührfrequenz zur Durchmischung der Sensorkammer wurde mit 4000 FNU (*Formazin nephelometric unit*) Formazindispersion (ca. 2 mL) ermittelt. Hierbei wurde die Trübung bei verschiedenen Rührfrequenzen über einen Zeitraum von 20 Minuten aufgezeichnet. Sobald die Sensorkammer homogen durchmischt ist, also keine Sedimentation mehr stattfindet, bleibt das Trübungssignal innerhalb der Kammer konstant. Sedimentation führt dagegen zu einer Änderung des Trübungssignals. Als Referenz dient auch hier eine Messung, bei der in der Kammer nicht gerührt wurde.

In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass das Trübungssignal ohne Durchmischung nach 20 Minuten deutlich abnimmt und die Formazinpolymere sedimentieren. Bei Rührfrequenzen von 20 und 50 rpm bleibt das Trübungssignal ebenfalls nicht konstant. Erst ab einer Rührfrequenz von 100 rpm stellt sich ein stabiles Signal ein, bei dem auch nach 20 Minuten keine wesentliche Veränderung und somit auch keine Sedimentation eintritt.



**Abbildung 21:** Zeitlicher Verlauf des Trübungssignals in der Messkammer bei verschiedenen Rührerdrehzahlen für Formazin.

Da das Sedimentationsverhalten von Formazin nicht direkt auf Mikroorganismen übertragbar ist, wurde das Experiment zusätzlich mit *E. coli* und *S. cerevisiae* durchgeführt. Dazu wurden Zellen aus jeweils einer *E. coli* K1 und *S. cerevisiae* Schüttelkultur abzentrifugiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Kultur in PBS resuspendiert, sodass eine  $OD_{600}$  von 45 (*E. coli*) bzw. 50 (*S. cerevisiae*) vorlag. Die Kulturlösungen wurden dann bis zum Einfüllen in die Messkammer auf Eis gelagert und vor jeder Messung gut gemischt.

*E. coli* K1 zeigt innerhalb des gewählten Messzeitraums von 20 Minuten nahezu keine Sedimentation. *S. cerevisiae* hingegen sedimentiert ohne Durchmischung innerhalb von 20 Minuten deutlich. Bei Hefen wird dagegen eine Rührfrequenz von 200 rpm benötigt, um eine Sedimentation zu (vgl. Anhang, Abbildung 46).

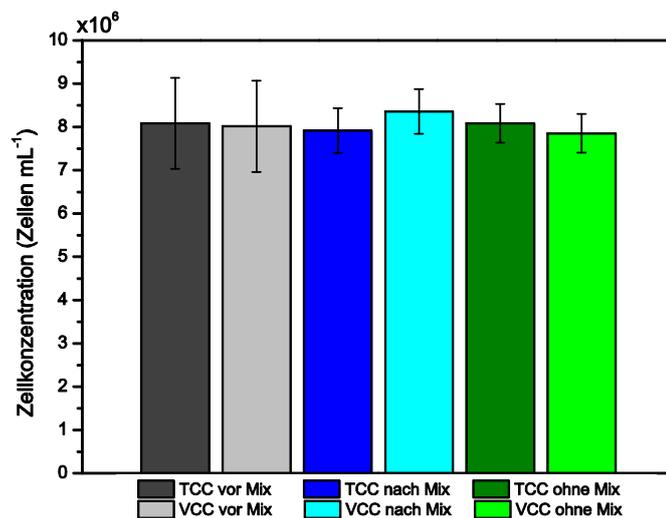
Für alle weiteren ISICOM-Experimente, die eine Durchmischung der Messkammer vorsehen, wurden 200 rpm als Rührfrequenz genutzt. Bei dieser Geschwindigkeit kann eine Sedimentation der Organismen in der Kammer verhindert werden, ohne dass die Trübungsmessung durch den Rührfisch beeinflusst wird.

#### 4.2.3 Zellschädigung durch den Rührmechanismus

Zur abschließenden Charakterisierung des Rührmechanismus muss ausgeschlossen werden, dass die Organismen in der Messkammer durch den Rührfisch geschädigt

werden. Da tierische Zellen keine Zellwand besitzen, sind sie besonders anfällig für mechanische Belastung und wurden als Modellorganismen für diesen Versuch gewählt.

Zur Messung wurden CHO K1 Zellen aus einer Schüttelkultur mit einer Zellkonzentration von ca.  $8 \times 10^6$  Zellen·mL<sup>-1</sup> und einer Viabilität von 99,17 % in die Messkammer gefüllt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 200 rpm gerührt. Im Anschluss wurde die Gesamt- und Lebendzellkonzentration (VCC und TCC) erneut mit einem automatischen Zellzählgerät (Cedex, Roche Innovatis AG, Prenzberg) bestimmt. Um einen Einfluss der Lagerung auf die Konzentration der Zellen auszuschließen, ist nach Ablauf der Mischzeit zusätzlich eine Kontrolle mit ungerührter Probe vermessen worden. Alle Analysen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis des Versuchs.



**Abbildung 22:** Einfluss des Rührmechanismus bei 200 rpm auf die Gesamt- und Lebendzellkonzentration von CHO K1 Zellen.

Es wird deutlich, dass die Gesamt- und Lebendkonzentration der Zellen durch den Rührmechanismus nicht signifikant beeinflusst wird. Die Abweichung zum Startwert und zur ungerührten Kontrolle liegt innerhalb der Messgenauigkeit des Cedex, weshalb festgehalten werden kann, dass der Rührmechanismus die Zellen innerhalb der Messkammer nicht schädigt.

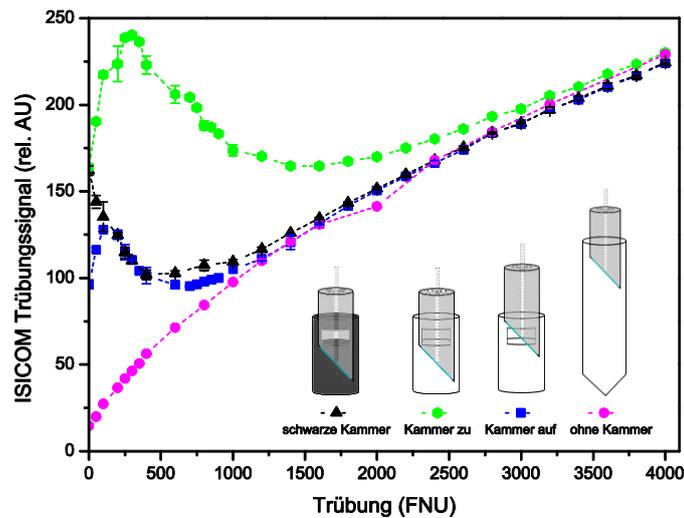
### 4.3 Trübungssonde

Die Trübungsmessung ist ein essentieller Bestandteil des ISICOM Sensors zur Bestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme. Bei einem beweglichen Sensorstempel befindet sich der Lichtleiter in verschiedenen Positionen, die die Trübungsmessung beeinflussen. Für die Charakterisierung dienten Formazindispersionen zwischen 0 und 4000 FNU als Trübungsstandard. Anschließend wurde überprüft, ob sich das beobachtete Verhalten auf Messungen mit Mikroorganismen (*E. coli*) übertragen lässt. Außerdem wurde die Langzeitstabilität der Messung und deren Temperaturabhängigkeit überprüft, um während eines Bioprozesses auch über mehrere Tage verlässliche Messwerte zu liefern.

#### 4.3.1 Kalibrationen mit Trübungsstandard

Für die Untersuchung wurden je 15 mL der Kalibrationslösungen in ein 50 mL Reaktionsgefäß gefüllt und der Kopf des ISICOM Sensors mit dem Lichtleiter darin eingetaucht. Die Messung ohne Kammer erfolgte in einem verdunkelten und mit 40 mL gefüllten Gefäß, um das Einstrahlen von Umgebungslicht zu verhindern. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung.

Abbildung 23 zeigt die Resultate der Trübungskalibrationen mit Formazindispersionen. Die Messung ohne Kammer beschreibt den alleinigen Einfluss der Trübung auf das Sensorsignal. Mit steigender Formazinkonzentration steigt das Sensorsignal von 15 rel. AU auf 225 rel. AU in Form einer Sättigungsfunktion an.



**Abbildung 23:** Kalibration des ISICOM Trübungssignals bei verschiedenen Verdünnungen der Formazindispersion, Positionen des Sensorstempels und Modifikation der Sensorkammer.

Wird der Sensorstempel in der ISICOM-Kammer montiert und die Messung bei geöffneter Kammer wiederholt, zeigt sich, dass die Kammer bei geringen Trübungen starken Einfluss auf das Trübungssignal hat. Der Nullwert beträgt mit 96 rel. AU einen fast siebenfach höheren Wert als bei der Messung ohne Kammer. Bei Erhöhung der Trübung auf 100 FNU steigt das Messsignal auf 130 rel. AU an und fällt danach wieder ab. Erst bei höheren Trübungen ab 1200 FNU nähern sich die gemessenen Werte denen ohne Kammer an.

Dieser Effekt verstärkt sich deutlich, wenn die Kammer geschlossen ist. Der Nullwert liegt hier bei 164 rel. AU und steigt bis zu einer Trübung von 300 FNU auf ein Maximum von 240 rel. AU an. Danach sinkt das Signal wieder ab und nähert sich erst ab 3000 FNU dem Verlauf der Messung ohne Kammer an.

Ein Vergleich der Nullwerte der Messungen „ohne Kammer“ mit denen aus „Kammer auf“ und „zu“ zeigt, dass bereits ohne Streuzentren hohe Signale in der Messkammer des ISICOM gemessen werden. Das eingestrahelte Licht wird an der Kammerrückwand reflektiert und trifft direkt wieder auf den Detektor. In der geschlossenen Kammer verkürzt sich die Wegstrecke bzw. Pfadlänge zur Rückwand und die Reflexion wird dadurch verstärkt.

Werden hingegen Partikel in der Messzone vom eingestrahltm Licht getroffen, wird ein Teil des Lichts absorbiert und ein Großteil in alle Raumrichtungen gestreut. Das Streulicht wird sowohl an der Edelstahlrückwand als auch Seitenwand der Messkammer reflektiert und trifft zu einem Teil auf den Detektor, zusätzlich zu dem direkt von den Partikeln gestreuten Licht. Diese Reflexion wirkt damit verstärkend auf die Messung und erklärt den vorübergehenden Anstieg des Signals bei geringen Trübungen. Je mehr Streuzentren sich in der Kammer befinden, desto mehr Reflexionen treten auch an der Kammerwand auf.

Ab einer bestimmten Partikelanzahl in der Messzone reduziert sich die Menge an Licht, die direkt auf die Rückwand der Messkammer trifft. In diesem Fall kommt es gewissermaßen zu einer Transflexionmessung. Die Partikel streuen das Licht, bevor es die Kammerrückwand erreicht, und das Messsignal fällt mit steigender Trübung wieder ab. Im Signalminimum trifft das von der Kammerrückwand oder Seitenwand reflektierte Licht kaum mehr direkt auf den Detektor und das Signal wird bei weiterer Erhöhung der Partikelanzahl maßgeblich durch das Streulicht der Partikel selbst bestimmt.

Um den Einfluss der ISICOM-Messkammer auf die Trübungsmessung genauer zu untersuchen, wurde eine Kammer angefertigt, die mit Titanaluminiumnitrid (TiAlN) beschichtet worden ist. Das biokompatible TiAlN verursacht eine Schwärzung und kann so mögliche Reflexionen reduzieren. Mit diesem Aufbau waren lediglich vergleichende Messungen mit geschlossener Kammer möglich.

Der Nullwert liegt hierbei auf einem vergleichbaren Niveau mit der unbeschichteten, geschlossenen Kammer. Das Signal bei steigender Trübung fällt in der schwarzen Kammer jedoch direkt bis auf ein Minimum bei 400 FNU ab und steigt im Vergleich zu der ungeschwärzten Kammer zuvor nicht an. Ab dieser Trübung ähneln sich die Verläufe von geöffneter und geschwärzter Kammer und sind ab 1200 FNU vergleichbar mit der Messung ohne Kammer. Durch Schwärzen kann somit die partikelbedingte Verstärkung der Reflexion bei geringen Trübung deutlich reduziert werden. Trotzdem ist die Beeinflussung des Messsignals durch die Reflexionen nicht vollständig unterbunden. Grund hierfür sind ungleichmäßige TiAlN-Beschichtungen und damit Schwärzungsgrade innerhalb der Kammer, die

bedingt durch das Beschichtungsverfahren auftreten. Daher wird in weiteren Experimenten auf eine Schwärzung der Messkammer verzichtet.

Die Charakterisierung der Trübungssonde zeigt, dass die gewählte Konfiguration grundsätzlich geeignet ist, um Trübungsveränderungen einer Lösung zu messen. Aufgrund des Aufbaus der ISICOM Messkammer kommt es bei geringen Trübungen zu einer Beeinflussung des Streulichtsignals, welches sich durch den Anstieg und Abfall des Signals in diesem Bereich zeigt. Die Effekte lassen sich zusammenfassend folgendermaßen einteilen:

- |                                                                        |                          |
|------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 1. Reine Reflexion                                                     | → Basissignal            |
| 2. Verstärkung der Reflexion durch<br>Streuung der Partikel/Organismen | → Signalanstieg          |
| 3. Überlagerung von Streuung und Reflexion<br>(Transflexion)           | → Signalabfall           |
| 4. Reine Streuung                                                      | → erneuter Signalanstieg |

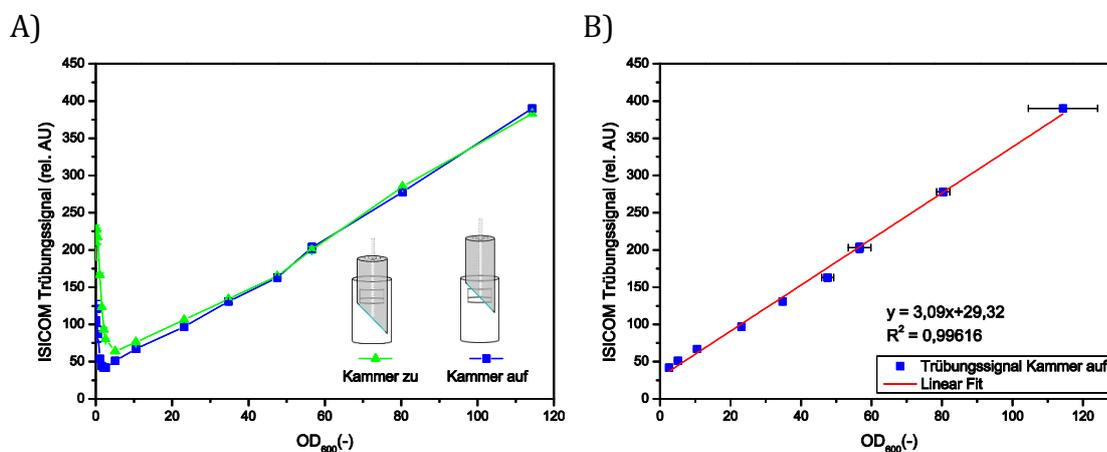
Die Intensität des jeweiligen Effekts hängt von der Position des Sensorstempels (Kammer auf/zu) und damit der Pfadlänge des Lichts in der Messkammer ab. Dieses auf den ersten Blick komplexe und schwer zu kalibrierende Sensorverhalten birgt in der Praxis Vorteile. Durch diese Transflexionsmessung werden auch bei geringen Trübungen oder nur schwach streuenden Partikeln bzw. Organismen bereits große Signalveränderungen hervorgerufen. Einfache lineare Kalibrationsmodelle sind für geringe Trübungen jedoch nicht geeignet.

#### 4.3.2 Kalibrationen mit *E. coli*

Zur Überprüfung, ob das mit Formazin beobachtete Verhalten des Trübungssensors auch bei Mikroorganismen auftritt, wurde eine Kalibration mit *E. coli* K1 durchgeführt. Der Messaufbau war identisch zu dem in Kapitel 4.3.1.

Die Zellen einer *E. coli* K1 Schüttelkultur wurden nach Erreichen der frühen stationären Phase abzentrifugiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Kultur in PBS resuspendiert und auf eine  $OD_{600}$  zwischen 0 und 115 verdünnt. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung.

Abbildung 24 A zeigt das Trübungssignal des ISICOM bei geöffneter und geschlossener Messkammer in Abhängigkeit von der eingestellten  $OD_{600}$ . Auch bei *E. coli* K1 steigt das Messsignal mit steigender Trübung an und fällt danach wieder ab. Das Minimum des Abfalls liegt bei der geöffneten Kammer bei einer  $OD_{600}$  von ca. 2,58 und bei geschlossener Kammer bei ca. 5,08. Ab einer  $OD_{600}$  von 34,75 unterscheiden sich die Messsignale kaum voneinander.



**Abbildung 24:** (A) Verlauf des Trübungssignals von *E. coli* K1 bei steigender  $OD_{600}$ . (B) Lineare Regression des Streulichtsignals auf die  $OD_{600}$  bei geöffneter Messkammer ab  $OD_{600}$  2,58.

Anders als bei dem Sättigungsfunktionsanstieg des Trübungssignals bei Formazininmessungen steigt das Signal für *E. coli* K1 nach Erreichen des Minimums linear an. Abbildung 24 B zeigt die lineare Regression des Trübungssignals ab einer  $OD_{600}$  von 2,58 bis zu 114,33 ( $\hat{=}$  Biotrockenmasse (BTM) 1,09 bis 32,04  $g \cdot L^{-1}$ , vgl. Anhang, Abbildung 45) für die geöffnete Messkammer. Bei geringeren Trübungen müssten komplexe Kalibrationsmodelle angewandt werden.

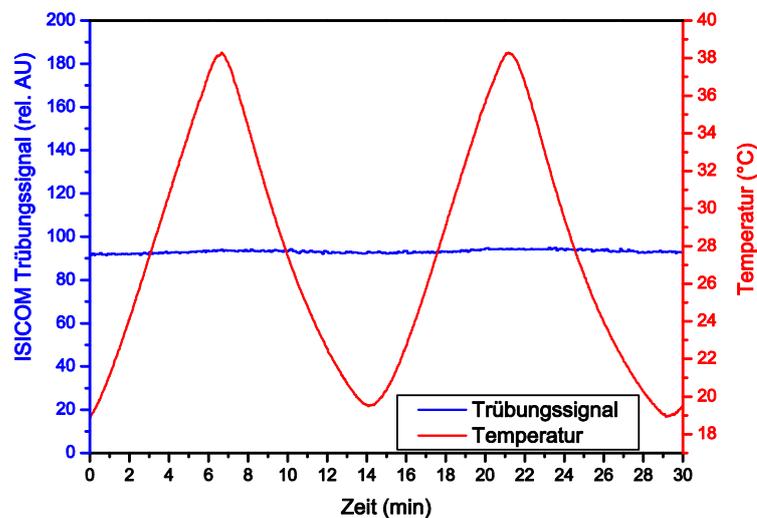
#### 4.3.3 Langzeitstabilität und Temperaturabhängigkeit

Damit die Trübungsmessung mit dem ISICOM verlässlich und reproduzierbar über einen gesamten Bioprozess erfolgen kann, muss die Langzeitstabilität der Messung

gewährleistet sein. In einem 0,5 L Bioreaktor wurden 0,4 L VE-Wasser auf 37 °C konstant temperiert und das Trübungssignal über 14 Stunden beobachtet. Das Signal blieb über die gesamte Messzeit konstant (vgl. Anhang, Abbildung 47).

Im Verlauf von Bioprozessen kann es zudem nötig sein, die Temperatur zu ändern. Mögliche Anwendungsfälle sind beispielsweise Temperaturabsenkungen nach Induktion der Expression zur Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen. Dies verlangsamt den Metabolismus der Organismen und das Protein bekommt mehr Zeit zur korrekten Faltung [99].

Damit die Kalibration der Trübung auch nach einer solchen Änderung gültig bleibt, wurde die Temperaturabhängigkeit der Messung bestimmt. Dazu wurde während der Aufzeichnung des Trübungssignals die Temperatur periodisch zwischen 18 °C und 40 °C geändert. Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, dass sich das Trübungssignal in Abhängigkeit von der Temperatur des Mediums um maximal  $\pm 2$  rel. AU ändert. Der ISICOM kann somit in Bioprozessen verwendet werden, in denen Temperaturänderung nötig sind.



**Abbildung 25:** Trübungssignal des ISICOM bei variierender Umgebungstemperatur über die Zeit.

#### 4.4 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration

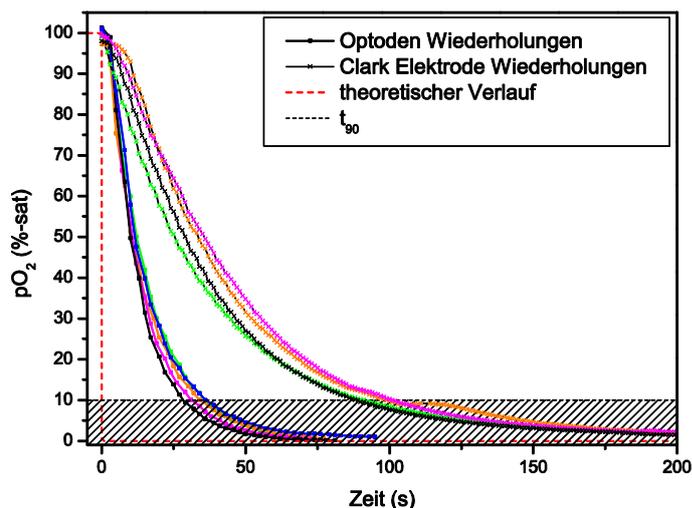
Die Messung des Sauerstoffgehalts und somit auch der Sauerstoffverbrauchsrate erfolgt über Sauerstoffoptoden der Firma Presens, Regensburg. Funktion, Messprinzip

und Aufbau sind in Kapitel 2.2.2 dargestellt. Für den Einsatz im ISICOM von besonderer Bedeutung sind das Ansprechverhalten, die Langzeitstabilität und die Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffmessung. Die Bestimmung des OUR Messbereichs der Sauerstoffoptoden erfolgt anhand eines biochemischen Experiments.

#### 4.4.1 Ansprechverhalten des $pO_2$ -Sensors

Für die Messung der Sauerstoffaufnahme rate ist entscheidend, wie schnell eine Veränderung der Sauerstoffkonzentration erfasst werden kann, da die OUR Messung mittels dynamischer Methode auf der Bestimmung der Änderungsrate des  $O_2$ -Gehalts basiert. Für eine verlässliche Messung muss der Sensor diese schnell genug und ohne Verzögerung erfassen. Das Ansprechverhalten bzw. die Reaktionszeit wird definiert als die Zeit, die vom Sensor benötigt wird, um 90 % eines vorgegebenen Endwerts zu erreichen.

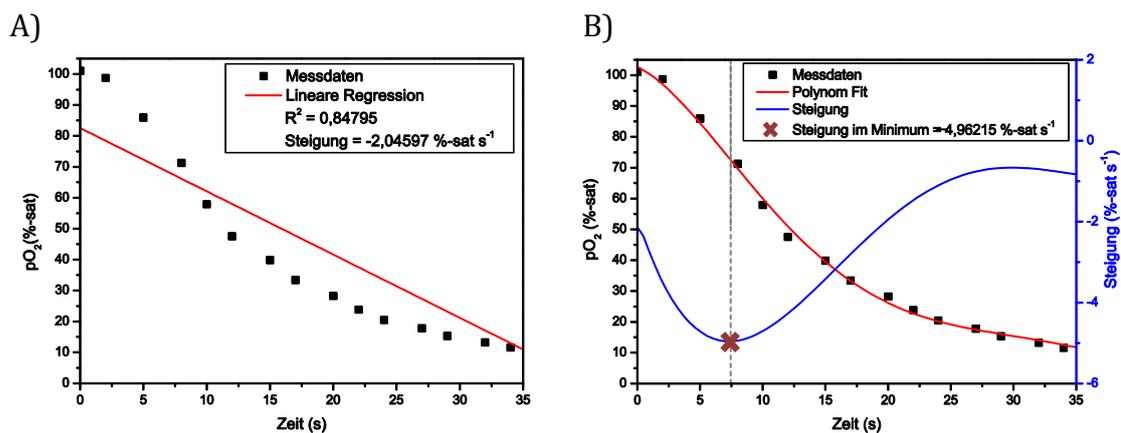
Um das Ansprechverhalten des Sauerstoffpatches zu ermitteln, wurde ein Modellreaktor mit 300 mL PBS gefüllt und die Sauerstoffkonzentration durch Begasung mit Druckluft auf 100 %-sat geregelt. Nach einer Vorlaufzeit von etwa 2 Minuten wurden 100 mL einer 1 M Natriumsulfitlösung hinzugegeben. Dadurch erfolgte eine sofortige Desoxygenierung der Pufferlösung, was eine sprunghafte Änderung des Sauerstoffgehalts zur Folge hatte. Abbildung 26 zeigt die Verläufe mehrerer Desoxygenierungen für die  $pO_2$ -Optode und die Clark Elektrode als Referenz.



**Abbildung 26:** Antwortverhalten der Sauerstoffoptode und Clark Elektrode bei einer sprunghaften Verringerung des Sauerstoffgehalts von 100 %-sat auf 0 %-sat.

Die Sauerstoffkonzentration liegt vor der Zugabe der Natriumsulfitlösung bei 100 %-sat. Danach fällt die Konzentration bei allen Versuchen vergleichbar schnell für die jeweilige Messmethode ab. Die theoretische, sprunghafte Änderung ist als rote Line dargestellt. Schraffiert gekennzeichnet ist die Ansprechzeit  $t_{90}$ . Im Mittel liegt diese bei  $34 \pm 3$  s für die Sauerstoffoptode und bei  $94,5 \pm 5,26$  s für die Referenzelektrode. Beide Ansprechzeiten liegen damit innerhalb der Spezifikationen der Herstellerangaben, wobei die Optode deutlich schneller auf Veränderung reagiert.

Die Sauerstoffaufnahme rate entspricht der Steigung des Verlaufs der Sauerstoffmessung. Somit kann aus der Desoxygenierung die maximal messbare Aufnahme rate bestimmt werden. Da die Abnahme der Sauerstoffkonzentration bei diesem schnellen Verbrauch entgegen der Literaturangaben [64] nicht linear verläuft, würde eine lineare Regression über den gesamten Messzeitraum zu einer mittleren Abnahmerate führen, die nicht die minimale Steigung erfasst. Abbildung 27 A verdeutlicht dieses Phänomen.



**Abbildung 27:** Ermittlung der Steigung der Sauerstoffkonzentration. (A) Lineare Regression (B) polynomische Interpolation und Ableitung.

Der Auswertungsalgorithmus des ISICOMs benutzt deshalb lediglich bei einem Regressionskoeffizienten von über  $R = 0,97$  die lineare Regression zur Ermittlung der Sauerstoffaufnahme rate. Sobald ein Regressionskoeffizient von  $0,97$  unterschritten ist, wird ein Polynom 5. Ordnung durch die Messpunkte interpoliert und die erste Ableitung gebildet. Das Minimum dieser Ableitung beschreibt die höchste Steigung im Wendepunkt des Polynoms und wird als Basis für die OUR-Berechnung genutzt

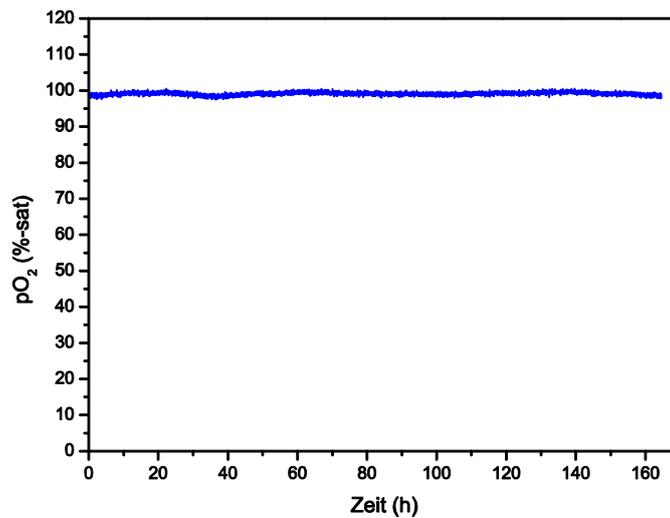
(Abbildung 27 B). Eine Wahl des Auswertalgorithmus anhand des Regressionskoeffizienten ist nötig, da die Steigung bei flachem Sauerstoffabfall bzw. Messungen über einen längeren Zeitraum, mittels der Polynomanpassung nicht eindeutig bestimmt werden kann (siehe Anhang 9.3.3). In einem solchen Fall kommt es aufgrund von geringen  $pO_2$ -Wertschwankungen zu vielen lokalen Minima und Maxima, wodurch ein einzelnes Minimum nicht eindeutig zu bestimmen ist.

Die maximal messbare Steigung liegt für die Optode bei  $-5,25 \pm 0,5 \text{ \%}\cdot\text{s}^{-1}$ , was unter gegebenen Bedingungen einer OUR von  $60 \pm 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  entspricht. Mit der Clark-Elektrode beträgt die maximale Steigung lediglich  $-1,93 \pm 0,4 \text{ \%}\cdot\text{s}^{-1}$  respektive  $20 \pm 5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Noch schnellere Änderungen bzw. höhere Verbrauchsraten können mit diesen Systemen nicht erfasst werden. Für die dynamische Bestimmung der Sauerstoffaufnahme ist der optische  $pO_2$ -Sensor folglich besser geeignet als amperometrische Clark-Sensoren.

#### 4.4.2 Langzeitstabilität

Mit der Zeit verblasst der Farbstoff in Sauerstoffoptoden aufgrund der wiederholten Bestrahlung durch die Ausleseeinheit. Dieser sogenannte *Bleaching*-Effekt sorgt dafür, dass es zu einer *Drift* des Signals im Verlauf der Messung kommen kann. Zur Untersuchung, ob dieser Effekt für die Sauerstoffmessung im ISICOM relevant ist, wurde die Sauerstoffkonzentration mit einem  $pO_2$ -Patch bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in PBS über 6 Tage beobachtet. Durch konstante Begasung mit 1 vvm Druckluft und Rühren bei 500 rpm wurde die Lösung über die gesamte Versuchsdauer auf einem  $pO_2$  von 100 %-sat gehalten und mit dem maximalen Messintervall von 3 s die Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet.

Abbildung 28 zeigt, dass es über 6 Tage zu keiner Änderung des Sauerstoffsignals gekommen ist. Gemittelt über jeweils einen Zeitraum von 10 Minuten zu Beginn und zum Ende der Messung lag der gemessene  $pO_2$ -Wert bei  $98,79 \pm 0,21 \text{ \%}$  bzw.  $98,46 \pm 0,34 \text{ \%}$  und unterscheidet sich damit lediglich um 0,33 %. Bei einer üblichen Laufzeit biotechnologischer *Batch*-Prozesse zwischen 8 h und 6 Tagen ist der Einsatz des gewählten  $pO_2$ -Patches für die Sauerstoffmessung deshalb gut möglich.



**Abbildung 28:** Sauerstoffsignal des pO<sub>2</sub>-Patches über die Dauer von 160 Stunden zur Untersuchung der Langzeitstabilität.

#### 4.4.3 Temperaturabhängigkeit

Die Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Medien sinkt mit steigender Temperatur [100]. Die Sauerstoffausleseeinheit des ISICOM (Oxy-4 Mini, Presens GmbH, Regensburg) bietet bereits eine interne Temperaturkompensation, auf die die Software des ISICOMs zurückgreifen kann. Die Software des ISICOM bietet dem Nutzer die Möglichkeit, die Prozesstemperatur entweder manuell zu setzen, oder *online* über eine entsprechende MODBUS-Schnittstelle auszulesen. Dies erlaubt den Einsatz des ISICOMs bei Bioprozessen, in denen ein Temperaturshift vorgesehen ist, ohne den Sensor neu kalibrieren zu müssen. Auf weitere Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Sensorpatches wird daher im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

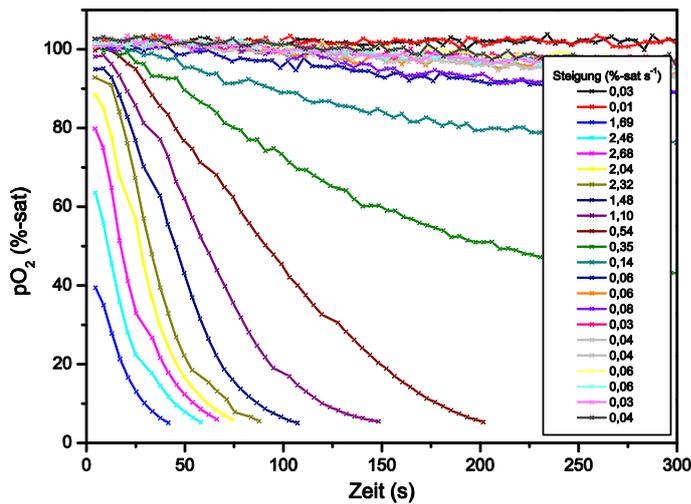
#### 4.4.4 Ermittlung der Sauerstoffaufnahme im Modell

Zur Charakterisierung wurde der pO<sub>2</sub>-Sensor mittels eines Modellsystems zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme getestet. Als Modellsystem diente das Enzym Glukoseoxidase (GOD), das unter Verbrauch von Sauerstoff Glukose zu Glukonsäure umsetzt [29, 101].

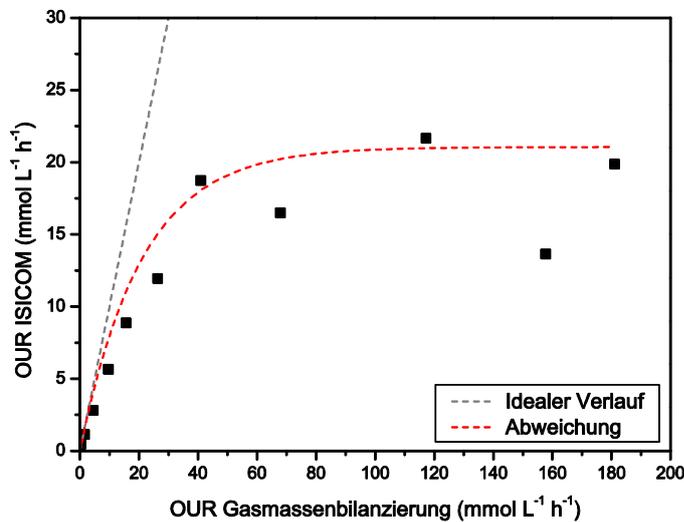
Für die Messung wurde eine PBS Pufferlösung mit 50 g·L<sup>-1</sup> Glukose versetzt und auf 35 °C temperiert, bei 1000 rpm gerührt und mit 1 vvm Druckluft begast. Nach einer Equibrilationszeit von 10 Minuten wurde 4 g·L<sup>-1</sup> GOD-Lösung zugesetzt und

die OUR-Messung mit dem ISICOM mittels Schließen der Messkammer gestartet. Durch wiederholtes Öffnen und Schließen der Kammer konnten im Laufe der Zeit verschiedene Sauerstoffverbrauchsraten gemessen werden, da die Aktivität des Enzyms nachließ. Als Referenz diente die Abgasmessung mit dem BlueInOne Gas-sensor zur Gasmassenbilanzierung.

A)



B)



**Abbildung 29:** (A) Abnahme der Sauerstoffkonzentration für verschiedene Sauerstoffverbrauchsraten nach GOD Zugabe. (B) Vergleich der OUR-Messungen mit ISICOM und Gasmassenbilanzierung.

In Abbildung 29 A ist die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der geschlossenen Kammer des ISICOM über die Zeit dargestellt. Jede Kurve entspricht einer Messung bei unterschiedlicher Sauerstoffverbrauchsrate. Je steiler der Abfall, desto größer ist die Verbrauchsrate.

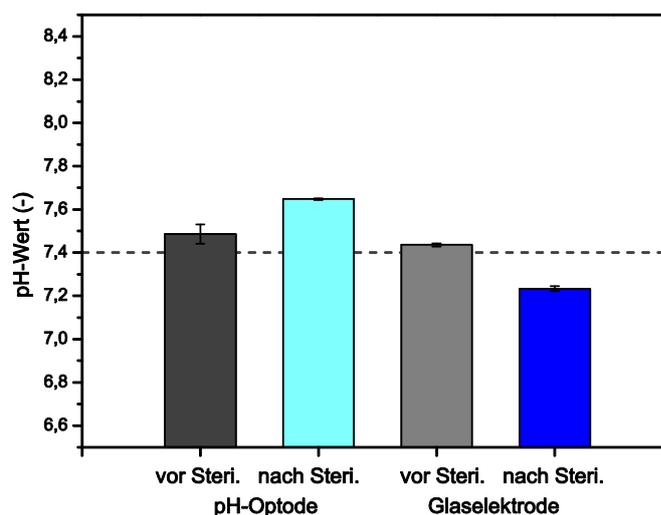
Aufgrund des in Kapitel 4.4.1 beschriebenen Ansprechverhaltens des  $pO_2$ -Sensors verläuft die Abnahme der Sauerstoffkonzentration bei hohen Verbrauchsraten nicht linear. Daher wurde die Steigung mittels der variablen Auswertalgorithmik für jede Verbrauchskurve bestimmt. Die in Kapitel 4.4.1 ermittelte maximale Steigung ( $5,25 \pm 0,5 \text{ \%}\cdot\text{s}^{-1}$ ) wurde bei diesem Versuch nicht erreicht, sie beträgt höchstens  $2,68 \text{ \%}\cdot\text{s}^{-1}$ . Grund hierfür ist, dass nicht alle Messungen bei einem  $pO_2$ -Ausgangswert von 100 %-sat beginnen. Trotz der hohen Rührerdrehzahl und Begasungsrate wurde so viel Sauerstoff durch die enzymatische Reaktion verbraucht, dass der  $pO_2$ -Wert im Reaktor nicht auf 100 % gehalten werden konnte. Folglich war der Sauerstoff in der geschlossenen Messkammer schneller vollständig verbraucht und es standen weniger Messpunkte für die Ermittlung der Steigung zur Verfügung. Deswegen erhöht sich der Fehler der Auswertung und der OUR-Messbereich ist nochmals verringert.

Abbildung 29 B zeigt, dass die aus der Steigung errechneten OUR-Werte des ISICOMs bei hohen Verbrauchsraten deutlich geringer sind als die der Gasmassenbilanzierung. Die dynamisch ermittelte OUR nähert sich dabei einem Maximum von  $22 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  an, um das sie aufgrund der geringen Messpunktanzahl deutlich schwankt. Mit der Gasanalytik werden dagegen OUR Werte bis zu  $181 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  gemessen werden. Bei geringen Verbrauchsraten  $< 7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  zeigen beide Messmethoden vergleichbare Resultate und unterscheiden sich im Mittel um lediglich 1 %. Der Grund für die Abweichung bei hohen Verbrauchsraten ist, neben der geringen Zahl an Messpunkten, das Ansprechverhalten des  $pO_2$ -Sensornpatches im ISICOM. Obwohl ein schnellerer Verbrauch des Sauerstoffs in der Messkammer vorhanden sein sollte, kann keine größere Steigung bzw. Sauerstoffaufnahme gemessen werden. Der Einfluss der in diesem Modellversuch beobachteten Effekte auf die Sensoranwendung zur Bioprozessüberwachung wird in Kapitel 5 untersucht.

#### 4.5 Nutzung des dritten Sensorports zur Messung des pH-Werts

Der ISICOM verfügt über die Möglichkeit, drei Sensoren parallel zu betreiben. Die Sauerstoff- und Trübungssonden sind für die Bestimmung der qOUR zwingend erforderlich. Der dritte Port erlaubt die Nutzung eines weiteren, für die Bioprozessüberwachung geeigneten, optischen Sensors. Wie bereits in Kapitel 3.3 erläutert, soll dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel der pH-Wert Messung mittels Optode gezeigt werden. Da weder die Presens Sensoren noch die Optoden anderer Hersteller offiziell als dampfsterilisierbar vertrieben werden, wird zuerst der Einfluss des Sterilisationsprozesses auf den Sensor untersucht. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Dampfsterilisation ist für den Einsatz des ISICOM im Bioprozess unerlässlich, da der Sensor im Betrieb immer zusammen mit dem Reaktor sterilisiert werden muss.

Für das Experiment ist ein pH-Patch gemäß den Herstellervorgaben im ISICOM eingebaut und kalibriert worden. Danach wurde PBS bei pH 7,4 und 37 °C mit dem ISICOM über 5 Minuten gemessen. Im Anschluss ist das SIP (*steam in place*) Programm gestartet und der Sensor bei 121 °C für 30 Minuten sterilisiert worden. Schließlich wurde der pH-Wert erneut über eine Dauer von 5 Minuten aufgezeichnet. Als Referenz diente bei dem gesamten Experiment ein pH-Glaselektrode.



**Abbildung 30:** Messung des pH-Werts mittels pH-Optode im ISICOM und Referenz Glaselektrode vor und nach der Dampfsterilisation. Die gestrichelte Linie markiert den Sollwert.

In Abbildung 30 sind die Mittelwerte der Messungen vor und nach der Sterilisation dargestellt. Vor der Sterilisation unterscheidet sich der Optoden-Wert um 0,08 pH-Einheiten vom Sollwert. Diese Abweichung liegt innerhalb der Herstellerangaben für vorkalibrierte *Sensorpatches* [102]. Auch nach dem Sterilisationsprozess ist es möglich, den pH-Wert mittels Optode auszulesen. Die Differenz zum Sollwert erhöht sich jedoch auf 0,24 Einheiten. Diese Verschiebung ist auf die durch Dampfsterilisation bedingte Auswaschung des Farbstoffs zurückzuführen [39]. Für den Einsatz im Bioprozess bedeutet dies, dass eine Rekalibration nötig ist, um den pH-Wert basierend auf dieser Messung korrekt zu bestimmen. Abbildung 30 zeigt zudem, dass auch bei dem Einsatz von klassischen elektrochemischen pH-Glaselektroden eine solche Rekalibration nötig ist, weil es ebenfalls zu einer Änderung des Messwertes durch den Sterilisationprozess kommt. Da die Kalibrationsfunktion von pH-Optoden im Gegensatz zu elektrochemischen Sensoren jedoch nicht linear verläuft, müsste die Kalibration mit verschiedenen Puffern bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden (vgl. Anhang 9.3.4). Dies ist aus praktischen Gründen im sterilisierten Reaktor nicht mehr möglich, da in der Regel bereits Kulturmedium eingefüllt ist. Eine einfache Rekalibration des pH-*Sensorpatches* kann daher nicht durchgeführt werden.

#### **4.6 Zusammenfassung der Sensorcharakterisierung**

In diesem Kapitel wurden die Komponenten, Verschluss- und Rührmechanismus, Trübungs- und Sauerstoffsensoren des ISICOMS charakterisiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der dritte Sensorport für die Messung des pH-Werts mittels Optode geeignet ist.

Die Charakterisierung hat gezeigt, dass der entwickelte Sensoraufbau einen sterilen Betrieb im Bioreaktor ermöglicht. Der Verschlussmechanismus ist gasdicht und der Rührer verhindert bei einer Drehzahl von 200 rpm die Sedimentation von Zellen in der Messkammer, ohne die Organismen zu schädigen oder die Trübungsmessung zu beeinflussen.

Der Streulichtsensor ermöglicht die Überwachung der Trübung sowohl bei geschlossener als auch geöffneter Messkammer. Die Messung ist stabil und unabhän-

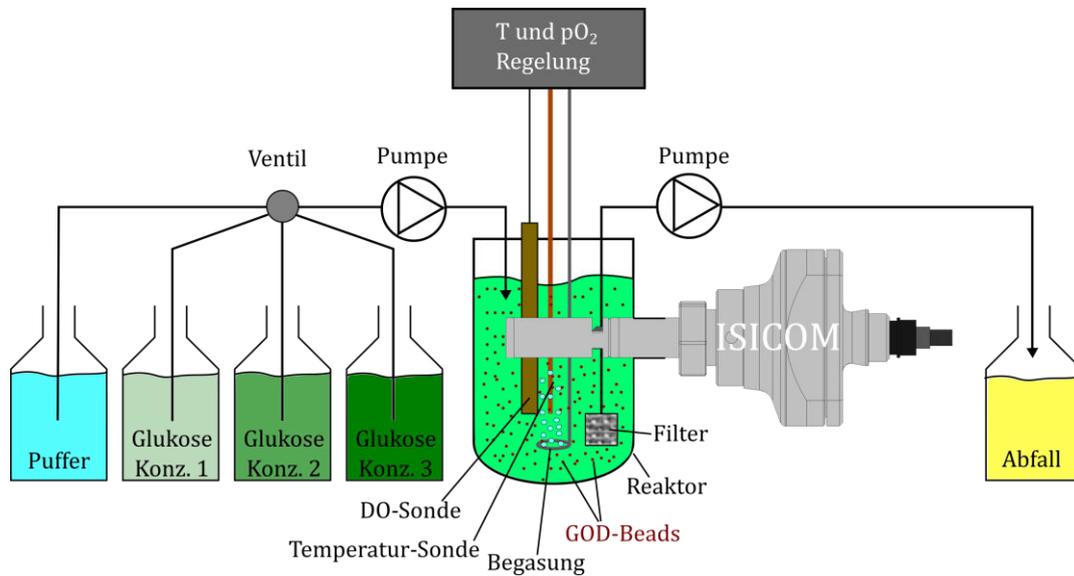
gig von der Temperatur des Kulturmediums. Es zeigt sich allerdings, dass die Edelstahlbauten des ISICOM Reflexionen verursachen, die eine Beeinflussung des Streulichtsignals bei geringen Trübung hervorrufen. Am Beispiel von *E. coli* K1 ist somit eine lineare Kalibration erst ab einer  $OD_{600}$  von 2,58 möglich. Messungen bei geringerer Trübung benötigen daher komplexere Modelle wie z.B. künstliche neuronale Netze oder multi-lineare-Regression. Die Schwärzung der Kammer mit TiAl kann diesen Effekt etwas reduzieren, jedoch aufgrund der ungleichmäßigen TiAl-Schicht nicht aufheben. Eine mögliche Verbesserung der Trübungsmessung mittels ISICOM ist die Ergänzung von optischen Bauteilen am Lichtleiter oder der Messkammer. So könnte zum Beispiel ein Spiegel an der Kammerrückwand dazu dienen, das Licht gezielt zurück zum Detektor zu führen, um so die bislang undefinierte Reflexion besser zu charakterisieren und ggf. zur Signalauswertung zu nutzen. Der Strahlengang des einstrahlenden und gestreuten Lichts ließe sich alternativ durch Linsen auf einen definierten Punkt innerhalb der Messzone fokussieren [103], damit Störeinflüsse durch die Sensorkammer minimiert werden. Winkelprismen könnten hingegen das eingestrahlte und gestreute Licht so ablenken, dass es anstatt in die Messkammer störungsfrei in die Kulturbrühe des Reaktors strahlt. In diesem Fall wäre allerdings keine Messung bei geschlossener Kammer möglich. Die Optik muss bei allen Optionen immer vom optischen Fenster entkoppelbar sein, damit weiterhin günstigere, weniger hitzebeständige Bauteile verwendet werden können. Auch eine geänderte Position des Lichtleiters im Sensorkopf könnte zu einer Reduktion der Reflexion führen, da dies die Pfadlänge des Lichts verändert, das auf die Kammerwände trifft. Ein weiterer Optimierungsansatz ist eine variable Lichtintensität der einstrahlenden LED. Durch niedrige Intensität bei geringen Trübungen und adaptiver Steigerung mit zunehmender Partikelzahl könnte nur jeweils so viel Licht eingestrahlt werden, dass gerade keine Beeinflussung durch die Kammer auftritt. Sollte keiner dieser Ansätze erfolgreich sein, ist auch die Adaption und Integration eines spektroskopischen Fluoreszenz-[104], NIR-[105] oder Raman-[106] Sensors in den ISICOM anstatt einer Streulichtoptode denkbar.

Der Sauerstoffpatch des ISICOMS ermöglicht die Messung der OUR nach der dynamischen Methode. Die Messung des  $pO_2$ -Werts ist über die übliche Prozessdauer stabil und die Temperaturabhängigkeit softwareseitig kompensiert. Durch einen

optimierten Algorithmus zur Auswertung der  $pO_2$ -Kurven bei Sauerstoffverbrauch können Steigungen bis zu  $-5,25 \pm 0,5 \text{ \%}\cdot\text{s}^{-1}$  ermittelt werden, was deutlich über dem Ergebnis der Referenz-Clark-Elektrode liegt. Trotzdem können schnellere Steigungen und damit schnellere Sauerstoffverbrauchsraten nicht gemessen werden. Dies wurde durch einen Test des ISICOMs an einem dynamischen System basierend auf Glukoseoxidase weiter untersucht. Mit Hilfe des Modellsystems konnten verschiedene OUR-Werte herbeigeführt und vergleichend mit dem ISICOM und der Gasmassebilanzierung ausgewertet werden. Für Verbrauchsraten bis  $7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  zeigten beide Messungen vergleichbare Ergebnisse. Bei höheren Raten lagen die Resultate der beiden Messungen bis zu 89 % auseinander. Da bei hohen OUR-Werten der Start- $pO_2$ -Wert von 100 %-sat bei Beginn der jeweiligen Messung nicht erreicht werden konnte, standen nur wenige Messpunkte zur Auswertung zur Verfügung, wodurch sich der Messbereich im dynamischen Modellsystem nochmals reduzierte. Größere Sauerstoffaufnahmeleistungen als  $22 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  konnten mit dem ISICOM daher nicht gemessen werden. Dies gilt es bei einem Einsatz im Bioprozess zu berücksichtigen, falls mit hohen Sauerstoffverbrauchsraten gerechnet wird und ein geringer  $pO_2$ -Wert zu Beginn der OUR-Messungen zu erwarten ist.

Um höhere Sauerstoffaufnahmeleistungen bestimmen zu können, sind Verbesserungen des Ansprechverhaltens der  $pO_2$ -Sensorpatches nötig. Dazu kann zum einen die Abtastrate des Sensors von Seiten des Herstellers erhöht werden, wodurch auch bei niedrigen  $pO_2$ -Ausgangskonzentration mehr Messpunkte zur Bestimmung der Steigung zur Verfügung stünden. Zum anderen können das Sensorlayout sowie Handling modifiziert werden. Die Sensorpatches werden bislang mit Silikonkleber auf dem optischen Fenster des ISICOMs montiert. Trotz größter Sorgfalt ist nicht ausgeschlossen, dass die Silikonschicht eine unterschiedliche Dicke aufweist oder Spuren des Klebstoffs auf der medienberührenden Seite des Sensors verbleiben. Die Silikonschicht ist zwar sauerstoffdurchlässig, wirkt aber diffusionslimitierend und kann das Ansprechverhalten des Sensors negativ beeinflussen. Ein modifiziertes Layout hinsichtlich kürzerer Ansprechzeiten und reproduzierbarer Montage ist in Zusammenarbeit mit dem Hersteller daher anzustreben.

Sobald der Sensor entsprechend verbessert ist, kann eine erweiterte Charakterisierung durchgeführt werden. Dafür ist ein Teststand zu entwickeln, mit dem definierte Sauerstoffverbrauchsraten unter verschiedensten  $O_2$ -Sättigungsgeraden reproduzierbar herbeiführbar sind. Ein Beispiel für einen möglichen Aufbau gibt Abbildung 31.



**Abbildung 31:** Vorschlag eines möglichen Teststandes für ein Modellsystem zur Herbeiführung definierter OUR bei verschiedenen Sauerstoffsättigungen.

Auf einem Trägermaterial in Form von *Beads* (z.B. aus Calciumalginat [107, 108]) befindet sich immobilisierte Glukoseoxidase in einem Testreaktor. Der Reaktor ist mit einer Pufferlösung gefüllt und die Temperatur sowie der Sauerstoffpartialdruck werden mittels einer Prozessregelung konstant auf dem gewünschten Niveau gehalten. Die Pumpen fördern eine Pufferlösung kontinuierlich durch den Reaktor. Durch Schalten eines Ventils können anstatt des Puffers jeweils unterschiedlich konzentrierte Glukoselösungen durch den Reaktor gepumpt werden. Ein Filter am Reaktorausgang verhindert das Ausspülen der *Beads*, sodass die Enzymkonzentration im Reaktor konstant bleibt. Sobald sich jeweils eine konstante Glukosekonzentration im Reaktor eingestellt hat, verursacht diese aufgrund der Enzymkinetik eine andere, aber definierte Sauerstoffverbrauchsrate. Der ISICOM ist im Reaktor installiert und misst regelmäßig durch Schließen der Kammer die OUR, die durch die eingeschlossenen *GOD-Beads* verursacht wird. Entscheidend bei diesem Aufbau ist,

dass ein Auswaschen des Enzyms aus den *Beads* minimiert und die Aktivität stabilisiert wird. Nur so können reproduzierbare Messergebnisse erhalten werden.

Der optionale dritte Sensorport des ISICOMs eignet sich prinzipiell zur Messung des pH-Werts via Optode. Obwohl die Sonden offiziell nicht als dampfsterilisierbar vertrieben werden, überstehen sie eine einmalige Behandlung. Die Prozedur führt jedoch zu einer Verschiebung des Signals, das aufgrund der komplexen Kalibrationsroutine nicht ohne weiteres zu korrigieren ist. Eine Möglichkeit hierzu wäre ein Verfahren, wie es auch bei der  $\gamma$ -Sterilisation der *Patches* üblich ist. Dafür wird jeweils eine komplette Charge bestrahlt und im Anschluss anhand einiger weniger Sensoren kalibriert. Da alle *Patches* aus der Charge derselben Behandlung unterzogen wurden, sind die Kalibrationsdaten auf alle anderen übertragbar. Die Ermittlung solcher Kalibrationsdaten nach einer Dampfsterilisation für eine gesamte Charge könnte die Verwendbarkeit der pH-Optoden im ISICOM entscheidend verbessern. Dennoch sind in der aktuellen Konfiguration eventuell relative pH-*Shifts* in der geschlossenen Kammer messbar.

Die Charakterisierung der einzelnen Komponenten zeigt, dass der ISICOM für den Einsatz im Bioprozess geeignet ist. Inwiefern der Sensor zur Bestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme von verschiedenen Mikroorganismen genutzt werden kann, wird durch die folgenden Experimente in Bioprozessen gezeigt.

## 5. Anwendung zur Bioprozessüberwachung

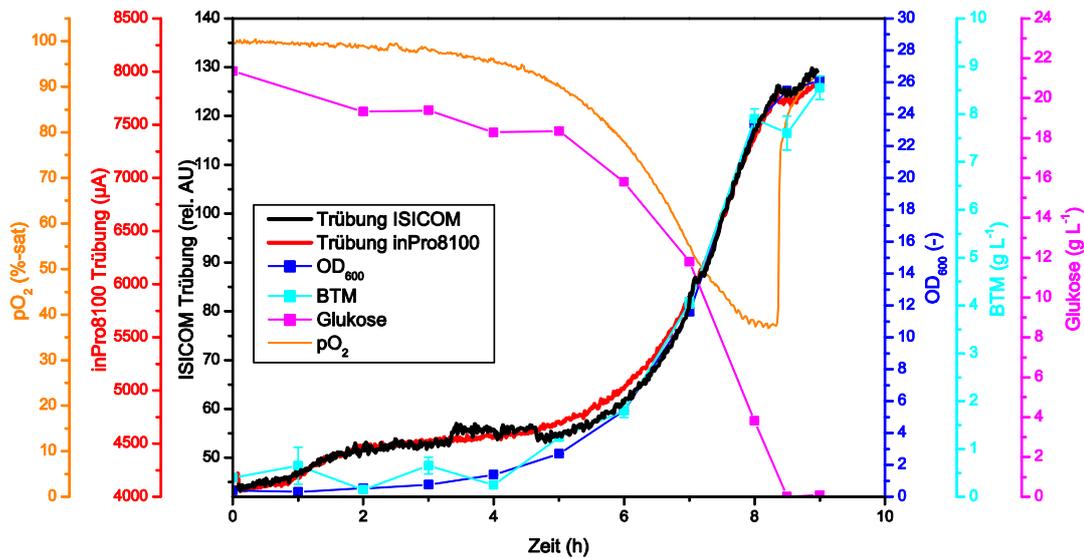
Nach der Charakterisierung des ISICOMs wurde der Sensor an biotechnisch relevanten Modellprozessen erprobt. Es wurden Kultivierungen von *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* sowie CHO Zellen durchgeführt und die Einsatzfähigkeit des Kombi-Sensors für die Überwachung der spezifischen Sauerstoffaufnahme überprüft. Der *E. coli* Prozess weist eine einfache Prozessführung mit konstanter Begasung sowie Rührung auf, wobei durch die Zellen relativ hohe Sauerstoffverbrauchsraten erzielt werden. *P. pastoris* erzielt im Bioprozess sehr hohe Biomasse, und CHO Zellen zeichnen sich im Vergleich zu den mikrobiellen Organismen durch deutlich geringere Sauerstoffverbrauchsraten sowie ein schwaches Streulichtverhalten aus. Die verwendeten Messparameter, Einstellung und Datenverarbeitung des ISICOM sind in Kapitel 9.2.1 aufgeführt.

### 5.1 *Batch*-Kultivierung von *E. coli* K1 zur Produktion von Polysialinsäure

Der ISICOM wurde an *E. coli* K1 in einem *Batch*-Prozess zur Produktion von humanidentischer Polysialinsäure (polySia) getestet [109, 110]. Hierbei wurden über die gesamte Kultivierung die Parameter Rührerdrehzahl und Begasungsrate konstant gehalten. Da diese Parameter auf das Trübungssignal Einfluss nehmen, ist dies für die anschließend vergleichende Analytik der Trübungs- und OUR-Messung von Vorteil (siehe Anhang 9.3.5). Während der Kultivierung wurden regelmäßig *offline* Proben entnommen und die optische Dichte, Biotrockenmasse sowie die Glukosekonzentration bestimmt. Darüber hinaus wurden die während der Kultivierung entstandenen Streulichtsignale mit einer kommerziell erhältlichen Trübungssonde (in-Pro 8100, *Mettler-Toledo GmbH*, Gießen) verglichen. Diese diente im weiteren Verlauf als Referenzmessung.

### 5.1.1 Kalibration der Trübungssonde

In der ersten Kultivierung wurde die Trübungsmessung ausschließlich mit geöffneter Kammer durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zur Referenzmessung zu erhöhen. Ziel war es, die  $OD_{600}$  für *E. coli* K1 Kultivierungen aus dem Trübungssignal des ISICOM zu ermitteln. Der Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 32 dargestellt.



**Abbildung 32:** Zeitlicher Verlauf der Trübungsmessung von ISICOM und Referenzsonde während der Kultivierung von *E. coli* K1. Zusätzlich ist der Verlauf der Gelös-Sauerstoffkonzentration, Glukosekonzentration,  $OD_{600}$  sowie der BTM dargestellt.

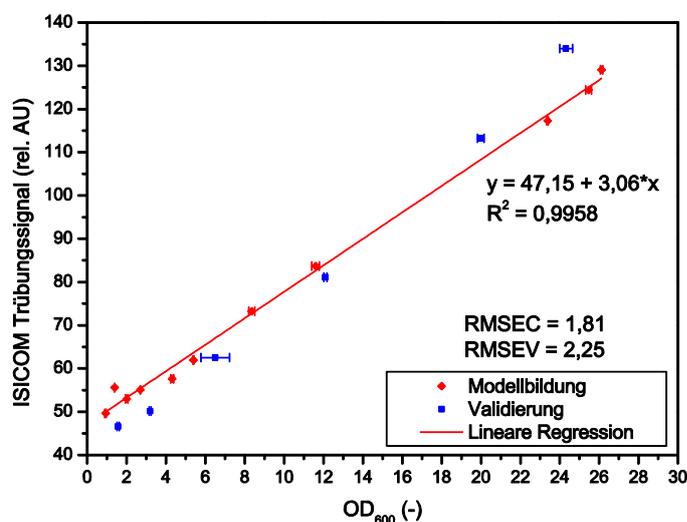
Nach einer einstündigen lag-Phase gehen die Zellen für ca. sieben Stunden in die exponentielle Wachstumsphase über, bis die Glukose im Medium nach weiteren dreieinhalb Stunden verbraucht ist. Dieser Verlauf korreliert mit der  $pO_2$ -Konzentration, die während der Kultivierung analog zum Zellwachstum von 100 %-sat bis auf 35 %-sat sinkt. Ein sprunghafter Anstieg auf 100 %-sat ist nach Verbrauch der Glukose zu beobachten. Anschließend gehen die Zellen in die stationäre Phase über und der Prozess wird beendet.

Die unterschiedlichen Wachstumsphasen der Zellen lassen sich über die Trübungsmessung sowohl mit dem ISICOM als auch mit der Referenzmessung sehr gut *online* überwachen. Das Trübungssignal korreliert mit der  $OD_{600}$  und somit mit dem Zellwachstum. Ein Vergleich der beiden Sonden zeigt, dass ihre Verläufe nahezu identisch sind. Die absoluten Werte unterscheiden sich nur aufgrund der Einheiten

der Sensorelektronik (rel. AU zu  $\mu\text{A}$ ). Die beiden Sprünge im Signal des ISICOM zwischen dreieinhalb und viereinhalb Stunden sind auf eine Gasblase zurückzuführen, die sich vor der Optik festgesetzt hatte.

Während dieser Kultivierung kann keine Beeinflussung des Trübungssignals durch Reflexion für geringe optische Dichten beobachtet werden. Bedingt durch die hohe Rührerdrehzahl und Begasungsrate in dem Prozess, befinden sich von Anfang an sehr viele Streuzentren bzw. Luftblasen im Medium, sodass das Messsignal schon zu Beginn zwischen 40 und 50 rel. AU bzw. im Bereich des reinen Streulichts liegt (vgl. Abbildung 23 und Abbildung 24). Die Reflexionen in der Messkammer des ISICOMs können daher bei der Kalibration dieses *E. coli* K1 Prozesses vernachlässigt werden.

Aus den Daten von zwei Kultivierungen wurde eine lineare Regression der Trübung für den polySia Prozess erstellt. Die Daten einer dritten Kultivierung standen für die Modellvalidierung zur Verfügung. Abbildung 33 zeigt das Ergebnis der Kalibration und Validierung für die  $\text{OD}_{600}$ .



**Abbildung 33:** Kalibration und Validierung des Streulichtsignals von *E. coli* K1 auf die  $\text{OD}_{600}$ .

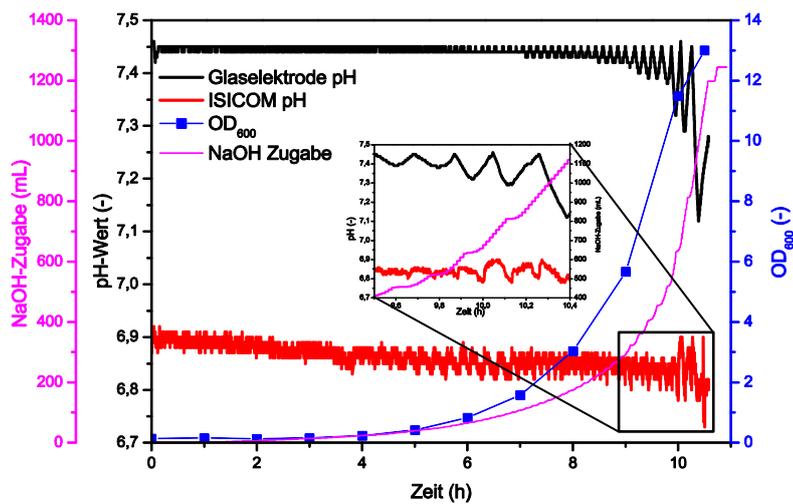
Der Zusammenhang zwischen der gemessenen Trübung und der optischen Dichte wird durch ein lineares Regressionsmodell gut beschrieben. Das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) und der RMSEC (*root mean square error of calibration*) dient zur Beurteilung

der Güte der Anpassung und ergibt mit  $R^2 = 0,9958$  bzw.  $RMSEC = 1,81$  eine gute Modellgüte für die  $OD_{600}$ . Abbildung 33 zeigt aber auch, dass das Modell für den Validierungsdatensatz bei niedrigen optischen Dichten zu hohe und bei großen optischen Dichten zu niedrige Werte ergibt. Daher ist der mittlere quadratische Fehler der Validierung (*root mean square error of validation*, RMSEV) mit 2,25 höher als der der Kalibrierung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die ISICOM-Trübungssonde für die Bestimmung der optischen Dichte von *E. coli* K1 im geöffneten Zustand sehr gut nutzen lässt. Der Verlauf der Trübungsdaten stimmt mit denen einer Referenzsonde überein. Bei Prozessen, die aufgrund von hohen Begasungsraten und Rührerdrehzahlen bereits ein relativ großes Trübungsbasisignal erzeugen, sind die in Kapitel 4.3 beobachteten reflexionsbedingten Störungen nicht messbar. Für solche Prozesse wurde ein lineares Kalibrationsmodell für optische Dichten zwischen 0,95 und 28 aufgestellt.

#### 5.1.2 Messung des pH-Werts

Im Rahmen der Sensorcharakterisierung wurde gezeigt, dass der Multisensorport des ISICOM prinzipiell zur Nutzung einer pH-Optode geeignet ist. Zum Test einer solchen Optode im Bioprozess wurde der pH-Wert während einer *E. coli* K1 Kultivierung simultan mit einer klassischen, elektrochemischen Glaselektrode (Referenz) und dem ISICOM aufgezeichnet. Die Kultivierungsbedingungen entsprachen denen aus Kapitel 5.1. Vor Prozessbeginn wurde der Reaktor mit den Sonden dampfsterilisiert und die Referenzelektrode anschließend rekaliibriert. Abbildung 34 zeigt neben der  $OD_{600}$  auch die NaOH-Zugabe sowie die pH-Wert Messungen beider Sonden über die Kultivierungsdauer.



**Abbildung 34:** Zeitlicher Verlauf der pH-Wert Messung mittels Optode und Referenz-Glaselektrode während einer *E. coli* K1 Kultivierung. Zusätzlich ist die NaOH-Zugabe und die  $OD_{600}$  aufgetragen.

Durch regelmäßige, pulsartige Zugabe von Base (NaOH) wird der pH-Wert basierend auf der Messung der Referenzelektrode auf dem Sollwert gehalten und verläuft während der ersten fünf Stunden im Mittel bei 7,46. In der exponentiellen Wachstumsphase produzieren die Zellen deutlich mehr Acetat und das Volumen der zugegebenen Base steigt dementsprechend exponentiell an, um den pH-Wert konstant zu halten. Die Zugabepulse sind gut im Verlauf der pH-Wertmessungen zu erkennen und noch einmal vergrößert innerhalb des Diagramms dargestellt.

Die Optode liefert nach der Dampfsterilisation des Reaktors pH-Messwerte mit einer Abweichung von 0,6 Einheiten zu der Referenzmessung. Über die Kultivierungszeit von 10 Stunden ist zudem ein *Drift* der optischen pH-Messung von 6,9 auf 6,83 zu bemerken. Dass die Optode nach dem Sterilisationsprozess im Kulturmedium nicht zur fehlerfreien pH-Messung genutzt werden kann, wurde schon in Kapitel 4.5 beschrieben. Der *Drift* ist eine neue Beobachtung. Auffällig ist außerdem, dass die Referenzelektrode stärker auf die Zugabepulse mit pH-Wertschwankungen reagiert als der optische Sensor.

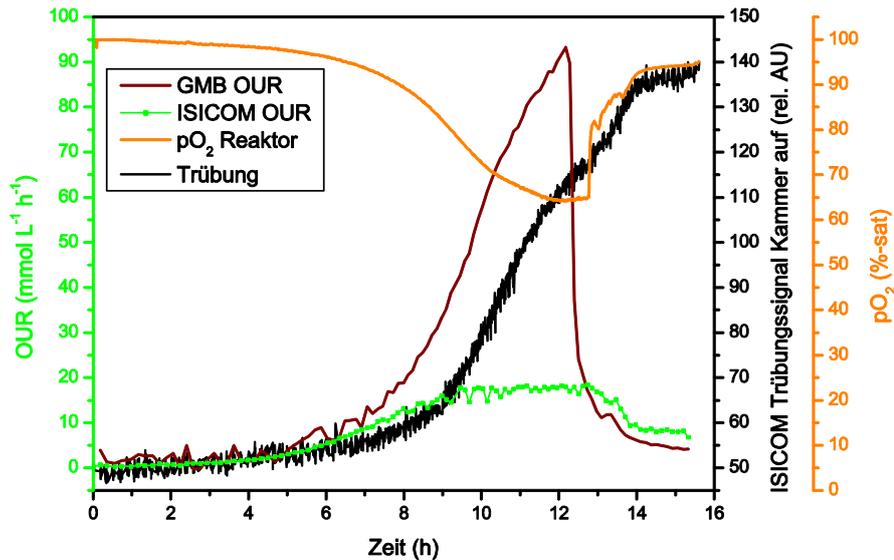
Diese geringere Sensitivität des optischen Sensors wird durch das sterilisationsbedingte Auswaschen des pH-Indikatorfarbstoffs aus dem *Sensorpatch* verursacht.

Die regelmäßige Illumination führt außerdem zu dem *Bleaching*-Effekt des Farbstoffs und erklärt somit auch die *Drift*, welche besonders bei längeren Prozessen zu berücksichtigen ist.

Folglich ist der Multisensorport für die pH-Wertmessung in Bioprocessoren in seinem aktuellen Zustand, und unter Verwendung der getesteten Optode noch nicht zuverlässig einsetzbar. Zur Behebung der beobachteten Ungenauigkeiten müssten verbesserte *Sensorpatches* verwendet werden, die ein Auswaschen des pH-Indikators minimieren und gleichzeitig eine vereinfachte Rekalibrationsroutine aufweisen (bzw. Kalibrierdaten für dampfsterilisierbare *Patches* liefern, siehe Kapitel 4.5).

### 5.1.3 Bestimmung der Sauerstoffaufnahme

Die Messung der Sauerstoffaufnahme stellt den wesentlichen Anwendungsbereich des Sensors dar. Ob dies in *E. coli* Prozessen mittels ISICOM möglich ist, wird anhand von einer 10 L *E. coli* K1 Kultivierung ermittelt. Da der Vorversuch aus Kapitel 4.4.1 gezeigt hat, dass es bei hohen Verbrauchsdaten zu einer Limitierung in der OUR-Messung mittels dynamischer Methode kommt, wurde die Prozessstemperatur auf 30 °C reduziert. Dadurch sollte das Zellwachstum und somit auch die Sauerstoffverbrauchsrate etwas reduziert werden, um für die dynamische Bestimmung der OUR über den ISICOM in einem geeigneten Messbereich zu liegen. Als Referenz diente die Gasmassenbilanzierung (GMB) mit dem Abgassensor BlueInOne Ferm (BlueSens gas sensor GmbH, Herten). In Abbildung 35 ist die berechnete OUR beider Messmethoden über die Kultivierungszeit aufgetragen. Zusätzlich ist sowohl der  $pO_2$ -Wert im Reaktor als auch die Trübung bei geöffneter Kammer über die Zeit aufgetragen. Sie dient zur Beurteilung des Zellwachstums.



**Abbildung 35:** Zeitlicher Verlauf der OUR-Messung mittels ISICOM und GMB sowie Trübungs- und  $pO_2$ -Verlauf während einer *E. coli* K1 Kultivierung.

Es wird deutlich, dass sich die OUR-Messergebnisse auch in diesem Versuch bei hohen Sauerstoffverbrauchsraten, trotz Reduktion der Prozesstemperatur, stark voneinander unterscheiden. Während der ersten sieben Stunden ähneln sich die OUR-Werte, die der GMB schwanken jedoch aufgrund der geringen Konzentrationsunterschiede in Zu- und Abluft stark. Im Anschluss steigt die mittels GMB errechnete OUR exponentiell an und erreicht ein Maximum von etwa  $90 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  nach zwölfteinhalb Stunden. Die mit dem ISICOM ermittelte OUR steigt jedoch deutlich schwächer und erreicht bereits nach neun Stunden ein Plateau bei etwa  $18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Ab diesem Zeitpunkt schwankt sie um den Maximalwert. Nach zwölfteinhalb Stunden fallen beide Kurven ab, da die Glukose im Medium verbraucht ist (erkennbar am plötzlichen  $pO_2$ -Anstieg). Der Grund für den großen Unterschied der Messungen liegt im Ansprechverhalten des Sauerstoffpatches, das in Kapitel 4.4.1 und 4.4.4 bereits ausführlich beschrieben wurde. Bei hohen Verbrauchsraten fällt die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer schneller, als dies über den Sensor gemessen werden kann. Die maximal ermittelte OUR des ISICOMs liegt daher in der Größenordnung, die in Kapitel 4.4.4 im Rahmen der Sensorcharakterisierung beschrieben wurde.

Der ISICOM ist somit nur bedingt zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme während dieses *E. coli* K1 *Batch*-Prozesses geeignet. Es besteht dringender Optimierungsbedarf an der Sauerstoffoptode, damit durch schnellere Ansprechzeiten und Messintervalle in Zukunft auch mikrobielle Bioprozesse mit hohem Sauerstoffverbrauch mit dem Sensor überwachbar sind.

#### 5.1.4 Zusammenfassung der Bioprozessüberwachung von *E. coli* K1

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse der Sensoranwendung von der Trübungssonde, der pH-Optode und der Messung der Sauerstoffaufnahme mit dem ISICOM anhand einer *E. coli* K1 *Batch*-Kultivierung im 10L Maßstab vorgestellt.

Die Trübungsmessungen bei geöffneter Sensorkammer ergaben eine sehr gute Übereinstimmung von ISICOM und Referenzmessungen. Wie bereits bei der Sensorcharakterisierung beobachtet, konnte auch für die Kalibration ein linearer Zusammenhang zwischen Trübungssignal bei geöffneter Sensorkammer und optischer Dichte angenommen werden. Die reflexionsbedingten Störungen des Trübungssignals bei geringen Trübungen spielen bei diesem Prozess keine Rolle, da dieser Effekt durch die hohe Rührerdrehzahl und Begasungsrate nicht messbar ist. Wenn die Kammer während der OUR-Messung geschlossen ist, werden die Trübungsdaten nicht ausgewertet. Da dies lediglich einen kurzen Zeitraum von maximal 5 Minuten, bzw. im exponentiellen Wachstum weniger als 1 Minute betrifft, können die Werte problemlos interpoliert werden.

Der Einsatz einer pH-Optode innerhalb des ISICOMs ist unter den gegebenen Bedingungen nicht sinnvoll. Prinzipiell sind zwar pH-Wertänderungen messbar, doch ein Vergleich mit der Referenzsonde zeigt, dass es bedingt durch das Auswaschen des Indikatorfarbstoffs während der Dampfsterilisation zu deutlichen Abweichungen in den Messergebnissen kommt. Dennoch hat dieses Experiment gezeigt, dass der dritte Port des ISICOMs für weitere optische Sensoren genutzt werden kann, ohne weitere Reaktorzugänge zu belegen.

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme mit dem ISICOM ist während der *E. coli* K1 Kultivierung möglich. Die verwendeten  $pO_2$ -Optoden haben jedoch ein zu langsames Ansprechverhalten, um bei hohen Verbrauchsrate über  $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

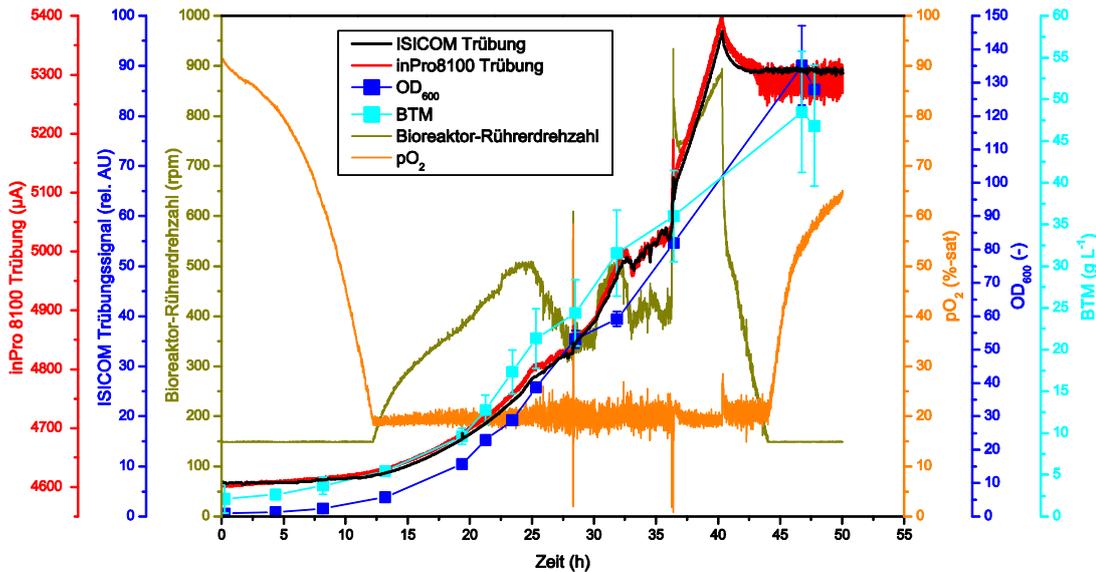
eine verlässliche Bestimmung der Steigung und somit OUR zu ermöglichen. Ein Vergleich mit der Gasmassenbilanzierung als Referenzmessung macht deutlich, dass mit der Abgasanalytik bis zu sechsfach höhere Sauerstoffaufnahmeleistungen ermittelt werden. Bei geringem Sauerstoffverbrauch ist der ISICOMs dagegen von Vorteil, da die  $pO_2$ -Unterschiede in Zu- und Abluft in dem Fall sehr gering sind und der Messwert der Gasanalytik, im Gegensatz zum ISICOM-Messwert, stark schwankt.

### **5.2 Batch-Kultivierung von *P. pastoris* zur Erzeugung hoher Biomasse**

*Pichia pastoris* ist ein in der Biotechnologie weit verbreiteter Mikroorganismus, der in *Batch*-Kultivierungen sehr hohe Zelldichten und damit  $OD_{600}$  bzw. BTM-Werte erreicht. Daher sollte insbesondere die Trübungssonde des ISICOM anhand eines *P. pastoris* Prozesses getestet werden.

#### 5.2.1 Kalibration der Trübungssonde

Für die Kalibration der Streulichtsignale auf die  $OD_{600}$  und Biotrockenmasse wurde das Signal im geöffneten Zustand ausgewertet, um Reflexionen der Messkammer möglichst gering zu halten. Als Referenz wurde das Streulicht mit einer kommerziell erhältlichen Trübungssonde (inPro 8100) parallel aufgezeichnet. Abbildung 36 stellt den zeitlichen Verlauf der beiden Trübungsmessungen,  $pO_2$ -Wert und Rührerdrehzahl dar.



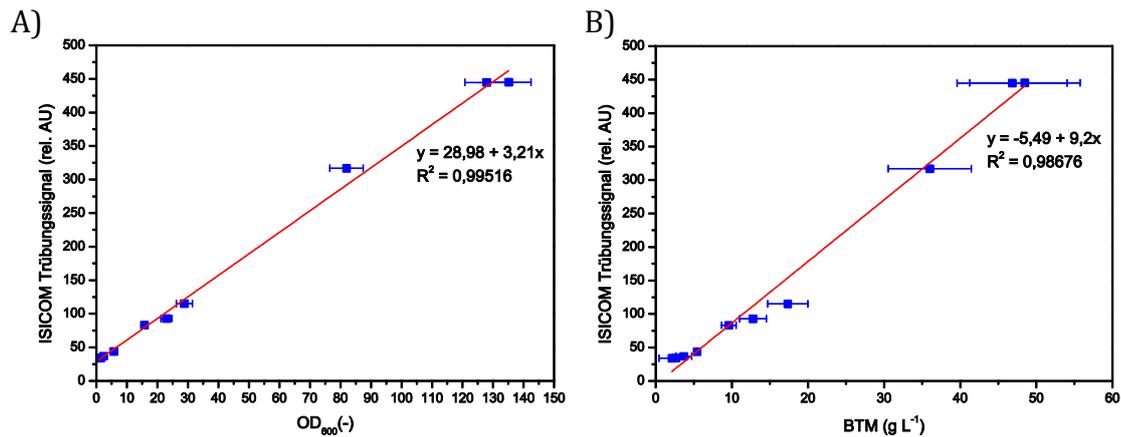
**Abbildung 36:** Zeitlicher Verlauf der Trübungsmessung von ISICOM und Referenzsonde während der Kultivierung von *P. pastoris* im 10L Maßstab. Zusätzlich ist der Verlauf der Gelöst-Sauerstoffkonzentration,  $OD_{600}$  und BTM aufgetragen.

Nach einer zwölfstündigen lag-Phase gehen die Zellen in die exponentielle Wachstumsphase über. Während dieser Zeit sinkt der  $pO_2$ -Wert von 100 %-sat auf 20 %-sat ab. Im Anschluss steigt die Reaktorrührerdrehzahl zur Regelung der Gelöst-Sauerstoffkonzentration von 150 auf ca. 500 rpm an. Bedingt durch eine starke Schaumbildung kommt es zwischen 24 und 36 Stunden zu Störungen der Rührerdrehzahl-gesteuerten  $pO_2$ -Regelung. Die Drehzahl schwankt stark, was sich direkt auf die Trübungsmessung auswirkt, da die Schaumbläschen in der Kulturbrühe die Messung beeinflussen. Dieser Effekt konnte erst durch die Zugabe von Antischaummittel nach 36 Stunden behoben werden. Nach 40,5 Stunden erreicht die Kultur die stationäre Phase und stellte das Wachstum bei einer  $OD_{600}$  von 135 bzw. BTM von  $48,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ein. Zu diesem Zeitpunkt sinkt der Sauerstoffbedarf stark ab und die Rührerdrehzahl fällt zurück auf den eingestellten Minimalwert von 150 rpm. Dieser Abfall spiegelt sich in der Abnahme des Trübungssignals wider.

Der Verlauf beider Trübungsmessungen zeigt eine gute Übereinstimmung von ISICOM und Referenzsonde. Ein Vergleich der Trübung mit den  $OD_{600}$  und BTM Messungen verdeutlicht, dass sich die Wachstumsphasen der Kultur gut im Trübungs-

signal widerspiegeln. Reflexionsbedingte Störungen des ISICOM-Signals bei geringen optischen Dichten lassen sich auch in dieser Kultivierung nicht erkennen. Die Basistrübung liegt bereits so hoch, dass die Reflexionen der Messkammer nicht von Relevanz sind.

Das Ergebnis der Kalibration für  $OD_{600}$  und BTM zeigt Abbildung 37. Die Messwerte, die während der Schaumbildung aufgenommen wurden, sind dabei nicht berücksichtigt.

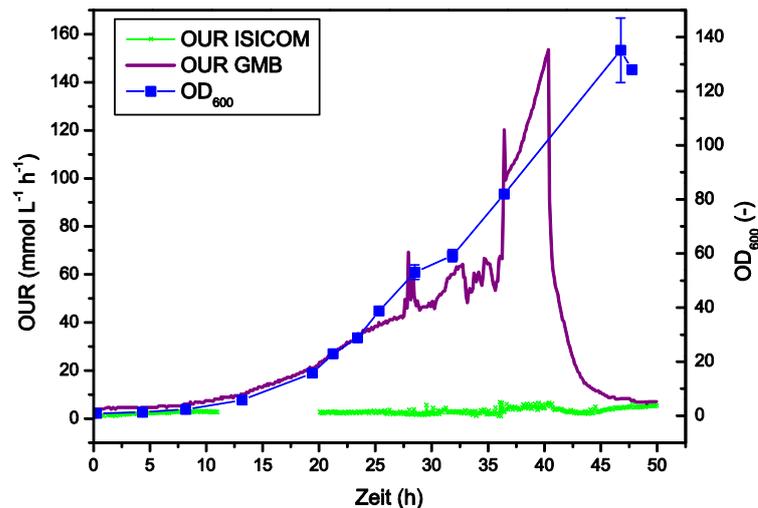


**Abbildung 37:** (A) Kalibration des Streulichtsignals von *P. pastoris* gegen (A)  $OD_{600}$  und (B) BTM auf Basis eines Prozesses bei geöffneter Sensorkammer. Die Güte der Regression wird durch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  beschrieben.

Die Kalibrationen weisen einen linearen Zusammenhang zwischen optischer Dichte bzw. Biotrockenmasse und Trübungssignal auf ( $R^2 = 0,99516$  bzw.  $0,98676$ ). Zur Validierung des Kalibrationsmodells müsste die Kultivierung mehrfach wiederholt werden. Dennoch zeigt dieses Experiment, dass der ISICOM-Trübungssensor generell gut für Prozesse geeignet ist, bei denen hohe Biomassen (bis zu  $48,5 g \cdot L^{-1}$ ) bzw. optische Dichten (bis zu 135) erreicht werden.

### 5.2.2 Bestimmung der Sauerstoffaufnahme

Während der *P. pastoris* Kultivierung wurde neben der Trübung auch die OUR mittels ISICOM und der Gasmassenbilanzierung via BlueInOne Ferm aufgezeichnet. Abbildung 38 zeigt den zeitlichen Verlauf.



**Abbildung 38:** Zeitlicher Verlauf der OUR-Messung mittels ISICOM und GMB sowie OD<sub>600</sub>-Verlauf während der *P. pastoris* Kultivierung. Zwischen Stunde 11 und 19 kam es zu einer technischen Störung des Sensors und die Daten konnten nicht ausgewertet werden.

Die OUR der GMB korreliert mit dem exponentiellen Zellwachstum und erreicht nach etwa 40 Stunden ein Maximum von  $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Sobald die Zellen in die stationäre Phase übergehen, sinkt der Sauerstoffverbrauch deutlich ab. Die großen Messwertschwankungen zwischen Stunde 24 und 36 sind auf die beschriebene Schaumbildung und einen damit verbundenen verstopften Abluftfilter zurückzuführen. Die mittels ISICOM gemessene OUR liegt während der gesamten Kultivierung weit unter dem Ergebnis der Gasmassenbilanzierung.

Dieses Resultat deckt sich mit den Beobachtungen der Sensorcharakterisierung und dem *E. coli* K1 Prozess. Der Grund hierfür ist das Ansprechverhalten der pO<sub>2</sub>-Sensorpatches, welches nicht schnell genug ist, um hohe Verbrauchsdaten erfassen zu können. Bei diesem Prozess kommt außerdem noch hinzu, dass der pO<sub>2</sub>-Wert im Reaktor auf lediglich 20 %-sat geregelt wurde. Damit standen zur Auswertung des Sauerstoffkonzentrationsabfalls nur sehr wenige Messpunkte zur Verfügung, bevor die Messkammer des ISICOMs wieder geöffnet wurde.

### 5.2.3 Zusammenfassung der Bioprozessüberwachung von *Pichia pastoris*

In diesem Kapitel wurden die Versuchsergebnisse der Trübungssonde und die OUR-Bestimmung mit dem ISICOM anhand eines *P. pastoris* Prozesses präsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass mittels der Trübungsmessungen bei geöffneter Sensor-kammer optische Dichten von bis zu 135 und Biotrockenmassen von  $48,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  er-mittelt werden können. Der Verlauf des Trübungssignals stimmt darüber hinaus mit dem der Referenzmessung überein. Die reflexionsbedingten Störungen durch die Messkammer des ISICOMs bei geringen Trübungen spielen auch hier keine Rolle und es kann ein linearer Zusammenhang zwischen Streulichtsignal und optischer Dichte bzw. Biotrockenmasse ermittelt werden.

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme während des Prozesses ist mit dem ISICOM nur eingeschränkt möglich. Dies liegt daran, dass die OUR bedingt durch die hohe Zelldichte frühzeitig im Prozess sehr hoch ansteigt. Dadurch reicht die An-sprechzeit des  $\text{pO}_2$ -Sensors nicht aus, um den realen Abfall der Sauerstoffkonzentration in der Kammer zu beschreiben. Dieses Ergebnis bestätigt sowohl die Be-obachtung aus der Sensorcharakterisierung als auch die der Bioprozessüberwa-chung von *E. coli* K1.

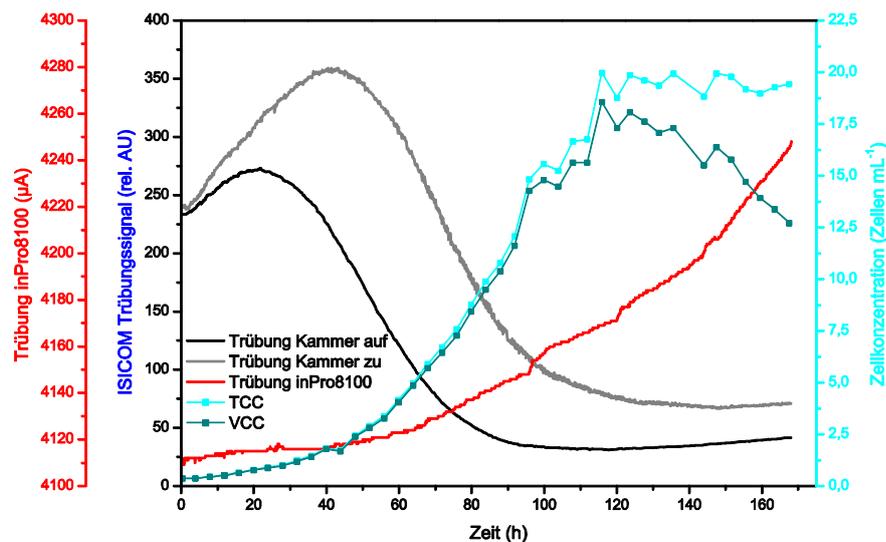
## 5.3 *Batch*-Kultivierung von CHO K1

Die Anwendung des ISICOMs in *Batch*-Kultivierungen von *E. coli* K1 und *P. pastoris* hat gezeigt, dass mikrobielle Bioprozesse hinsichtlich der Trübungsmessung sehr gut zu überwachen sind. Bei der Messung der Sauerstoffaufnahme konnte der ISICOM dabei jedoch keine verlässlichen Resultate liefern. Daher sollte der Sensor anhand eines Säugerzellprozesses mit CHO K1 Zellen im *Batch*-Betrieb getestet wer-den. Säugerzellen erreichen sehr viel geringere Zellkonzentrationen und daraus re-sultierend deutlich niedrigere Sauerstoffverbrauchsraten. Diese sollten mit dem ISICOM besser zu erfassen sein.

### 5.3.1 Kalibration der Trübungssonde

Zur Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen Trübungssignal des ISICOMs und Zellkonzentration wurde die Trübung mit dem ISICOM und einer Referenzsonde (inPro 8100) während einer CHO Kultivierung aufgezeichnet. CHO Zellen streuen

Licht nur schwach, da sie keine Zellwand besitzen (maximal  $OD_{600}$  Werte von 3 [111]). Es war daher zu erwarten, dass Reflexionen durch die Messkammer des ISICOMs das Signal beeinflussen. Deshalb wurden die Trübungssignale sowohl bei geöffneter als auch geschlossener Messkammer ausgewertet. Aufgrund des langsamen Wachstums der CHO Zellen kann der geringe zeitliche Versatz zwischen den Messungen in der geschlossenen und geöffneten Kammer vernachlässigt werden. Abbildung 39 zeigt den Kulturverlauf.



**Abbildung 39:** Zeitlicher Verlauf der Trübungsmessung von ISICOM und Referenzsonde (*inPro 8100*) während der Kultivierung von *CHO K1* im 7,5 L Maßstab. Zusätzlich ist der Verlauf der Gesamtzell- (TCC) und Lebendzellkonzentration (VCC) aufgetragen.

Die Trübungswerte der Referenzmessung unterscheiden sich stark von denen des ISICOMs. Eine Signaländerung ist mit dem *inPro 8100* erst ab Zellkonzentrationen über  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (nach ca. 80 Stunden) zu bemerken. Aber auch in der exponentiellen Wachstumsphase erhöht sich das Referenzsignal nur langsam. Beim Übergang in die stationäre bzw. Absterbephase steigt das Trübungssignal weiter an, obwohl die Gesamtzellkonzentration konstant bleibt. Wahrscheinlich wurde die Messung durch Zelltrümmer der absterbenden Zellen beeinflusst, da die Lebendzellzahl während dieser Phase stark abnimmt. Somit stellt die Referenzmethode keine geeignete Sensorik zur *online* Erfassung der Zellzahl in tierischen Kultivierungen dar.

Bei der Messung mit dem ISICOM ist zu Beginn des Prozesses, bei einer Zellkonzentration von  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen $\cdot$ mL $^{-1}$ , das Trübungssignal mit geöffneter und geschlossener Kammer nahezu identisch. Im Verlauf der Kultivierung unterscheiden sich die Trübungssignale jedoch. Zunächst steigen beide Messsignale mit zunehmender Zellkonzentration an. Bei geschlossener Kammer steigt das Signal deutlich stärker und erreicht ein Maximum nach etwa 40 Stunden bzw. bei einer Zellkonzentration von  $1,74 \cdot 10^6$  Zellen $\cdot$ mL $^{-1}$ . Dieses Maximum wird bei geöffneter Kammer bereits nach 20 Stunden und  $0,77 \cdot 10^6$  Zellen $\cdot$ mL $^{-1}$  erreicht. Während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen sinken beide Signale wieder ab. Auch hier ist das Signal der geöffneten Kammer weitaus niedriger als das bei geschlossener Kammer und erreicht ein Minimum nach 110 Stunden bzw.  $16,76 \cdot 10^6$  Zellen $\cdot$ mL $^{-1}$ , dem Zeitpunkt des Übergangs des Zellwachstums in die stationäre Phase. Bei geschlossener Kammer wird das Minimum nach 150 h und  $19,79 \cdot 10^6$  Zellen $\cdot$ mL $^{-1}$  erreicht. Danach steigen beide Messwerte bis zum Ende der Kultivierung nur noch schwach an.

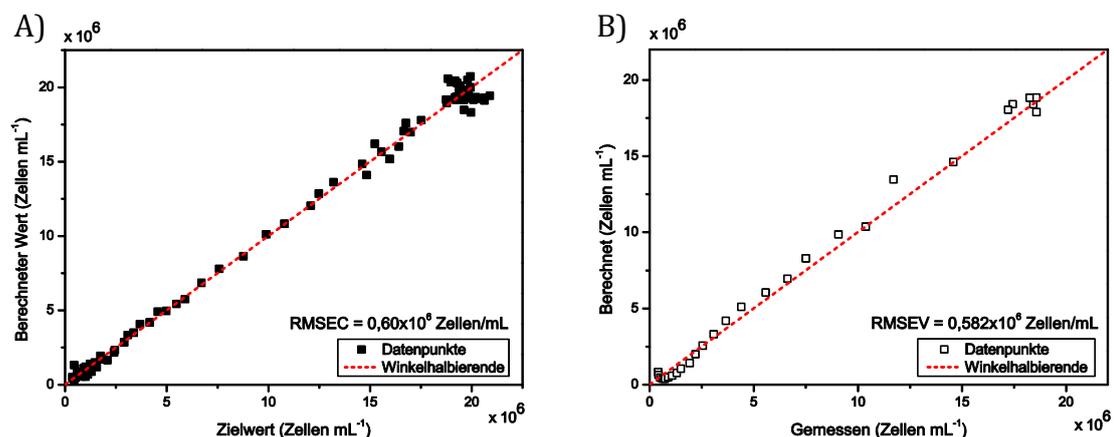
Der mit dem ISICOM beobachtete Verlauf bestätigt, dass die reflexionsbedingte Beeinflussung des Trübungssignals bei der Prozessbeobachtung von CHO Zellen berücksichtigt werden muss. Anders als bei der Referenzmessung führen hier bereits geringe Trübungen zu deutlich erkennbaren Signalveränderungen. Analog zu den mit Formazin ermittelten Effekten (vgl. Kapitel 4.3.1) verstärken die Zellen bei geringen Zellkonzentrationen das Streulichtsignal. Bei steigenden Konzentrationen schirmen die Zellen das an den Kammerwänden reflektierte Licht immer stärker ab, bis der Reflexionseffekt vollständig überlagert wird und das reine Streulicht der Zellen gemessen wird. Aufgrund der veränderten Pfadlänge bzw. geringen Abstands von Lichtquelle und Kammerrückwand ist dieser Effekt bei geschlossener Kammer stärker (höhere Trübungswerte) als bei geöffneter. Der Trübungsverlauf macht auch deutlich, dass keine lineare Korrelation von Trübungssignal und Zellkonzentration möglich ist und ein komplexeres Kalibrationsmodell benötigt wird. Hierbei ist von Vorteil, dass für jeden Wert der Zellkonzentration zwei Trübungswerte zur Kalibration zur Verfügung stehen (die der geöffneten und geschlossenen Kammer).

Zur Erstellung der Kalibration wurde die Kultivierung zweimal wiederholt und auf Basis beider Prozesse eine Multi-Lineare-Regression durchgeführt

(Matlab Ver. R2011a, *The MathWorks, Inc.*, USA). Werden die beiden Trübungssignale, ihr Quadrat sowie das Verhältnis der Signale zur Bildung eines Kalibrationsmodells genutzt, ergibt sich Gleichung ( 8 ):

$$X = 3,95 \cdot 10^7 - 2,29 \cdot 10^5 \cdot K_{auf} - 4,23 \cdot 10^4 \cdot K_{zu} - 4,76 \cdot 10^6 \cdot \frac{K_{zu}}{K_{auf}} + 412 \cdot K_{auf}^2 + 121 \cdot K_{zu}^2 \quad (8)$$

Aufgrund der nicht Linearität des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und Sensor-signal wird ein polynomisches, bivariates Modell gewählt, um den Anstieg und Abfall der Signale bei steigender Zellzahl beschreiben zu können. Dieses Modell wird um das Verhältnis zwischen beiden Messgrößen ergänzt, welches ebenfalls nicht linear verläuft, aber Informationen über die Pfadlängenunterschiede zwischen den beiden Sensorpositionen in der Messkammer enthält. Abbildung 40 A stellt das Ergebnis dieser nicht linearen Regression grafisch dar. Vorhergesagte und Zielwerte liegen nahe der Winkelhalbierenden, was auf eine gute Vorhersagegüte hindeutet. Die Kalibration weist ein RMSEC von  $0,607 \cdot 10^6$  Zellen·mL<sup>-1</sup> auf. Zur Validierung wurde eine dritte Kultivierung unter gleichen Bedingungen durchgeführt und das Modell auf die erhaltenen Daten angewendet.



**Abbildung 40:** (A) Polynomische, bivariate Kalibration des Streulichtsignals von CHO K1 gegen die Gesamtzellkonzentration auf Basis von zwei Prozessen bei geöffneter und geschlossener Sensorkammer. (B) Validierung der Kalibration anhand eines unabhängigen, dritten Prozesses.

Abbildung 40 B stellt die aus dem Modell berechneten Zellzahlen gegen die gemessenen Werte dar. Der RMSEV beträgt  $0,582 \cdot 10^6$  Zellen·mL<sup>-1</sup> und liegt damit in der Größenordnung des RMSEC. Bei Zellkonzentration unter  $1 \cdot 10^6$  Zellen·mL<sup>-1</sup> ergeben sich mit dem Kalibrationsmodell im Mittel sehr hohe Abweichung von 59 %. Bei Konzentrationen zwischen  $1 \cdot 10^6$  und  $18,6 \cdot 10^6$  Zellen·mL<sup>-1</sup> reduziert sich die Abweichung im Mittel auf 9,2 % und liegt damit innerhalb der Messgenauigkeit der Cedex Referenzmessung. Somit ist eine Multivariate Kalibration der Streulichtsignale des ISICOMs zur Bestimmung die Zellkonzentration zwischen  $1 \cdot 10^6$  und  $18,6 \cdot 10^6$  Zellen·mL<sup>-1</sup> möglich.

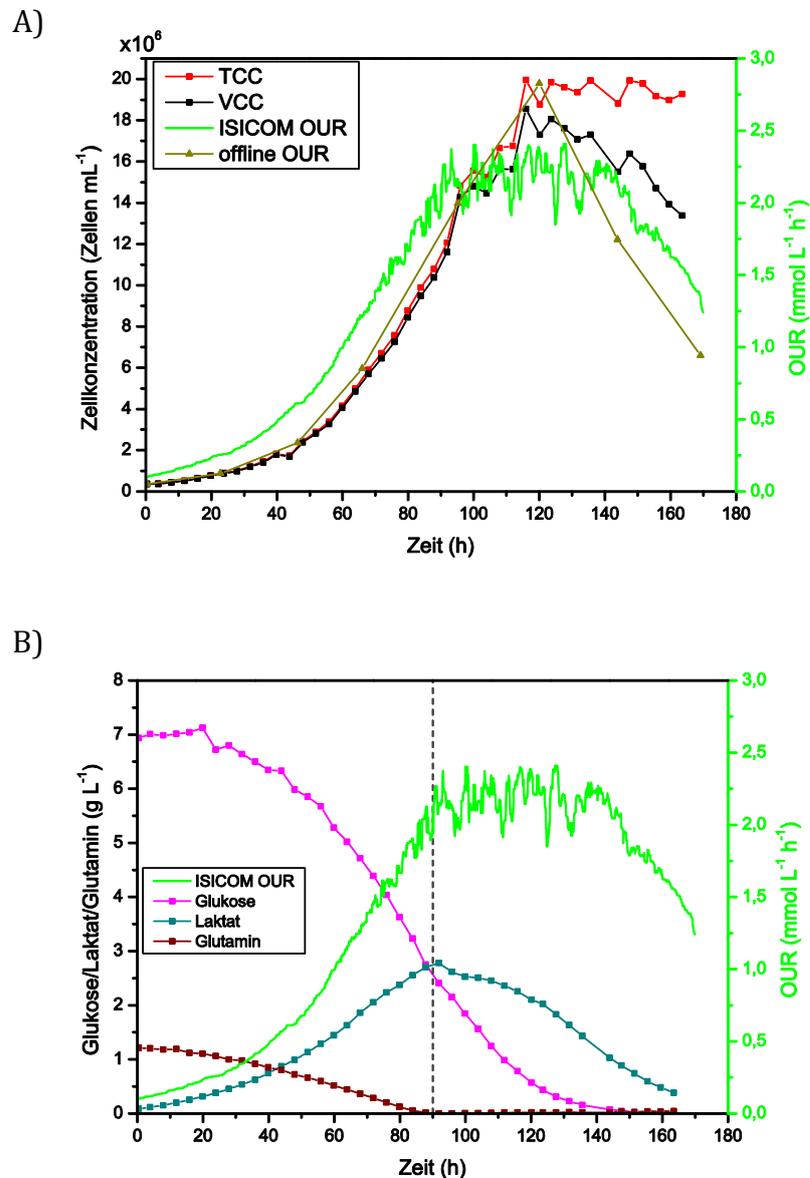
### 5.3.2 Bestimmung der Sauerstoffaufnahme

Anders als bei mikrobiellen Kultivierungen ist bei diesem Säugerzellprozess die Gasmassenbilanzierung als Referenzmessung ungeeignet. Zum einen kann die Gaszufuhr aufgrund der Begasungsstrategie nicht präzise genug erfasst werden (vgl. Kapitel 9.2.5.3). Zum anderen wird der Reaktorkopfraum mit Druckluft ( $6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$  vs.  $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) gespült. Damit sind der zugegebene Gasvolumenstrom und die Sauerstoffkonzentration in der Gasphase ( $\dot{V}_{G_{ein}}$ ) im Prozessverlauf nicht konstant. Zusätzlich wird das Prozessgas des *Spargers* durch die Kopfraumspülung stark verdünnt. Dieses komplexe Verfahren erschwert die exakte Messung der Sauerstoffkonzentrationsunterschiede in Zu- und Abluft enorm.

Als Referenzmessung wurde daher eine *offline* Methode gewählt, bei der eine Probe aus dem Reaktor zügig in ein im Wasserbad (6A, Julabo GmbH, Seelbach) auf 37°C temperiertes, durchmisches 20 mL Glasgefäß (SensorVial SV-PSt3-20mL-YST, Presens GmbH, Regensburg) überführt worden ist. Das Gefäß wurde dabei randvoll mit Kulturbrühe gefüllt und dicht verschlossen, sodass kein Gasraum entstand. Anschließend wurde der Verbrauch des Gelöst-Sauerstoffs innerhalb der Probe mittels pO<sub>2</sub>-Optode aufgezeichnet und nach der dynamischen Methode ausgewertet. Diese *offline* OUR-Messung wurde einmal täglich durchgeführt.

In Abbildung 41 A ist der zeitliche Verlauf der Gesamt- und Lebendzellkonzentration sowie die durch ISICOM und die *offline* Messung ermittelte OUR aufgetragen. Die ISICOM OUR wurde zuvor mit einem Medianfilter geglättet (Fensterbreite 10).

Abbildung 41 B zeigt den entsprechenden Verlauf der Glukose-, Laktat- und Glutaminkonzentration zusammen mit der OUR-Messung des ISICOMs.



**Abbildung 41:** (A) Zeitlicher Verlauf der OUR vom ISICOM und *offline* Referenzmessung während einer Kultivierung von *CHO K1* im 7,5 L Maßstab, Verlauf der Gesamtzell- (TCC) und Lebendzellkonzentration (VCC). (B) ISICOM OUR im Vergleich zum Verlauf der Glukose-, Laktat- und Glutaminkonzentration derselben Kultivierung.

Die Zunahme der Sauerstoffaufnahme des ISICOM korreliert während der ersten 90 Stunden mit dem Zellwachstum der Kultur. Innerhalb dieser Zeit durchlaufen die Zellen die lag- sowie die exponentielle Wachstumsphase. Dabei verstoffwechseln sie Glukose und Glutamin, wobei Laktat gebildet wird. Nach 90 Stunden ist Glutamin

im Kulturmedium vollständig verbraucht und die Laktatkonzentration erreicht ihr Maximum. Dieser Zeitpunkt geht mit einem Stopp der Zunahme der OUR bei etwa  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  während der folgenden 50 Stunden einher. Innerhalb dieser Zeit ändert sich der Zellstoffwechsel und das zuvor gebildete Laktat wird nun, ebenso wie die Restglukose, von den Zellen verbraucht [112]. Sobald die Absterbephase beginnt und sich somit der Anteil der toten Zellen in der Kultivierung erhöht, sinkt auch die OUR.

In der Literatur werden für CHO Batch-Prozesse vergleichbare OUR-Werte beschrieben, wie die hier ermittelten Sauerstoffverbrauchsdaten [71, 86, 91, 96, 113–115]. Die maximal erreichte OUR in diesem Prozess ist um ca. Faktor 10 geringer als bei den mikrobiellen *E. coli* Kultivierungen und liegt damit in einer Größenordnung, bei der sich das Ansprechverhalten der  $\text{pO}_2$ -Optode nicht limitierend auf die Messung auswirkt.

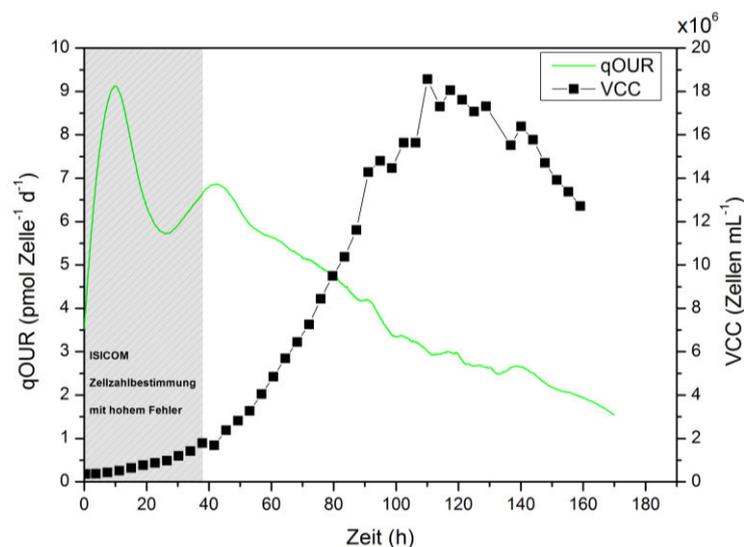
Ein Vergleich der *offline* OUR-Messung mit den ISICOM Ergebnissen zeigt, dass diese zumeist etwas niedrigere Verbrauchsdaten ergibt. Grundsätzlich liegen die Messungen jedoch in derselben Größenordnung und der Verlauf stimmt gut überein. Lediglich bei der höchsten gemessenen OUR nach etwa 120 Stunden ist eine größere Abweichung zu vermerken, die zudem höher als die des ISICOM ist. Diese Differenzen sind auf die Methodik des *offline* OUR-Messverfahrens zurückzuführen, bei dem die Kulturprobe während der Überführung in das externe Messgerät um wenige Grad abkühlt. Insbesondere bei hohem Sauerstoffverbrauch kann dies dazu führen, dass der gelöste Sauerstoff bereits verbraucht ist, bevor die Kulturbrühe wieder auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt wird. Der Temperaturunterschied wird bei der Sauerstoffmessung durch die *offline* Bestimmung nicht berücksichtigt, was das Messergebnis verfälscht und die oben genannten Abweichungen erklärt.

Der ISICOM ist zur *online* Bestimmung der Sauerstoffaufnahme eines CHO Prozesses sehr gut geeignet. Im Gegensatz zur *offline* Bestimmung muss dabei keine Probe aus dem Reaktor gezogen werden und die Ergebnisse stehen kontinuierlich zur Verfügung. Die gemessenen OUR-Werte bieten darüber hinaus Rückschlüsse auf den Zellmetabolismus, denn über ihren Verlauf kann der Zeitpunkt des vollständigen Glutaminverbrauchs ermittelt werden. Auch die Wachstumsphasen der Kultur können angesichts des Verlaufs der Sauerstoffaufnahme abgeleitet werden. Es

gibt bisher keine andere Möglichkeit, die Sauerstoffaufnahme *online* an diesem CHO Prozess zu bestimmen, da die Abgasanalytik, im Gegensatz zu den mikrobiellen Prozessen, hier nicht eingesetzt werden kann.

### 5.3.3 Betrachtung der spezifischen Sauerstoffaufnahme

Die spezifische Sauerstoffaufnahme beschreibt den Sauerstoffverbrauch pro Zelle in einem definierten Zeitintervall. Da mit dem ISICOM während des CHO K1 *Batch*-Prozess sowohl die Zellkonzentration als auch die OUR *online* ermittelt werden kann, ist die Bestimmung der qOUR aus diesen beiden Größen innerhalb des Messbereichs der Trübungssonde möglich. Die spezifische Sauerstoffaufnahme ist eine wichtige Größe zur Beurteilung der metabolischen Aktivität und des physiologischen Zustands der Kultur (vgl. Kapitel 2.4.4). In Abbildung 42 sind die Verläufe der qOUR und der Lebendzellzahl (VCC, *offline* Cedex Messung) der CHO Kultivierung aus Kapitel 5.3.2 exemplarisch aufgetragen.



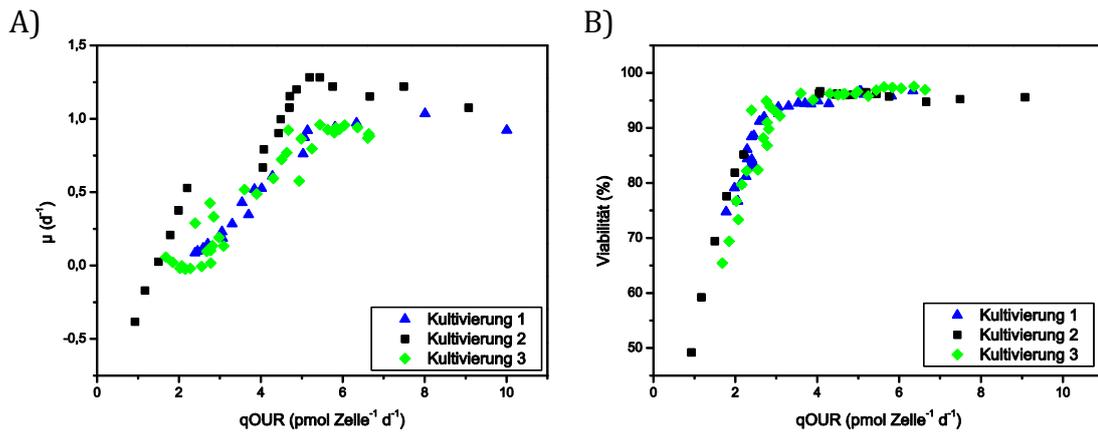
**Abbildung 42:** Zeitlicher Verlauf der qOUR und VCC (ermittelt mit dem Cedex) während der CHO K1 *Batch*-Kultivierung.

Zu Beginn des Prozesses ist die Zellkonzentration so gering, dass ihre Bestimmung mit dem ISICOM einem großen Fehler unterliegt (vgl. Kapitel 5.3.1). Dies hat eine fehlerhafte qOUR Berechnung zur Folge, welche stark zwischen 3,5 und 9 pmol·Zelle<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> schwankt. Nach ca. 40 Stunden kann die Zellkonzentration über

die Trübung und somit auch die  $qOUR$  verlässlich bestimmt werden. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die exponentielle Wachstumsphase der Kultur und die spezifische Sauerstoffaufnahme beträgt ca.  $7 \text{ pmol} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Im weiteren Verlauf des Prozesses sinkt die  $qOUR$  kontinuierlich bis auf  $1,5 \text{ pmol} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  ab. Vergleichbare Verläufe zeigten sich zudem bei zwei weiteren Wiederholungen der CHO K1 Kultivierungen (siehe Anhang 9.3.6). Diese Verbrauchsdaten entsprechen in ihrer Größenordnung den Literaturangaben für CHO Zellen [91, 96, 116]. Die Abnahme der spezifischen Sauerstoffaufnahme der Zellen bei höheren Zellkonzentrationen ist bereits durch Yoon und Konstantinov beobachtet worden [91]. Sie ist ein Indiz für eine Schwächung des Zellmetabolismus im Verlauf der Kultivierung. Mögliche Gründe hierfür können z. B. physiologische Faktoren wie Zell-Zell-Interaktion, Zellalterung oder Änderung der Wachstums Umgebung durch Akkumulation inhibierender Stoffwechselprodukte im Kulturmedium sein [91].

Im Folgenden soll untersucht werden, ob die mit dem ISICOM ermittelte  $qOUR$  dazu genutzt werden kann, weitere Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen zu ermöglichen. Dazu ist in Abbildung 43 A die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  in Abhängigkeit von der  $qOUR$  dargestellt.

Die spezifische Wachstumsrate ist eine wesentliche Kenngröße von Kultivierungsprozessen. Sie beschreibt die relative Zunahme der Zellkonzentration bzw. Biomasse pro Zeit und ist abhängig von Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur oder Substratkonzentration. Bei optimalen Bedingungen erreicht  $\mu$  substratabhängig ein Maximum  $\mu_{\max}$ , das für einen Organismus bei Wachstum auf einem bestimmten Substrat spezifisch ist [117]. Für diese CHO K1 Kultivierung liegt  $\mu_{\max}$  in der Regel bei ca.  $1 \cdot \text{d}^{-1}$ . Änderungen der Wachstumsgeschwindigkeit können ein Indiz für Substratmangel sein und somit zum Beispiel als Basis für *Feed*-Strategien dienen, die diesem Mangel vorbeugen können. Die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate erfolgte auf Basis der *offline* Messwerte des Cedex und wurde anschließend mit einem Savitzky-Golay-Filter geglättet (Fensterbreite 15). Ohne diese Datenvorverarbeitung würden die  $\mu$ -Werte stark streuen. Abbildung 43 zeigt die Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der  $qOUR$  von drei CHO K1 Kultivierungen, die mit dem ISICOM überwacht wurden.



**Abbildung 43:** Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu$  (A) und Viabilität (B) in Abhängigkeit von der qOUR auf Basis von drei CHO K1 *Batch*-Prozessen.

Bei allen drei *Batch*-Prozessen ist der Zusammenhang von  $\mu$  und qOUR ähnlich. Es wird deutlich, dass die CHO-Zellen bei qOUR Werten zwischen 5 und 10  $pmol\ Zell^{-1}\ d^{-1}$  eine Wachstumsgeschwindigkeit zwischen 0,8 und 1,2 erreichen. Dies lässt auf optimale Wachstumsbedingungen in der Kulturbrühe schließen. Sobald die qOUR unter 5  $pmol\ Zell^{-1}\ d^{-1}$  fällt, wachsen die Zellen deutlich langsamer. Bei spezifischen Sauerstoffaufnahmeleistungen von 2  $pmol\ Zell^{-1}\ d^{-1}$  ist das Wachstum komplett eingestellt. Anhand der qOUR kann dementsprechend das Wachstumsverhalten der CHO Zellen beschrieben werden.

In Abbildung 43 B ist die Viabilität der Zellen in Abhängigkeit von der qOUR dargestellt. Die Viabilität gibt Auskunft über den physiologischen Zustand der Kultur und beschreibt das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen in Prozent. So stehen Viabilitäten über 90 % für intakte Zellkulturen, wohingegen drastische reduzierte Viabilitäten in der Absterbephase zu verzeichnen sind. Der Verlauf ist hier für alle drei Prozesse vergleichbar. Bei spezifischen Sauerstoffaufnahmeleistungen größer 3  $pmol\ Zell^{-1}\ d^{-1}$  liegt die Viabilität der Zellen über 90 %. Im Bereich zwischen 3 und 1  $pmol\ Zell^{-1}\ d^{-1}$  fällt sie hingegen linear auf bis zu 50 % ab. Die qOUR Bestimmung mittels ISICOM erlaubt daher während des CHO Prozesses Rückschlüsse auf die Zellviabilität, die alleine auf Basis einer Trübungsmessung nicht möglich wäre.

Zusammenfassend stehen mit Hilfe der spezifischen Sauerstoffaufnahmeleistung und den daraus ableitbaren Informationen über die spezifische Wachstumsgeschwin-

digkeit sowie Viabilität umfangreiche Informationen über den metabolischen Zustand der Kultur zur Verfügung. In zukünftigen Experimenten kann durch gezielte Veränderung von Prozessvariablen oder biochemischen *Assay*, welche die Zellrespiration fördern bzw. inhibieren, gezielt Einfluss auf die qOUR genommen werden. Daraus ergibt sich ein tiefgreifendes Verständnis über die metabolische Bedeutung der spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate, das zur Prozesssteuerung und -regelung genutzt werden kann. Auf dieser Basis sind Verbesserungen des Bioprozesses möglich, welche zum Beispiel während kontinuierlicher Kultivierungen zur Aufrechterhaltung einer für das Zellwachstum bzw. Produktbildung optimalen qOUR dienen.

### 5.3.4 Zusammenfassung der Bioprozessüberwachung von CHO K1

In diesem Kapitel wurden die Ergebnisse des Einsatzes des ISICOMs zur Bioprozessüberwachung eines CHO K1 *Batch*-Prozesses gezeigt. Bei der Streulichtmessung stellte sich heraus, dass die Messung stark von den durch die Sensorkammer verursachten Reflexionen beeinflusst wurden. Hierdurch waren bereits bei geringen Trübungen deutliche Messwertänderungen zu verzeichnen, die mit der Referenztrübungssonde nicht erfasst werden können. Dadurch, dass sich die Signale von geschlossener und geöffneter Messkammer unterscheiden und somit zwei Messwerte für die Datenauswertung zur Verfügung standen, konnte eine polynomische, bivariate Kalibration erfolgreich für Zellkonzentrationen zwischen  $1 \cdot 10^6$  und  $18,6 \cdot 10^6$  Zellen  $\cdot \text{mL}^{-1} \pm 9,2$  % durchgeführt werden.

Neben der Trübung wurde die Sauerstoffaufnahme während der Kultivierungen mit dem ISICOM und einer *offline* Methode bestimmt und verglichen. Im Gegensatz zu den mikrobiellen Prozessen liegen die OUR-Werte bei diesen Kultivierungen in einer Größenordnung, die mit dem ISICOM bzw. der  $\text{pO}_2$ -Optode auswertbar ist. Beide Messmethoden ergeben vergleichbare Resultate und liegen innerhalb der in der Literatur beschriebenen Größenordnung. Der ISICOM ist damit auch zur *online* Bestimmung der Sauerstoffaufnahme während des CHO Prozesses sehr gut geeignet und es ist hieraus die spezifische OUR *online* am Bioprozess messbar. Darüber hinaus können Rückschlüsse über den Zellmetabolismus, wie zum Beispiel der Zeitpunkt des vollständigen Glutaminverbrauchs oder die Wachstumsphase der Kultur, gezogen werden. Zum einen erlaubt diese eine Einschätzung

der respiratorischen Aktivität der Zellen. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass sich daraus die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit sowie die Viabilität der Kultur ableiten lässt. Dadurch stehen dank ISICOM umfangreiche Informationen über die metabolische Aktivität sowie den physiologischen Zustand der Kultur *online* zur Verfügung, ohne dass eine Probe aus dem Reaktor gezogen werden muss. Das ist vor allem bei diesem CHO Prozess von besonderer Bedeutung, da die komplexe Begasungsstrategie keine verlässliche Gasmassenbilanzierung als alternative *online* OUR-Messmethode zulässt. Auf Basis dieser Daten kann in Zukunft eine Optimierung des CHO K1 Prozesses erfolgen. Zudem ist die Entwicklung einer *Feed*-Strategie für einen *Fedbatch*-Prozess möglich.

#### 5.4 Zusammenfassung der Anwendung des ISICOM zur Bioprozessüberwachung

In diesen Versuchen wurde der ISICOM an zwei verschiedenen mikrobiellen Bioprozessen (*E. coli*, *P. pastoris*) sowie einem Säugerzellprozess (CHO K1) getestet. Dabei wurde sowohl die Sauerstoffaufnahmebestimmungsrate bestimmt als auch die Trübungsmessung zur Biomassenbestimmung untersucht. Des Weiteren wurde geprüft, ob der Einsatz einer pH-Optode im ISICOM sinnvoll ist. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse zusammen.

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Anwendung des ISICOMs in drei verschiedenen Bioprozessen.

Messgröße/Prozess	<i>E. coli</i> K1	<i>P. pastoris</i>	CHO K1
OD <sub>600</sub>	0,95 - 28	2 - 135	-
BTM/Zellzahl	1,25 - 11,1 g·L <sup>-1</sup>	2 - 48,5 g·L <sup>-1</sup>	1·10 <sup>6</sup> - 18,6·10 <sup>6</sup> Zellen·mL <sup>-1</sup>
pH-Wert	Grundsätzlich verwendbar, aber optimierte <i>Patches</i> und Kalibrationsroutinen nötig		
OUR	bis 15 mmol·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	limitiert	Bis 2,5 mmol·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>
qOUR	Bis zur max. OUR	limitiert	Ja, ab 1·10 <sup>6</sup> Zellen·mL <sup>-1</sup>

Die Trübungsmessungen mit der geöffneten Messkammer ergeben bei den *E. coli* und *P. pastoris* Prozessen eine sehr gute Übereinstimmung von ISICOM und Referenzmessung. Zudem kann ein linearer Zusammenhang zwischen Trübungssignal und OD<sub>600</sub> bzw. BTM ermittelt werden, da eine das Streulichtsignal beeinflussende Reflexion bei diesem Prozess nicht messbar ist. Dies ist dem hohen Basissignal durch die Begasung und Rührung geschuldet. Für den kurzen Zeitraum von maximal 5 Minuten, indem die die Kammer zur Messung der OUR geschlossen ist, wird das Signal nicht ausgewertet. Diese Zeitspanne ist im Verhältnis zum Zellwachstum gering, weshalb das Trübungssignal über den gesamten Zeitraum interpoliert und prinzipiell der jeweiligen OUR-Messung zugeordnet werden kann.

Für die Bestimmung der Zellkonzentration während des CHO Prozesses ist ein komplexeres polynomisches, bivariates Kalibrationsmodell nötig, da die Reflexionen der Messkammer das Trübungssignal beeinflussen. Deshalb wird das Signal sowohl bei geöffneter als auch geschlossener Messkammer ausgewertet. Der zeitliche Versatz zwischen der Trübungsmessung in beiden Positionen, bedingt durch die OUR-Messung, kann vernachlässigt werden, da die CHO Zellen ein langsames Wachstum aufweisen. Trotz eines aufwändigeren Modells hat dies den Vorteil, dass bereits geringe Zellkonzentration auswertbar sind. Die Referenzmessung verzeichnet dagegen bei geringen Zellzahlen noch keine Signaländerungen.

Die Verwendung einer pH-Optode erwies sich als möglich aber aktuell nicht sinnvoll, da die pH-Patches des Sensors während der Dampfsterilisation so stark ausbleichen, dass eine Rekalibration nötig ist. Diese kann aus praktischen Gründen im sterilen Reaktor nicht mehr erfolgen. Hier könnten durch den Hersteller vorkalibrierte Sensoren eine Besserung schaffen. Dennoch zeigt dieses Experiment, dass mit dem ISICOM prinzipiell drei Messgrößen parallel erfasst werden können und dabei nur ein Reaktorzugang belegt wird.

Die Bestimmung der Sauerstoffaufnahme mit dem ISICOM ist während der *E. coli* und *P. pastoris* Prozesse grundsätzlich möglich. Aufgrund des langsamen Ansprechverhaltens der im Sensor verbauten pO<sub>2</sub>-Optode können hohe Verbrauchsraten über 15 mmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> jedoch nicht ausgewertet werden. Mit der Gasmassenbilanzierung als Referenzmethode werden hingegen sechs- (*E. coli*) bis zwanzigfach

(*P. pastoris*) höhere Werte gemessen. Es besteht daher ein dringender Optimierungsbedarf der  $pO_2$ -Optode, wie in Kapitel 4.6 dargelegt. Bei geringem Sauerstoffverbrauch ist der ISICOM allerdings von großem Nutzen, da die Sauerstoffkonzentrations-unterscheide in den Zu- und Abluftströmen des Reaktors sehr gering sind und die Gasmassenbilanzierungen daher einem größeren Fehler unterliegen.

Bei der OUR-Messung während des CHO Prozesses waren die Verbrauchsdaten deutlich niedriger und erreichten maximal  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Diese sind mit dem ISICOM verlässlich *online* bestimmbar und decken sich sehr gut mit der *offline* Referenzmessung. Auf Basis dieser Daten lassen sich verschiedene Informationen über die Kultur, wie z.B. Wachstumsphase oder Zeitpunkt des Glutaminverbrauchs, ermitteln. Darüber hinaus kann aus Trübungs- und OUR-Messung die spezifische Sauerstoffaufnahme berechnet werden. Diese liefert zusätzliche Erkenntnisse über die respiratorische und damit auch metabolische Aktivität der Zellen, wodurch Abschätzung der spezifischen Wachstumsrate und Viabilität der CHO Zellen möglich sind.

Aufgrund der komplexen Begasungsstrategie und dem verhältnismäßig geringen Sauerstoffverbrauch war bei diesem CHO Prozess die Gasmassenbilanzierung zur *online* Bestimmung der OUR ungeeignet. Daher ist der ISICOM bei diesen Säugerzellprozessen der erste Sensor, der eine *online* Messung der spezifischen Sauerstoffaufnahme mit der dynamischen Methode ermöglicht. Alternative Messtechniken sind hierbei entweder nicht geeignet, stellen einen unerwünschten Eingriff in den Prozess dar oder sind lediglich *offline* verfügbar.

Daraus ergeben sich neue Möglichkeiten zur Bioprozessautomatisierung. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Glutamin ein Hauptfaktor zur effektiven Prozessführung in CHO Kultivierungen darstellt und in nicht limitierenden Mengen vorliegen sollte [112, 118]. Basierend auf den Messdaten des ISICOM kann somit eine Prozessregelung etabliert werden, die einem Glutaminmangel während der Kultivierung vorbeugt. Anhand der Sauerstoffaufnahme ist der Zeitpunkt des vollständigen Verbrauchs der Aminosäure indirekt *online* bestimmbar und ein entsprechender *Feed* kann gezielt zum Prozess gegeben werden.

Darüber hinaus leistet der ISICOM einen Beitrag zur Umsetzung der im Jahr 2004 von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) veröffentlichten PAT (*Process Analytical Technology*) Initiative. Ziel dabei ist es, die Qualität nicht durch die Analyse des finalen Produktes zu definieren (*quality-by-inspection*), sondern die Kontrolle bereits in den Bioprozess einzubinden (*quality-by-design*, QbD). Durch Identifikation, Überwachung und Regelung der kritischen Prozessparameter (*critical process parameter*, CPP), die die Produktqualität beeinflussen, soll so ein besseres Prozessverständnis erlangt werden. Dadurch sind Fehler frühzeitig feststellbar und Prozesse kontinuierlich optimierbar. [119, 120] CPPs sind neben den physikalischen und chemischen Zustandsgrößen auch biologische Eigenschaften, wie die (q)OUR, Viabilität und Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur. Diese stehen mit Hilfe des ISICOMs für den gezeigten CHO Prozess erstmals *online* zur Verfügung.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein *in situ* Sensor zur Bestimmung der metabolischen Aktivität in Bioprozessen auf Basis der dynamischen Messung der Sauerstoffaufnahme entwickelt.

Das Konzept des Sensors basiert auf einer in definierten Intervallen gasdicht verschließbaren Messkammer im Sensorkopf, die mit drei faseroptischen Sensoren überwacht wird. Über einen O<sub>2</sub>-Sensor lässt sich der Sauerstoffverbrauch der Organismen in der geschlossenen Kammer bestimmen. Durch Integration einer 180°-Streulichtoptode in den Aufbau kann die Biomasse bzw. Zellkonzentration ermittelt und somit die spezifische Sauerstoffverbrauchsrate berechnet werden. Der dritte Sensorzugang erlaubt die Nutzung weiterer faseroptischer Sensoren, was in der vorliegenden Arbeit am Beispiel einer pH-Optode gezeigt worden ist. Der entscheidende Vorteil dieses Systems ist, dass nicht die gesamte Zellsuspension im Reaktor untersucht wird, sondern nur ein kleines, definiertes Volumen. Damit ist die spezifische Sauerstoffaufnahme direkt mit der dynamischen Methode bestimmbar, ohne den Kultivierungsprozess durch Abstellen der Begasung zu beeinflussen. Im Anschluss an die Entwicklung eines Sensorprototyps wurde dieser technisch charakterisiert und in verschiedenen biotechnisch relevanten Modellprozessen angewendet.

Der Prototyp ist für den 25 mm Ingold-Port entworfen und besteht im Wesentlichen aus dem Sensorkörper mit Messkammer, einem beweglichen Sensorstempel und den faseroptischen Sensoren. Durch Vor- und Zurückführen des Stempels im Sensorkörper kann die Messkammer geschlossen bzw. geöffnet werden. Die technische Charakterisierung hat gezeigt, dass dieser Mechanismus die Kammer gasdicht verschließt, ohne die Sterilität des Prozesses aufgrund der mechanischen Bewegung zu gefährden.

Innerhalb der geschlossenen Messkammer verhindert ein integrierter Magnetrührmechanismus die Sedimentation von Zellen und beugt so Sauerstoffgradienten vor. Tests zum Sedimentationsverhalten von Formazindispersion sowie *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten haben gezeigt, dass bei einer Drehzahl von 200 rpm eine Sedimentation effektiv vermieden wird. Mittels Gesamt- und Lebendzellkonzentrationsbestimmung von besonders scherempfindlichen CHO Zellen konnte zudem nachgewiesen werden, dass bei dieser Rührgeschwindigkeit keine Schädigung der Organismen in der Kammer auftritt.

Weiter wurden die optischen Sensoren für die Verwendung im ISICOM getestet und hinsichtlich Messbereich, Temperaturabhängigkeit und Langzeitstabilität charakterisiert. Die Lichtleiter der Optoden sind ausgehend von ihren Ausleseeinheiten innerhalb des Sensorstempels zu einem reaktorseitigen optischen Fenster geführt. Der Streulicht- bzw. Trübungssensor strahlt frei durch das Fenster in die Messkammer. Die Charakterisierung hat gezeigt, dass dieser durch den Rührmechanismus nicht gestört wird, jedoch führen Reflexionen bedingt durch die Edelstahlaufbauten des Sensors zu einer deutlichen Beeinflussung des Streulichtsignals bei geringen Trübungen. Diese sind darüber hinaus in ihrer Intensität abhängig von der Position des Stempels, sodass für die geöffnete und geschlossene Kammer jeweils ein anderes Signal gemessen wird. Trotzdem sind im Modell einfache, lineare Kalibrationen am Beispiel von *E. coli* ab  $OD_{600}$  von 2,58 möglich. Für Messungen bei geringen Trübungen sind komplexere Kalibrationsmodelle nötig.

Die *Sensorpatches* der  $pO_2$ - und pH-Optoden sind auf der medienberührenden Seite des optischen Fensters befestigt. Mit der  $pO_2$ -Optode ist der Sauerstoffverbrauch bei geschlossener Messkammer im Modellsystem auf Basis von Glukose und Glukoseoxidase bis zu einer OUR von  $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  bestimmbar. Ein Vergleich mit der OUR-Messung auf Basis der Gasmassenbilanzierung hat gezeigt, dass ein schnellerer Verbrauch in dem Modellsystem trotz eines entwickelten, optimierten Auswertalgorithmus nicht messbar ist. Grund hierfür ist in erster Linie die Ansprechzeit und Abtastrate der  $pO_2$ -Optode, die in der aktuellen Konfiguration mit  $34 \pm 3 \text{ s}$  und einem Messintervall von 3 Sekunden zu gering für hohe Verbrauchsdaten ist.

Der dritte Sensorport kann grundsätzlich in Verbindung mit einer pH-Optode genutzt werden. Allerdings führt die Hitzebehandlung während der Sterilisation zu einer *Drift* im Messsignal, das ohne modifizierte Rekalibrationsroutine des Herstellers nicht nachträglich korrigiert werden kann.

Nach der technischen Charakterisierung wurde der ISICOM mittels zweier verschiedener mikrobieller Bioprozesse (*E. coli*, *P. pastoris*) und eines Säugerzellprozesses (CHO) erprobt, um die Einsatzfähigkeit des Kombi-Sensors zur Überwachung der (spezifischen) Sauerstoffaufnahme unter Prozessbedingungen zu ermitteln.

Während die Trübungsmessung mit geöffneter Sensorkammer bei den mikrobiellen Prozessen sehr gute Übereinstimmung zur Referenzmessung sowie lineare Kalibrationsmodelle bis zu optischen Dichten von 135 bzw. Biotrockenmassen von  $48,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (*P. pastoris*) zeigt, ist die Sauerstoffaufnahme hier eingeschränkt bestimmbar. Bereits früh im Prozess übersteigt die Verbrauchsgeschwindigkeit die Ansprechzeit der  $\text{pO}_2$ -Optode, sodass maximal  $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  gemessen werden können. Mit der Referenz-Gasmassenbilanzierung sind hierbei Werte bis zu  $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  ermittelt worden. Für Prozesse mit sehr hohem Sauerstoffverbrauch ist die Abgasanalytik somit deutlich besser zur Bestimmung der OUR geeignet als der ISICOM.

Ganz im Gegensatz dazu ist die OUR während der Säugerzellkultivierung mit dem ISICOM sehr gut messbar, da die Verbrauchsraten hierbei mit maximal  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  deutlich niedriger sind als bei den beiden mikrobiellen Prozessen. Trotz der schwachen Streulichteigenschaften der CHO Zellen und der damit verbundenen Beeinflussung des Trübungssignals durch Reflexionen in der Messkammer, kann mittels eines polynomischen, bivariaten Kalibrationsmodells ein Zusammenhang zwischen Trübungssignal bei geöffneter sowie geschlossener Messkammer und Zellkonzentration zwischen  $1\cdot 10^6$  und  $18,6\cdot 10^6 \text{ Zellen}\cdot\text{mL}^{-1}$  beschrieben werden. Der geringe zeitliche Versatz der Trübungsmessungen in beiden Positionen ist aufgrund des langsamen Zellwachstums vernachlässigbar. Dadurch ist die spezifische Sauerstoffaufnahme während des Prozesses *online, in situ* bestimmbar. Mit Hilfe der OUR können sowohl Rückschlüsse über die Wachstumsphase der Kultur als auch Veränderungen im Zellstoffwechsel, wie z.B. ein Wechsel von Glutamin zu Laktatstoffwechsel, ermittelt werden. Die  $q\text{OUR}$  liefert darüber hinaus Rückschlüsse

über die metabolische Aktivität der Zellen, mit denen die spezifische Wachstumsrate und Viabilität abgeschätzt werden können. Dieses Resultat ist besonders bemerkenswert, da bei vielen Säugerzellprozessen eine Gasmassenbilanzierung aufgrund der vergleichsweise niedrigen Sauerstoffverbrauchsraten und komplexen Begasungsstrategien deutlich schwieriger oder gar nicht durchführbar ist.

Zusammenfassend ist der ISICOM der erste Sensor zur *in situ online* Bestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme und damit Aktivität von Säugerzellpopulationen auf Basis der dynamischen Methode. Der Sensor kann in verschiedenen Reaktortypen, unabhängig von der Begasungsstrategie, angewendet werden und ermöglicht so in Zukunft ein besseres Prozessverständnis. Die daraus resultierenden erweiterten Kontroll- und Regelmöglichkeiten von Bioprozessen können dazu dienen, den Anteil der metabolisch aktiven Zellen im Prozess zu maximieren und die Produktausbeute von Bioprozessen langfristig erhöhen.

## 7. Ausblick

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ISICOM kann sehr gut für die *in situ* Messung der metabolischen Aktivität in Säugerzell-Bioprocessen genutzt werden. Da der Verschluss und Rührmechanismus steril und verlässlich arbeitet, sollte der Fokus bei zukünftige Weiterentwicklungen zunächst auf einer Optimierung der optischen Sensoren liegen. Die Streulichtoptode kann zum Beispiel mit Hilfe von speziellen Optiken oder variablen Lichtintensitäten verbessert werden, um die durch die Sensormesskammer bedingten Reflexionen zu minimieren und den Messbereich zu erweitern (vgl. Kapitel 4.6).

Da die sich die Verwendung der pH-Optode als problematisch erweisen hat, ist es sinnvoll, den Multisensorport des ISICOM für alternative optische Systeme, wie zum Beispiel einem *in situ* Mikroskop oder einem 2D-Fluoreszenzspektrometer, zu nutzen. Somit würden morphologische Messungen oder Metabolitbestimmungen den Wert der Analysen nochmals steigern.

Die  $pO_2$ -Optode birgt das größte Verbesserungspotential. Durch eine deutliche Reduzierung der Ansprechzeit wären auch hohe Sauerstoffverbrauchsrate in mikrobiellen Prozessen mit der dynamischen Methode messbar. Wenn diese Optimierungen realisiert sind, kann der ISICOM an einem Modellsystem (Teststand, Abbildung 31) nochmals ausführlich hinsichtlich Zuverlässigkeit, Messempfindlichkeit und Genauigkeit untersucht werden.

Anschließend kann die spezifische Sauerstoffaufnahme während verschiedener Kultivierungen gezielt beeinflusst werden, um den Nutzen zur Bioprocessüberwachung weiter zu untersuchen. Eine Möglichkeit dazu ist die Veränderung von einfach zugänglichen Prozessvariablen. Eine verringerte Temperatur oder ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck hat - abhängig vom Mikroorganismus - Einfluss auf

das Wachstumsverhalten, welches eine veränderte spezifische Sauerstoffaufnahme erwarten lässt.

Darüber hinaus sind biochemische Versuche sinnvoll, die die metabolische Aktivität der Zellen beeinflussen. Geeignet sind *Assays*, die die Zellatmung oder -proliferation fördern bzw. inhibieren, wie zum Beispiel 2,4-Dinitrophenol, Antimycin A, Cyanid oder Zytostatika. 2,4-Dinitrophenol bewirkt die Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung in den Mitochondrien der Zellen und erhöht somit den Sauerstoffverbrauch. Zugabe von Antimycin A inhibiert die Oxidation in der mitochondrialen Elektronentransportkette und reduziert den Sauerstoffverbrauch der Zellen.

Die gezielte Veränderung der Kultivierungsbedingungen gibt weitere Aufschlüsse über die metabolische Bedeutung der qOUR in den verschiedenen Organismen und ist Grundlage für eine qOUR-basierte Prozessregelung. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen können qOUR-basierte Regelungsexperimente zur Prozesssteuerung durchgeführt werden.

## 8. Literatur

- [1] Vojinović, V., Cabral, J. M. S., Fonseca, L. P., Real-time bioprocess monitoring, *Sensors Actuators B Chem.*, Apr. 2006, *114*, pp. 1083–1091, DOI: 10.1016/j.snb.2005.07.059.
- [2] Sonnleitner, B., Instrumentation of Biotechnological Processes, T. Scheper, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000, pp. 1–64.
- [3] Sonnleitner, B., Automated Measurement and Monitoring of Bioprocesses: Key Elements of the M3C Strategy Bernhard, T. Scheper, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [4] Scheper, T., Bioanalytik: Messung des Zellzustands und der Zellumgebung in Bioreaktoren, 1st ed. Braunschweig: Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 1991.
- [5] Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., Eerikäinen, T., Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Jul. 2008, *35*, pp. 657–65, DOI: 10.1007/s10295-008-0346-5.
- [6] Schmidt-Hager, J., Entwicklung und Optimierung eines Analysesystems zur des Wachstums in geschüttelten Kulturen, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2013.
- [7] Junker, B. H., Reddy, J., Gbewonyo, K., Greasham, R., On-line and in-situ monitoring technology for cell density measurement in microbial and animal cell cultures, *Bioprocess Eng.*, 1994, *10*, p. 195, DOI: 10.1007/s004490050044.
- [8] Merten, O. W., Palfi, G. E., Stäheli, J., Steiner, J., Invasive infrared sensor for the determination of the cell number in a continuous fermentation of hybridomas., *Dev. Biol. Stand.*, Jan. 1987, *66*, pp. 357–60.

- [9] Biechele, P., Busse, C., Solle, D., Scheper, T., et al., Sensor systems for bioprocess monitoring, *Eng. Life Sci.*, 2015, pp. 1–20, DOI: 10.1002/elsc.201500014.
- [10] Carvell, J., Dowd, J., On-line Measurements and Control of Viable Cell Density in Cell Culture Manufacturing Processes using Radio-frequency Impedance, *Cytotechnology*, 2006, 50, pp. 35–48, DOI: 10.1007/s10616-005-3974-x.
- [11] Palmer, S. M., Kunji, E. R., Online monitoring of biomass accumulation in recombinant yeast cultures, *Methods Mol Biol*, 2012, 866, pp. 165–179.
- [12] Ansorge, S., Esteban, G., Schmid, G., On-line monitoring of responses to nutrient feed additions by multi-frequency permittivity measurements in fed-batch cultivations of CHO cells., *Cytotechnology*, Apr. 2010, 62, pp. 121–32, DOI: 10.1007/s10616-010-9267-z.
- [13] Sarrafzadeh, M. H., Belloy, L., Esteban, G., Navarro, J. M., et al., Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*., *Biotechnol. Lett.*, Apr. 2005, 27, pp. 511–7, DOI: 10.1007/s10529-005-2543-x.
- [14] Sarrafzadeh, M. H., Guiraud, J. P., Lagneau, C., Gaven, B., et al., Growth, sporulation, delta-endotoxins synthesis, and toxicity during culture of *Bacillus thuringiensis* H14., *Curr. Microbiol.*, Aug. 2005, 51, pp. 75–81, DOI: 10.1007/s00284-005-4463-3.
- [15] Maskow, T., Röllich, A., Fetzer, I., Ackermann, J.-U., et al., On-line monitoring of lipid storage in yeasts using impedance spectroscopy., *J. Biotechnol.*, May 2008, 135, pp. 64–70, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2008.02.014.
- [16] Bjørnsen, P. K., Bjørnsen, P. K., Automatic Determination of Bacterioplankton Biomass by Image Analysis, *Appl. Envir. Microbiol.*, 1986, 51, pp. 1199–1204.
- [17] Joeris, K., Frerichs, J.-G., Konstantinov, K., Scheper, T., In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures., *Cytotechnology*, Jan. 2002, 38, pp. 129–34, DOI: 10.1023/A:1021170502775.
- [18] Bluma, A., Höpfner, T., Lindner, P., Rehbock, C., et al., In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art., *Anal. Bioanal. Chem.*, Nov. 2010, 398, pp. 2429–38, DOI: 10.1007/s00216-010-4181-y.

- [19] Bittner, C., Wehnert, G., Scheper, T., In situ microscopy for on-line determination of biomass, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 60, pp. 24–35, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19981005)60:1<24::AID-BIT3>3.0.CO;2-2.
- [20] Guez, J. S., Cassar, J. P., Wartelle, F., Dhulster, P., et al., Real time in situ microscopy for animal cell-concentration monitoring during high density culture in bioreactor, *J. Biotechnol.*, 2004, 111, pp. 335–343, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.04.028.
- [21] Camisard, V., Brienne, J. P., Baussart, H., Hammann, J., et al., Inline characterization of cell concentration and cell volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: Application to volume variation induced by osmotic stress, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, 78, pp. 73–80, DOI: 10.1002/bit.10178.
- [22] Wiedemann, P., Guez, J. S., Wiegemann, H. B., Egner, F., et al., In situ microscopic cytometry enables noninvasive viability assessment of animal cells by measuring entropy states, *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108, pp. 2884–2893, DOI: 10.1002/bit.23252.
- [23] Suhr, H., In Situ Microscopy for On-Line Characterization of Cell-Populations in Bioreactors, Including Cell-Concentrations Measurements by Depth from Focus, *Biotechnol. Bioeng.*, 1995, 47, pp. 106–116, DOI: 10.1002/bit.260470113.
- [24] Lüder, C., Lindner, P., Bulnes-Abundis, D., Lu, S., et al., In situ microscopy and MIR-spectroscopy as Non-invasive optical sensors for cell cultivation process monitoring, *Pharm. Bioprocess.*, 2014, 2, pp. 157–166, DOI: 10.2217/PBP.14.1.
- [25] Beutel, S., Henkel, S., In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Sep. 2011, 91, pp. 1493–505, DOI: 10.1007/s00253-011-3470-5.
- [26] Clark, L. C., Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1956, 2, pp. 41–48.
- [27] Severinghaus, J. W., Astrup, P. B., History of Blood Gas Analysis, *J. Clin Monit.*, 1986, 2, pp. 270–288, DOI: 10.1097/00004397-197201230-00005.

- [28] P. Schuler, *Oxi-Fibel: Einführung in die Gelöstsauerstoff-Meßtechnik*. WTW: Weilheim, 1987.
- [29] Henkel, S., *Entwicklung eines Multisensoradapters zum Einsatz in Disposable Bioreaktoren*, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2013.
- [30] Chmiel, H., *Bioprozesstechnik*, 3rd ed. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl., 2011.
- [31] Ulber, R., Frerichs, J.-G., Beutel, S., *Optical sensor systems for bioprocess monitoring*, *Anal. Bioanal. Chem.*, Jun. 2003, 376, pp. 342–8, DOI: 10.1007/s00216-003-1930-1.
- [32] Rehbock, C., Beutel, S., Brückerhoff, T., Hitzmann, B., et al., *Bioprozessanalytik*, *Chemie Ing. Tech.*, Mar. 2008, 80, pp. 267–286, DOI: 10.1002/cite.200700164.
- [33] Quaranta, M., Borisov, S. M., Klimant, I., *Indicators for optical oxygen sensors.*, *Bioanal. Rev.*, Dec. 2012, 4, pp. 115–157, DOI: 10.1007/s12566-012-0032-y.
- [34] Harms, P., Kostov, Y., Rao, G., *Bioprocess monitoring*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13, pp. 124–127, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00295-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00295-1).
- [35] Amao, Y., *Probes and Polymers for Optical Sensing of Oxygen*, *Microchim. Acta*, 2003, 143, pp. 1–12, DOI: 10.1007/s00604-003-0037-x.
- [36] Bambot, S. B., Holavanahali, R., Lakowicz, J. R., Carter, G. M., et al., *Phase fluorometric sterilizable optical oxygen sensor*, *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 43, pp. 1139–1145, DOI: 10.1002/bit.260431119.
- [37] Köneke, R., Comte, A., Jürgens, H., Kohls, O., et al., *Fiber Optic Oxygen Sensors for Use in Biotechnology, Environmental, and Food Industries*, *Chem. Eng. Technol.*, Aug. 1999, 22, pp. 666–671, DOI: 10.1002/(SICI)1521-4125(199908)22:8<666::AID-CEAT666>3.0.CO;2-I.
- [38] Presens Sensing GmbH, *Instruction manual pH-4 mini*. Regensburg, p. 51, 2004.
- [39] Henkel, Steffen, S. B., *Messung des pH-Werts in der Biotechnologie*, *Chemie Ing. Tech.*, 2013, 85, pp. 872–885, DOI: 10.1002/cite.201200099.

- [40] Sartorius AG, ambr® 250 high throughput - Sartorius AG, 2016. [Online]. Available: <https://www.sartorius.de/de/produkte/bioreaktoren-fermenter/einweg/ambr-250/>. [Accessed: 23-Aug-2016].
- [41] Yau, S. Y., Lee, K., Zoro, B., Steady state and dynamic control performance of the ambr automated micro bioreactor system in a CHO cell batch culture. TAP Biosystems Ltd., Royston, 2011.
- [42] Glindkamp, A., Riechers, D., Rehbock, C., Hitzmann, B., et al., Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2009, pp. 1–25, DOI: 10.1007/10\_2009\_10
- [43] Mills, A., Chang, Q., McMurray, N., Equilibrium studies on colorimetric plastic film sensors for carbon dioxide, *Anal. Chem.*, 1992, 64, pp. 1383–1389, DOI: 10.1021/ac00037a015.
- [44] Gupta, B. D., Sharma, S., A long-range fiber optic pH sensor prepared by dye doped sol-gel immobilization technique, *Opt. Commun.*, 1998, 154, pp. 282–284, DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0030-4018\(98\)00321-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0030-4018(98)00321-6).
- [45] Rao, G., Lam, H., Kostov, Y., Optical Instrumentation for Bioprocess Monitoring, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2010, 116, pp. 125–142, DOI: 10.1007/10\_2008\_50.
- [46] Rudolph, G., Lindner, P., Bluma, A., Joeris, K., et al., Optical Inline Measurement Procedures for Counting and Sizing Cells in Bioprocess Technology, 2009, pp. 125–142, DOI: 10.1007/10.
- [47] Rudolph, G., Brückerhoff, T., Bluma, A., Korb, G., et al., Optische Inline-Messverfahren zur Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung in der Bioprozesstechnik, *Chemie-Ingenieur-Technik*, 2007, 79, pp. 42–51, DOI: 10.1002/cite.200600110.
- [48] Sivaprakasam, S., Schuler, M. M., Hama, A., Hughes, K.-M., et al., Biocalorimetry as a process analytical technology process analyser; robust in-line monitoring and control of aerobic fed-batch cultures of crabtree-negative yeast cells, *J. Therm. Anal. Calorim.*, Jan. 2011, 104, pp. 75–85, DOI: 10.1007/s10973-010-1259-x.
- [49] Stockar, U., Marison, I., The use of calorimetry in biotechnology, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1989, 40, pp. 93–136, DOI: 10.1007/BFb0009829.

- [50] Stockar, U. von, Duboc, P., Menoud, L., Marison, I. W., On-line calorimetry as a technique for process monitoring and control in biotechnology, *Ther. Umschau*, 1997, 300, pp. 225–236, DOI: 10.1016/S0040-6031(97)00055-5.
- [51] Tamburini, E., Vaccari, G., Tosi, S., Trilli, A., Near-Infrared Spectroscopy: A Tool for Monitoring Submerged Fermentation Processes Using an Immersion Optical-Fiber Probe, *Appl. Spectrosc.*, 2003, 57, pp. 132–138.
- [52] Arnold, S. A., Gaensakoo, R., Harvey, L. M., McNeil, B., Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch *Escherichia coli* process., *Biotechnol. Bioeng.*, Nov. 2002, 80, pp. 405–13, DOI: 10.1002/bit.10383.
- [53] Navrátil, M., Norberg, A., Lembrén, L., Mandenius, C.-F., On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a *Vibrio cholerae* fed-batch cultivation., *J. Biotechnol.*, Jan. 2005, 115, pp. 67–79, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.07.013.
- [54] Cervera, A. E., Petersen, N., Lantz, A. E., Larsen, A., et al., Application of near-infrared spectroscopy for monitoring and control of cell culture and fermentation., *Biotechnol. Prog.*, 2009, 25, pp. 1561–81, DOI: 10.1002/btpr.280.
- [55] Marose, S., Lindemann, C., Scheper, T., Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a new tool for on-line bioprocess monitoring., *Biotechnol. Prog.*, 1998, 14, pp. 63–74, DOI: 10.1021/bp970124o.
- [56] Hantelmann, K., Kollecker, M., Hüll, D., Hitzmann, B., et al., Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a novel approach for controlling fed-batch cultivations., *J. Biotechnol.*, Feb. 2006, 121, pp. 410–7, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.07.016.
- [57] Podrazký, O., Kuncová, G., Krasowska, a, Sigler, K., Monitoring the growth and stress responses of yeast cells by two-dimensional fluorescence spectroscopy: first results., *Folia Microbiol. (Praha)*, Jan. 2003, 48, pp. 189–92.

- [58] Johansson, L., Lidén, G., A study of long-term effects on plasmid-containing *Escherichia coli* in carbon-limited chemostat using 2D-fluorescence spectrofluorimetry., *Biotechnol. Prog.*, 2006, 22, pp. 1132–9, DOI: 10.1021/bp060061m.
- [59] Teixeira, A. P., Portugal, C. a M., Carinhas, N., Dias, J. M. L., et al., In situ 2D fluorometry and chemometric monitoring of mammalian cell cultures., *Biotechnol. Bioeng.*, Mar. 2009, 102, pp. 1098–106, DOI: 10.1002/bit.22125.
- [60] Hisiger, S., Jolicoeur, M., A multiwavelength fluorescence probe: is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity?, *J. Biotechnol.*, Jun. 2005, 117, pp. 325–36, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.03.004.
- [61] Stärk, E., Hitzmann, B., Schügerl, K., Scheper, T., et al., In-Situ-Fluorescence-Probes: A Useful Tool for Non-invasive Bioprocess Monitoring, 74, T. Scheper, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002, pp. 21–38.
- [62] Brecker, L., Weber, H., Griengl, H., Ribbons, D. W., In situ proton-NMR analyses of *Escherichia coli* HB101 fermentations in  $1\text{H}_2\text{O}$  and in  $\text{D}_2\text{O}$ ., *Microbiology*, Dec. 1999, 145, pp. 3389–97.
- [63] Bradley, S. A., Ouyang, A., Purdie, J., Smitka, T. a, et al., Fermentanomics: monitoring mammalian cell cultures with NMR spectroscopy., *J. Am. Chem. Soc.*, Jul. 2010, 132, pp. 9531–3, DOI: 10.1021/ja101962c.
- [64] Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., Merchuk, J. C., Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview, *Biochem. Eng. J.*, May 2010, 49, pp. 289–307, DOI: 10.1016/j.bej.2010.01.011.
- [65] Palomares, L. A., López, S., Ramírez, O. T., Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected insect cell cultures, *Biochem. Eng. J.*, Jul. 2004, 19, pp. 87–93, DOI: 10.1016/j.bej.2003.12.002.
- [66] Zou, X., Hang, H., Chu, J., Zhuang, Y., et al., Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50 L to 372 m<sup>3</sup> scale., *Bioresour. Technol.*, Feb. 2009, 100, pp. 1406–12, DOI: 10.1016/j.biortech.2008.09.017.

- [67] Berrios, J., Altamirano, C., Osses, N., Gonzalez, R., Continuous CHO cell cultures with improved recombinant protein productivity by using mannose as carbon source: Metabolic analysis and scale-up simulation, *Chem. Eng. Sci.*, Jun. 2011, 66, pp. 2431–2439, DOI: 10.1016/j.ces.2011.03.011.
- [68] Kamen, A. A., Bédard, C., Tom, R., Perret, S., et al., On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures., *Biotechnol. Bioeng.*, Apr. 1996, 50, pp. 36–48, DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960405)50:1<36::AID-BIT5>3.0.CO;2-2.
- [69] Hao, X., Wang, Q., Zhang, X., Cao, Y., et al., Experimental evaluation of decrease in bacterial activity due to cell death and activity decay in activated sludge., *Water Res.*, Aug. 2009, 43, pp. 3604–12, DOI: 10.1016/j.watres.2009.05.019.
- [70] Rao, G., Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems., *Biotechnol. Bioeng.*, Dec. 2009, 104, pp. 841–53, DOI: 10.1002/bit.22566.
- [71] Behr, L., Joeris, K., Burnett, M., Scheper, T., A novel in situ probe for oxygen uptake rate measurement in mammalian cell cultures., *Biotechnol. Prog.*, 2011, 28, pp. 581–6, DOI: 10.1002/btpr.741.
- [72] Oeggerli, A., Eyer, K., Heinzle, E., On-line gas analysis in animal cell cultivation: I. Control of dissolved oxygen and pH., *Biotechnol. Bioeng.*, Jan. 1995, 45, pp. 42–53, DOI: 10.1002/bit.260450107.
- [73] Puyuelo, B., Gea, T., Sánchez, A., A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate, *Chem. Eng. J.*, Nov. 2010, 165, pp. 161–169, DOI: 10.1016/j.cej.2010.09.011.
- [74] Marison, I. W., von Stockar, U., The application of a novel heat flux calorimeter for studying growth of *Escherichia coli* W in aerobic batch culture., *Biotechnol. Bioeng.*, Dec. 1986, 28, pp. 1780–93, DOI: 10.1002/bit.260281205.
- [75] Birou, B., Marison, I. W., Stockar, U. V., Calorimetric investigation of aerobic fermentations., *Biotechnol. Bioeng.*, Oct. 1987, 30, pp. 650–60, DOI: 10.1002/bit.260300509.

- [76] von Stockar, U., Marison, I. W., Large-scale calorimetry and biotechnology, *Thermochim. Acta*, Dec. 1991, *193*, pp. 215–242, DOI: 10.1016/0040-6031(91)80185-L.
- [77] Rhee, J. Il, Kang, T.-H., On-line process monitoring and chemometric modeling with 2D fluorescence spectra obtained in recombinant *E. coli* fermentations, *Process Biochem.*, Jul. 2007, *42*, pp. 1124–1134, DOI: 10.1016/j.procbio.2007.05.007.
- [78] Grivet, J.-P., Delort, A.-M., NMR for microbiology: In vivo and in situ applications, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, Jan. 2009, *54*, pp. 1–53, DOI: 10.1016/j.pnmrs.2008.02.001.
- [79] Hemminga, M. A., NMR in Biotechnology, *J. Biotechnol.*, 2000, *77*, pp. 1–3.
- [80] Castro, P. M., Hayter, P. M., Ison, a P., Bull, a T., Application of a statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Oct. 1992, *38*, pp. 84–90. DOI: 10.1007/BF00169424
- [81] Majors, P. D., McLean, J. S., Scholten, J. C. M., NMR bioreactor development for live in-situ microbial functional analysis., *J. Magn. Reson.*, May 2008, *192*, pp. 159–66, DOI: 10.1016/j.jmr.2008.02.014.
- [82] Palomares, L. A., Ramirez, O. T., The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture., *Cytotechnology*, Jan. 1996, *22*, pp. 225–37, DOI: 10.1007/BF00353943.
- [83] Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview., *Biotechnol. Adv.*, 2009, *27*, pp. 153–76, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.
- [84] Feng, Q., Mi, L., Li, L., Liu, R., et al., Application of “oxygen uptake rate-amino acids” associated mode in controlled-fed perfusion culture., *J. Biotechnol.*, Apr. 2006, *122*, pp. 422–30, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.09.017.
- [85] Tremier, A., De Guardia, A., Massiani, C., Paul, E., et al., A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted., *Bioresour. Technol.*, Jan. 2005, *96*, pp. 169–80, DOI: 10.1016/j.biortech.2004.05.005.

- [86] Deshpande, R. R., Heinzle, E., On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors., *Biotechnol. Lett.*, May 2004, 26, pp. 763–7.  
DOI: 10.1023/B:BILE.0000024101.57683.6d
- [87] Schäfer, S., Schrader, J., Sell, D., Oxygen uptake rate measurements to monitor the activity of terpene transforming fungi, *Process Biochem.*, Oct. 2004, 39, pp. 2221–2228, DOI: 10.1016/j.procbio.2003.11.023.
- [88] Ganesh, R., Balaji, G., Ramanujam, R. a, Biodegradation of tannery wastewater using sequencing batch reactor-respirometric assessment., *Bioresour. Technol.*, Oct. 2006, 97, pp. 1815–21, DOI: 10.1016/j.biortech.2005.09.003.
- [89] Ruffieux, P. a, von Stockar, U., Marison, I. W., Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO<sub>2</sub>) oxygen uptake rates in animal cell cultures., *J. Biotechnol.*, Aug. 1998, 63, pp. 85–95.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00046-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00046-7)
- [90] Behr, L. C., Entwicklung und Anwendung innovativer Methoden in der Säugerzellkultivierung im Bioreaktor für die Herstellung von pharmazeutischen Proteinen, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2009.
- [91] Yoon, S. J., Konstantinov, K. B., Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors., *Biotechnol. Bioeng.*, Oct. 1994, 44, pp. 983–90, DOI: 10.1002/bit.260440815.
- [92] Jenkins, R. R., Friedland, R., Howald, H., The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle., *Int. J. Sports Med.*, Feb. 1984, 5, pp. 11–4, DOI: 10.1055/s-2008-1025872.
- [93] Nanri, H., Minakami, S., Heat production of pig platelets in relation with glycolysis and respiration., *Biomed. Biochim. Acta*, Jan. 1983, 42, pp. 315–21.
- [94] Powers, D. E., Millman, J. R., Huang, R. B., Colton, C. K., Effects of oxygen on mouse embryonic stem cell growth, phenotype retention, and cellular energetics., *Biotechnol. Bioeng.*, Oct. 2008, 101, pp. 241–54,  
DOI: 10.1002/bit.21986.

- [95] Papas, K. K., Pisanía, A., Wu, H., Weir, G. C., et al., A Stirred Microchamber for Oxygen Consumption Rate Measurements With Pancreatic Islets, *Biotechnol. Bioeng.*, 2007, 98, pp. 1071–1082, DOI: 10.1002/bit.
- [96] Goudar, C. T., Piret, J. M., Konstantinov, K. B., Estimating cell specific oxygen uptake and carbon dioxide production rates for mammalian cells in perfusion culture., *Biotechnol. Prog.*, 2011, 27, pp. 1347–57, DOI: 10.1002/btpr.646.
- [97] Stempin, I., Kovács, Z., Czermak, P., I. Stempin, Z. Kovács, P. C., Online monitoring of biomass concentration with the biO<sub>2</sub>mass sensor technology, *11. Dresdener Sens. Symp. 2013*, 2014, pp. 414–417, DOI: 10.5162/11dss2013/L2.
- [98] Kesdiren, E., Technische Charakterisierung eines neu entwickelten Sensors zur Bestimmung zellulärer Aktivität, *Bachelorarbeit*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2015.
- [99] Frister, T. H. W., Herstellung, Charakterisierung und Anwendung einer rekombinanten Patchouloisynthase zur biokatalytischen Herstellung von Sesquiterpenen, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2015.
- [100] Tromans, D., Temperature and pressure dependent solubility of oxygen in water: a thermodynamic analysis, *Hydrometallurgy*, 1998, 48, pp. 327–342, DOI: 10.1016/S0304-386X(98)00007-3.
- [101] Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H. J., et al., Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose, *Biochem. J.*, 2000, 347, pp. 553–559, DOI: 10.1042/0264-6021:3470553.
- [102] Presens Sensing GmbH, Instruction Manual: pH Sensor Spots HP5. Regensburg, p. 21, 2016.
- [103] aquasant Messtechnik AG - Trübungsmesstechnik, 2016. [Online]. Available: <http://www.aquasant-mt.com/Truebungsmesstechnik.62.0.html>. [Accessed: 25-Jul-2016].

- [104] Haack, M. B., Eliasson, A., Olsson, L., On-line cell mass monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* cultivations by multi-wavelength fluorescence, *J. Biotechnol.*, 2004, 114, pp. 199–208, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.05.009>.
- [105] Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., Meskanen, E., et al., On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 34, pp. 561–566, DOI: 10.1007/s10295-007-0233-5.
- [106] Whelan, J., Craven, S., Glennon, B., In situ Raman spectroscopy for simultaneous monitoring of multiple process parameters in mammalian cell culture bioreactors, *Biotechnol. Prog.*, 2012, 28, pp. 1355–1362, DOI: 10.1002/btpr.1590.
- [107] Blandino, A., Macías, M., Cantero, D., Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules, *Process Biochem.*, 2001, 36, pp. 601–606, DOI: 10.1016/S0032-9592(00)00240-5.
- [108] Zhu, H., Srivastava, R., Brown, Q., McShane, M. J., Combined physical and chemical immobilization of glucose oxidase in alginate microspheres improves stability of encapsulation and activity, *Bioconjug. Chem.*, 2005, 16, pp. 1451–1458, DOI: 10.1021/bc050171z.
- [109] Rode, B., Biosynthetische Produktion von humanidentischer Polysialinsäure in *Escherichia coli* K1, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2008.
- [110] Bice, I., Optimierung der biosynthetischen Produktion von Polysialinsäure und Oligosialinsäure aus *Escherichia coli* K1, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2012.
- [111] Ude, C., Evaluation einer optischen Multisensorplattform zur online-Überwachung relevanter Kultivierungs-Basisgrößen, *Masterarbeit*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2012.
- [112] Zagari, F., Jordan, M., Stettler, M., Broly, H., et al., Lactate metabolism shift in CHO cell culture: The role of mitochondrial oxidative activity, *N. Biotechnol.*, 2013, 30, pp. 238–245, DOI: 10.1016/j.nbt.2012.05.021.

- [113] Deshpande, R. R., Heinzle, E., Online monitoring of oxygen in spinner flasks, *Biotechnol. Lett.*, 2009, 31, pp. 665–669, DOI: 10.1007/s10529-009-9919-2.
- [114] Jorjani, P., Ozturk, S. S., Effects of Cell Density and Temperature on Oxygen Consumption Rate for Different Mammalian Cell Lines, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, 64, pp. 349–356, DOI: 0006-3592/99/030349-08.
- [115] Ducommun, P., Kadouri, A., Stockar, U. Von, Marison, I. W., On-Line Determination of Animal Cell Concentration in Two Industrial High-Density Culture Processes by Dielectric Spectroscopy, 2002, DOI: 10.1002/bit.1197.
- [116] Oezemre, A., Heinzle, E., Measurement of oxygen uptake and carbon dioxide production rates of mammalian cells using membrane mass spectrometry, *Cytotechnology*, 2001, 37, pp. 153–162.
- [117] Spektrum Akademischer Verlag, spezifische Wachstumsrate - Lexikon der Biochemie - Spektrum der Wissenschaft, 1999. [Online]. Available: <http://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/spezifische-wachstumsrate/5820>. [Accessed: 13-Jun-2016].
- [118] Lücking, T. H., Entwicklung einer universellen Bypass- Messkammer und Automatisierungsplattform für die Überwachung und Regelung von Tierzellkultivierungen, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2015.
- [119] FDA, U. S. D. of H. and H. S., Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, *FDA Off. Doc.*, 2004, p. 16, DOI: <http://www.fda.gov/CDER/guidance/6419fnl.pdf>.
- [120] Glassey, J., Gernaey, K. V., Clemens, C., Schulz, T. W., et al., Process analytical technology (PAT) for biopharmaceuticals, *Biotechnol. J.*, 2011, 6, pp. 369–377, DOI: 10.1002/biot.201000356.
- [121] WTW GmbH, Bestimmung der Trübung, 2003. [Online]. Available: [https://www.omnilab.de/tl\\_files/Omnilab\\_2011/Downloads/Infomaterial\\_Anwenderberichte/Elektrochemie/TURB\\_D.pdf](https://www.omnilab.de/tl_files/Omnilab_2011/Downloads/Infomaterial_Anwenderberichte/Elektrochemie/TURB_D.pdf). [Accessed: 06-Mar-2015].

- [122] Henry, W., Experiments on the Quantity of Gases Absorbed by Water, at Different Temperatures, and under Different Pressures, *Philos. Trans. R. Soc. London*, 1803, pp. 29–275.
- [123] Roth, G., The unfolded protein response pre and post methanol induction of *Komagataella (Pichia) pastoris* producing secretory Insulin precursor, *Dissertation*, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2015.
- [124] Brinkmann, M., Lütkemeyer, D., Gudermann, F., Lehmann, J., New technologies for automated cell counting based on optical image analysis ‘the Cellscreen,’ *Cytotechnology*, 2002, 38, pp. 119–127, DOI: 10.1023/A:1021118501866.
- [125] Guilbault, G. G., Lubrano, G. J., An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose, *Anal. Chim. Acta*, 1973, 64, pp. 439–455, DOI: 10.1016/S0003-2670(01)82476-4.
- [126] Wang, J., Glucose biosensors: 40 Years of advances and challenges, *Electroanalysis*, 2001, 13, pp. 983–988, DOI: 10.1002/1521-4109(200108)13:12<983::AID-ELAN983>3.0.CO;2-#.
- [127] Presens GmbH, FAQs: How does temperature affect my pH measurement?, 2016. [Online]. Available: <http://www.presens.de/support/faqs/question/how-does-temperature-affect-my-ph-measurement.html>. [Accessed: 25-Sep-2016].

## 9. Anhang

### 9.1 Material

In den folgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Medien, Standardlösungen, Puffer, Materialien und Geräte aufgelistet.

#### 9.1.1 Lösungen und Kulturmedien

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Medien. Nach dem Auflösen der Komponenten in VE-H<sub>2</sub>O werden die Kulturmedium im Autoklav sterilisiert. Medienzusätze, Glukose und Puffer werden jeweils separat sterilisiert und danach hinzugegeben.

	<b>LB</b>	<b>YPD</b>	<b>BYMG</b>	<b>Salz Medium <i>E. coli</i></b>	<b>Salz Medium <i>P. pastoris</i></b>
Bacto Pepton	10 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	20 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	20 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		
Biotin			0,4 mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		0,4 mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O				0,013 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	
CaH <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O					0,28 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
Glucose		10 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		20 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	25 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
Glycerol			50 mL		
Hefeextrakt	10 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	10 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	10 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>				9,3 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				1,1 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>			100 mmol L <sup>-1</sup>		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				2,03 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	9,4
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O					4,6
NaCl	5 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>			1,2 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	

	LB	YPD	BYMG	Salz Medium <i>E. coli</i>	Salz Medium <i>P. pastoris</i>
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>				10 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	15,7
YNB			1,34 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		
YTM-Lsg.					4,56
Spurensalzlsg.				1 mL L <sup>-1</sup>	
Antischaum Desmophen	0,2 mL L <sup>-1</sup>			0,2 mL L <sup>-1</sup>	
Antischaum Ucolub N115		1 mL L <sup>-1</sup>	1 mL L <sup>-1</sup>		1 mL L <sup>-1</sup>
pH-Wert	7,5	5,5	6,0	7,5	5,5

**Tabelle 4:** Medienzusätze. Alle Zusätze werden steril filtriert.

	Spurensalzlösung	YTM-Lösung
BH <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		46,3 mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O		12,0 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	150 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		9,2 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
KI		207,5 mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	
MnSO <sub>4</sub>		760,6 mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>		484 mg <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O		5,032 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>

**Tabelle 5:** Puffer und weitere Lösungen. Die Lösungen werden nach dem Auflösen im Autoklav sterilisiert.

	<b>PBS (x 10)</b>	<b>Saline</b>	<b>Natriumsulfit</b>
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O			0,1 g mL <sup>-1</sup>
KCL	2 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>		
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>			126,04 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>
NaCl	80 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	9 g <sup>-1</sup> L <sup>-1</sup>	
pH-Wert	7,5		

### 9.1.2 Formazin Standarddispersion nach ISO 7027

Zur Herstellung der Formazin Standarddispersion werden 10 g Hexamethylentetramin und 1 g Hydrazinsulfat jeweils in 100 ml VE-Wasser gelöst. Anschließend werden die beiden Lösungen zu gleichen Teilen gemischt und bei 25 °C ± 3 °C für 24 Stunden unter dem Abzug stehen gelassen. Formazin selbst entsteht dabei durch eine Kondensationsreaktion der beiden Ausgangsstoffe und ist ein wasserunlösliches Polymer. Bei dunkler Lagerung und Raumtemperatur ist die Dispersion für ca. 4 Wochen haltbar.[121]

### 9.1.3 Materialien und Geräte

**Tabelle 6:** Liste der in der vorliegenden Arbeit genutzten Materialien und Geräte.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
0,2 µm Luftfilter	Sartolab® P20	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
0,5 Liter Edelstahlreaktor	BIOSTAT® B	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
15 Liter Edelstahlreaktor	BIOSTAT® Cplus	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
15 Liter Edelstahlreaktor	BIOSTAT® C	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Abgasanalytik	BlueInOne Ferm	BlueSens gas sensor GmbH, Herten
Analysenwaage	AC 210 S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Analysenwaage	CP8201	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Autoklav	System V-150	System GmbH, Wettbergen
Automatischer Zellzähler	Cedex	Roche Innovatis AG, Penzberg
Autosampler	Div. Bauteile nach [118]	Institut für Technische Chemie, Hannover
Biochemischer Analysator	YSI 2700 und YSI 2950	YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA
Datenaufzeichnung Software	ProfiSignal	Delphin Technology AG, Bergisch Gladbach
Datenbank Software	SIPAT	SIPAT, Siemens Inc., Brüssel, Belgien
Einkanal-Pipette	Reference, Research, div. Größen	Eppendorf AG, Hamburg
Einkanal-Pipette	Transferpette® S, div. Größen	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Gasmischstation	E-7000	Bronkhorst Hogh-Tech, Ruurlo
Glasflaschen	SCHOTT Duran®, div. Größen	Schott AG, Mainz
Ingold-Probenahmeventil	SVC 25, B221610000103	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Inkubationsschüttler	KS 4000 ic control	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Inkubator	CH-4015	INFORS AG, Basel, Schweiz
Inkubator	HERAcell 240, CO2 Incubator	Thermo Electron Corp. Waltham, MA, USA
Klebefilm	Parafilm® M	American National Can Group, Chicago, USA
Magnetrührer	MSH basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Massendurchflussregler	EL-FLOW (0 – 2000 mL min <sup>-1</sup> )	Bronkhorst Hogh-Tech, Ruurlo
Messkammerbeschichtung	TiAlN-Beschichtung	Feilen Pieper, Wagenfeld
Messzylinder	diverse Größen	Omnilan-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen
Nutschenfilter	514-0342	VWR International GmbH, Darmstadt

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Offline OUR Gefäß	SensorVial SV-PSt3-20mL-YST	Presens GmbH, Regensburg
Petrischalen	94 mm, Kunststoff	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
pH-Elektrode	EASYFERM Plus	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
pH-Meter	HI 211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	Libra S50	Biochrom Ltd, Cambridge, UK
Photometerküvet- ten	Halbmikro	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Diverse Größen	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettierhelfer	Accu-jet pro®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
pO <sub>2</sub> -Sonde für 0,5 L Reaktor	InPro 6850i	Mettler Toledo GmbH, Gießen
pO <sub>2</sub> -Sonde für 10 L Reaktor	OXYFERM FDA	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
Probenröhrchen für Probensammler	PP 14 mL 100x16 mm	S-prep GmbH, Überlingen
Reaktionsgefäße	15 mL, 50 mL	Corning Inc, Corning
Reaktionsgefäße	1,5 mL, 2 mL	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Rührfisch 0,5 L Re- aktor	Rotilabo®-Dreikant-Mag- netstäbchen 1662.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sacova-Ventil	Safe Coupling Valve, DE-1002707	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
Schlauch für Schweißgerät	C-Flex Clear 082, 3/16"x5/16"	Saint-Gobain, Courbevoie, Frankreich
Schlauchsweiß- gerät	BioWelder® Konnektor 16370	Sartorius AG, Göttingen
Schüttelkolben	250 mL	Corning, Tewksbury, MA, USA
Schüttelkolben	Vier, ohne Schikanen, PC, 125 mL, 250 mL, 500 mL	Corning Inc, Corning
Schüttelkolben	Vier Schikanen, Duran®, 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L	Schott AG, Mainz
Schüttelschrank	Certomat® BS-1	B. Braun Biotech Internatio- nal GmbH, Melsungen
Serologische Pipet- ten	Stripette®, 1 -50 mL	Corning Inc, Corning
Silikonschlauch	div. Größen	VWR International GmbH, Darmstadt

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Sterilbank	MSC-Advantage 1.2	Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA, USA
Sterilbank	Herasafe	Thermo Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn
Sterilfilter	0,2 µm PTFE Midisart ®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sterilfilter	0,2 µm PTFE Minisart ®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sterilfilter	0,2 µm Minisart ®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Streulichtsonde	inPro8100	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Thermostat	Thermomix® ME	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Transmitter Streulichtsonde	M800	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Trockenschrank	BK 5060 E	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vakuumpumpe	N811KN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Vortex Mixer	Whirlmix	FISION Scientific Co. Samjeong-Dong
Wasseraufbereitungsanlage	Arium® 661 Ultrapure water system	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Wasserbad	WNB 14	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	Julabo 6A	Julabo GmbH, Seelbach
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge	Pico Heraeus	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn

#### 9.1.4 Materialien und Bauteile für den ISICOM

**Tabelle 7:** Liste der Materialien und Bauteile für den ISICOM.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
CAD-Software	Autodesk Inventor Professional 2014	Autodesk, Inc., San Rafael, CA, USA
Dampfschlauch	SS-FJ4TA4TA4-100CM	BEST Fluidsysteme GmbH, Brackel

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
EPDM Membran	1,5 mm Stärke	Kautasit Gummitechnik GmbH, Dresden
EPDM O-Ringe	div. Größen	C. Otto Gehrckens GmbH & Co. KG, Pinneberg
Erweiterungskarte	Pi Face	OpenLX SP Ltd, UK
FDM-Drucker	MakerBot Replicator Z18	Stratasys GmbH, Rheinmünster
LED	SFH480-2 T018	Osram Opto Semiconductors, Regensburg
Lichtleiter	POF-L2.5-1SMA	Presens GmbH, Regensburg
Lichtleiter IR	FCR-7IR200-2-ME-3X250	Avantes Inc., Niederlande
Lichtleiterführung	Aus Polyoxymethylen	Institut für Technische Chemie, Hannover
Motorsteuereinheit	SMCI12	Nanotec GmbH & Co. KG, Feldkirchen
Netzteil für Steuereinheit	Schaltnetzteil 76,8 W, 3,2 A, 24 V	reichelt elektronik GmbH & Co. KG, Sande
Optisches Fenster	1mm Quarz-Glas	Aachener Quarz-Glas Technologie Heinrich, Aachen
pH-Messgerät	pH-4 Mini	Presens GmbH, Regensburg
Photodiode	SD 112-45-1-221	Advanced Photnoix, Inc, USA
pH-Patch	SP-HP5-D3-US	Presens GmbH, Regensburg
pO <sub>2</sub> -Patch	SP-PSt3-YAU-D3-YOP	Presens GmbH, Regensburg
Reduzierstück	SS-400-R-2	BEST Fluidsysteme GmbH, Brackel
Ringmagnet	RM-12x04x06-N-D	magnets4you GmbH, Lohr a. Main
Rührfisch	Rotilab®-Micro PK70.1	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Rührmotor	SP1018M	Nanotec GmbH & Co. KG, Feldkirchen
Sauerstoffmessgerät	OXY4-Mini	Presens GmbH, Regensburg
Silikonkleber	SG1 Silicone Glue	Presens GmbH, Regensburg
Sterilkappe	SV25/SVC25	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Steuerrechner	Raspberry Pi Model B+	Raspberry Pi Foundation, UK
Ventil/Kükenhahn	SS-2P4T	BEST Fluidsysteme GmbH, Brackel
Verstellmotor	L4118M1804-T5x5	Nanotec GmbH & Co. KG, Feldkirchen

## 9.1.5 Chemikalien

**Tabelle 8:** Liste der in der vorliegenden Arbeit genutzten Chemikalien.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol	Sigma-Aldrich, München
Agar-Agar	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniaklösung 25% NH <sub>4</sub> OH	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Ammoniumsulfat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Fluka, Buchs, Schweiz
Antischaum Ucolub N115	Fragol GmbH + Co. KG
Biotin, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	Biochrom, Berlin
Borsäure H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Fluka, Buchs, Schweiz
D-(+)-Glucose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Desmophen 3900	Bayer AG, Leverkusen
di-Kaliumhydrogenphosphat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO) (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	Sigma-Aldrich, München
di-Natriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
Eisenchlorid, FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, München
Eisensulfat, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, München
Glutamin, C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Biochrom, Berlin
Glycerol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	AppliChem, Darmstadt
Hefextrakt	Sigma-Aldrich, München
Hexamethylentetramin, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
Hydrazinsulfat, N <sub>2</sub> H <sub>6</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid, KCl	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem, Darmstadt
Kaliumiodid KI	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Kaliumsulfat K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Kalziumhydrid $\text{CaH}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, München
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fluka, Buchs, Schweiz
Mangansulfat, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, $\text{NaCl}$	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid, $\text{NaOH}$	Merck, Darmstadt
Natriummolybdat $\text{Na}_2\text{MoO}_4$	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Natriumsulfit, $\text{Na}_2\text{SO}_3$	Fluka, Buchs, Schweiz
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Salzsäure, $\text{HCl}$	Sigma-Aldrich, München
Schwefelsäure $\text{H}_2\text{SO}_4$	Carl Roth GmbH + Co. KG., Karlsruhe
Trypanblau, $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_4$	Biochrom, Berlin
Yeast nitrogen base w/o amino acids and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Becton, Dickinson and Company, USA
Zellkulturmedium CHOMACS CD	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zinksulfat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, München

## 9.2 Methoden

### 9.2.1 Konstruktion, Messung und Datenauswertung des ISICOM

Die folgenden Kapitel geben Informationen über die Entwicklung und Nutzung des ISICOM im Rahmen der in dieser Arbeit gezeigten Experimente.

#### 9.2.1.1 Konstruktion und Bau

Alle Entwürfe des ISICOM wurden mit der CAD (*computer aided design*)-Software Autodesk Inventor Professional 2015 (*Autodesk, Inc., San Rafael, CA, USA*) erstellt. Der Bau aus Edelstahl erfolgte in der institutseigenen Mechanikwerkstatt. Teile der Verstelleinheit sind zudem mit einem 3D-Drucker nach dem FDM (*Fused Deposition Modeling*) Verfahren hergestellt worden (*MakerBot Replicator Z18, Stratasys GmbH, Rheinmünster*).

#### 9.2.1.2 Messstation zur Sensorcharakterisierung im 0,5 L Maßstab

Für die Charakterisierungsexperimente im 0,5 L Maßstab wurde ein Edelstahl-Reaktor (Eigenbau, *Institut für Technische Chemie, Universität Hannover*) in Verbindung mit einer Biostat B DCU (*digital control unit*) (*Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen*), zur Regelung des pH-Werts, des Gelöst-Sauerstoffgehalts sowie der Temperatur, genutzt. Der Reaktor verfügt über Standard PG-13,5 Ports im Deckel zur Installation von pH-,  $pO_2$  (*InPro 6850i, Mettler Toledo GmbH, Gießen*)- und Temperatursonden (Pt100), sowie zwei 25 mm Ingoldports, von denen einer zum Einbau des ISICOM genutzt wurde. Ein Doppelmantel diente zur Temperaturregulation des Inhalts. Für die Durchmischung wurde der Reaktor auf einem Magnetrührer platziert (*MSH basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen*) und mittels Rührfisch (*Rotilabo®-Dreikant-Magnetstäbchen 1662.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe*) auf Stufe 4 gerührt. Die Prozessgase Druckluft und Stickstoff konnten über einen *Sparger* zugeführt werden, wobei ein digitaler Gasmischer (*E-7000, Bronkhorst High-Tech, Ruurlo*) in Verbindung mit zwei Massendurchflussreglern (*EL-FLOW, Bronkhorst High-Tech, Ruurlo*) zur Regelung der Begasungsrate und Mischungsverhältnis diente. Um Verdunstung zu vermeiden, ist ein Abluftkühler am Gasausgang des Re-

aktors befestigt worden. Die Steuerung des Massendurchflussreglers und die Datenaufzeichnung erfolgte mit der Software ProfiSignal (*Delphin Technology AG*, Bergisch Gladbach).

#### 9.2.1.3 Sensorkalibration und Installation

Die Montage der *Sensorpatches* der pO<sub>2</sub>- und pH-Optoden (SP-PSt3-YAU-D3-YOP und SP-HP5-D3-US, *Presens GmbH*, Regensburg) wurden mittels Silikonkleber (SG1 Silicone Glue, *Presens GmbH*, Regensburg) auf dem optischen Fenster des ISICOM nach den Herstellerangaben befestigt. Nach der Montage wurde mindestens 12 Stunden bis zur ersten Verwendung gewartet, damit der Klebstoff vollständig aushärtet.

Vor jedem Experiment sind die Sensoren gemäß den Herstellerangaben kalibriert worden. Im Fall der pO<sub>2</sub>-Optode wurde zum Festlegen des Werts für 100 %-sat der jeweilige Reaktor mit Wasser gefüllt, gerührt und temperiert. Durch 20-minütige Begasung mit Druckluft über einen *Sparger* wurde die Lösung mit Luft gesättigt und die Begasung gestoppt. Nach weiteren 10 Minuten wurde der Wert für 100%-sat in der Software festgelegt. Durch 20-minütige Begasung mit Stickstoff konnte der 0 %-sat Wert ermittelt werden.

Zur Kalibration der pH-Optode sind die Kalibrationsdaten, die der jeweiligen Charge beiliegen, in die *Gerätesoftware* eingegeben worden.

#### 9.2.1.4 Messparameter, Datenauswertung und OUR-Berechnung

Bei allen Kultivierungen erfolgte die (q)OUR Messung im Abstand von jeweils 5 Minuten. Der ISICOM ist so konfiguriert, dass die Messkammer nach dem Schließen den pO<sub>2</sub>- bzw. pH-Wert mit der maximalen Messfrequenz von 3 s erfasst. Sobald der Sauerstoffpartialdruck unter 5 %-sat sinkt oder die Kammer 300 s lang geschlossen ist, wird sie automatisch wieder geöffnet und das separierte Volumen freigegeben. Die Ermittlung der Trübung erfolgt sekundlich. Die Trübungswerte einer kompletten Messung bei geschlossener Kammer werden gemittelt und für die qOUR Berechnung sowie Kalibration genutzt. Der Rührer durchmischt die Kammer während der Messung mit 200 rpm.

Bei geöffneter Kammer ist der Rührer gestoppt und die  $pO_2$  sowie pH-Wert Messfrequenz reduziert sich auf 15 s, um den Indikatorfarbstoff weniger zu beanspruchen. Die Trübung wird weiterhin sekundlich aufgezeichnet. Zur Datenauswertung und Kalibration der Trübungswerte bei geöffneter Kammer wurden diese im Nachhinein über den gesamten Kulturverlauf mit einem Medianfilter (Fensterbreite 10) geglättet. Die Zuordnung der *offline* Referenzwerte zu den nächstgelegenen Trübungswerten bei geöffneter und geschlossener Kammer erfolgte mit Hilfe der Excel-Funktion „VERWEIS“.

Die Berechnung der Sauerstoffaufnahme aus der Steigung des  $pO_2$  Verlaufs in %-sat. erfolgte nach Gleichung ( 9 ):

$$OUR_{ISICOM} = \frac{\left| \frac{dc_L}{dt} \right|}{100\%} \cdot c_L^*(T) \quad (9)$$

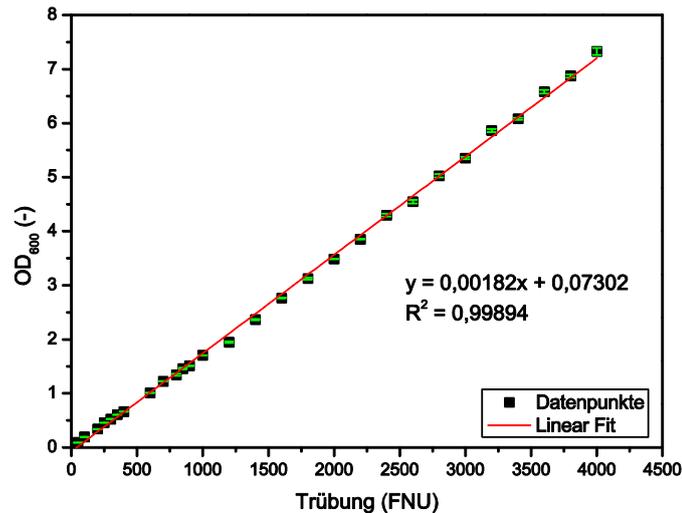
Mit  $\frac{dc_L}{dt}$  als Steigung in %-sat/s und  $c_L^*(T)$  als Sauerstoffsättigungskonzentration der Lösung bei gegebener Temperatur  $T$  in  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Die jeweilige Sättigungskonzentration kann nach dem Gesetz von Henry berechnet werden. Demnach ist die Konzentration eines Gases in der Flüssigkeit direkt proportional zum Partialdruck des Gases über der Flüssigkeit (Gleichung ( 10 )). [122]

$$c_L^* = H \cdot pO_{2atm} \quad (10)$$

Mit  $H$  als Henry-Koeffizient, welcher für ein Gas spezifisch und temperaturabhängig ist, sowie dem Sauerstoffpartialdruck in Luft  $pO_{2atm}$  bei Atmosphärendruck.

### 9.2.2 Messung mit Formazin als Kalibrationsstandard

Formazin ist eine polymere Verbindung, welche aus Hydrazinsulfat und Hexamethylentramin hergestellt wird. Sie dient bei der Kalibration von Trübungsmessungen mit Photometern als primäres Standardmaterial und ist bei Raumtemperatur und dunkler Lagerung bis zu vier Wochen haltbar. Die Trübung einer frischen, unverdünnte Formazindispersion beträgt 4.000 FNU (*Formazin Nephelometrie Unit*). Durch Verdünnen mit VE-Wasser können verschiedene Trübungen zur Kalibration erzeugt werden. Abbildung 44 zeigt den Zusammenhang zwischen FNU und  $OD_{600}$  ermittelt mit einem Spektralphotometer (Libra S50, *Biochrom Ltd*, Cambridge, UK).



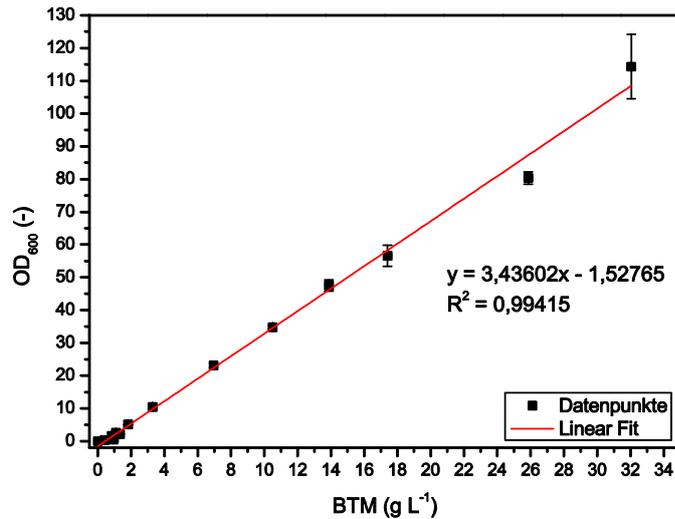
**Abbildung 44:** Zusammenhang zwischen FNU und OD<sub>600</sub> ermittelt mit einem Spektralphotometer in Dreifachbestimmung. Ab einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurden die Proben entsprechend verdünnt.

Zur Messung der Formazindispersion mit dem ISICOM wurde der Sensorstempel mit Optode in der Messlösung positioniert oder die Lösung direkt in die Messkammer gefüllt. Sobald sich ein stabiles Signal eingestellt hatte, wurde dieses zur Kalibration genutzt.

### 9.2.3 Messung von Zellsuspensionen mit konstanter Konzentration

Für die Messung von *E. coli* und *S. cerevisiae* Zellsuspensionen, bei denen sich die Trübung nicht ändert, wurden Zellen einer Schüttelkultur zweimal bei 2.500 xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und mit jeweils 30 mL gekühlter PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift diente das resuspendierte Pellet als Basis für Verdünnungsreihen. Bis zur Messung wurden die Verdünnungen bei 4 °C gelagert.

Zur Messung der Verdünnungen der Zelllösung mit dem ISICOM wurde der Sensorstempel mit Optode in der Messlösung positioniert oder die Lösung in die Messkammer gefüllt. Sobald sich ein stabiles Signal eingestellt hatte, wurde dieses zur Kalibration genutzt. Als Referenzmessung sind die Proben photometrisch vermessen (OD<sub>600</sub>) sowie ihre Biotrockenmasse bestimmt worden. Der Zusammenhang zwischen OD<sub>600</sub> und BTM ist für *E. coli* K1 in Abbildung 45 dargestellt.



**Abbildung 45:** Zusammenhang zwischen OD<sub>600</sub> und BTM für *E. coli* K1.

#### 9.2.4 Mikrobielle Arbeiten

Tabelle 9 listet die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen auf. Alle mikrobiellen Arbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen.

**Tabelle 9:** Übersicht der verwendeten Mikroorganismen.

Spezies	Stamm	Medium
<i>E. coli</i>	K1	LB; definiertes Salzmedium
<i>S. cerevisiae</i>	H1024	PYD
<i>P. pastoris</i>	X33-IP	BMMY; BMGY; Definiertes Medium
CHO	K1-HP	CHOMACS CD

##### 9.2.4.1 Stammhaltung

Die Stammhaltung der Mikroorganismen erfolgte in 1,5 mL Kryokulturen. Die Bakterien und Hefen wurden dazu jeweils bis zum Ende der exponentiellen Phase im entsprechenden Medium kultiviert und dann zur Lagerung bei -80°C 1:1 mit

80% (v/v) Glycerin gemischt. Die Säugerzellkulturen wurden im CHOMACS CD Medium (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach), versetzt mit 10% DMSO Lösung, über flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 9.2.4.2 Schüttelkolben Kultur *E. coli*

Für die Schüttelkolben Kultivierungen wurden jeweils 100 mL LB-Medium in einen 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen gegeben und mit 100  $\mu$ L einer Kyrokultur inokuliert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Kultur bei 37 °C und 130 min<sup>-1</sup> für 8-9 Stunden (ca. OD<sub>600</sub> ~ 6).

#### 9.2.4.3 Schüttelkolben Kultur *P. pastoris*

Zur Kultivierung von *P. pastoris* in Schüttelkulturen wurden die Pellets von Kyrokulturen in BMMY Medium verdünnt, auf 2% BMGY-Agar ausplattiert, einzelne Kulturen isoliert und in 25 mL BMYG-Komplexmedium in 100 mL Schüttelkolben mit Schikanen überführt. Nach Inkubation bei 30 °C und 160 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 5 wurde aus dieser Kultur eine weitere 100 mL Vorkultur in 500 mL Schüttelkolben inokuliert und unter gleichen Bedingungen bis zu OD<sub>600</sub> ~ 5 inkubiert. Schließlich diente diese Kultur zur Inokulation der Vorkultur für die Reaktorkultivierungen. Dazu wurden zwei 2 L Schüttelkolben (mit Schikanen) mit 500 mL des definierten Mediums gefüllt, auf OD<sub>600</sub> ~ 0,5 angeimpft und ebenfalls bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. [123]

#### 9.2.4.4 Schüttelkolben Kultur *S. cerevisiae*

Die Schüttelkolben Kultivierungen von *S. cerevisiae* erfolgten in jeweils 100 mL YPD-Medium in einen 500 mL Schüttelkolben mit Schikanen gegeben und mit 100  $\mu$ L einer Kyrokultur inokuliert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Kultur bei 30 °C und 130 min<sup>-1</sup>.

#### 9.2.4.5 Schüttelkolben Kultur CHO K1

Für die CHO-K1 (*AG Zellkulturtechnik*, Universität Bielefeld) Kultivierung wurde ein Schüttelkolben ohne Schikanen mit CHOMACS CD-Medium, versetzt mit 8 mM L-Glu-

tamin, gefüllt. Nach Zugabe einer Kryokultur wurde die Kultur bei 37°C unter Schütteln für ca. 4 Tage inkubiert. Innerhalb dieser Zeit erreichten die Zellen eine Konzentration von ungefähr  $1 \cdot 10^7$  Zellen·mL<sup>-1</sup> und wurden auf eine Zellkonzentration von  $4 - 5 \cdot 10^5$  Zellen·mL<sup>-1</sup> passagiert. Wenn die Zellen für eine Reaktorkultivierung verwendet werden sollten, erfolgte nach mindestens zwei Passagen eine Expansion auf ein ausreichendes Inokulationsvolumen.

### 9.2.5 Reaktorkultivierungen

Der ISICOM wurde im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Reaktorkultivierungen im 10 L Maßstab erprobt. *E. coli* und *P. pastoris* wurden in einem Biostat C (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, ehemals B. Braun Biotech International) durchgeführt. Die Kultivierung der CHO Zellen erfolgte in einem Biostat Cplus (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Der grundsätzliche Aufbau der beiden Reaktorsysteme ist identisch und sie unterscheiden sich lediglich im Funktionsumfang der Steuereinheit (DCU).

Die Systeme bestehen aus einem 15 L Edelstahlreaktor mit 10 L Arbeitsvolumen. Der Kessel ist vollständig SIP fähig und verfügt über einen Doppelmantel mit Thermostat zur Temperierung. Über verschiedene Deckelzugänge und Standard 25 mm Ingoldports können Messsonden, Anstechgarnituren, ein Probenahmeventil oder weitere externe Apparaturen angeschlossen werden. Die Rührung erfolgt über den Deckel, wobei die Konfiguration der Rührer von dem kultivierten Organismus abhängig ist. Alle zugeführten Gase werden durch einen Sterilfilter mit 0,2 µm Porenweite geführt und das Abgas wird nach dem Austritt aus dem Reaktor gekühlt.

Bei allen Prozessen wurde zu *online* Analytik der pH-Wert (EASYFERM Plus, Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst) der pO<sub>2</sub>-Wert (OXYFERM FDA, Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst) sowie die Temperatur (Pt100) überwacht und über die DCU geregelt. Bei den mikrobiellen Prozessen stand zudem eine Abgasanalytik mittels BlueInOne Ferm (BlueSens gas Sensor GmbH, Herten) zur Verfügung.

#### 9.2.5.1 *E. coli* K1

Der ISICOM wurde an *E. coli* K1 in einem *Batch*-Prozess zur Produktion von humanidentischer Polysialinsäure ( $\alpha$ 2,8-verknüpfte 5-N-Acetylneuraminsäure, polySia)

getestet, welche im *Tissue Engineering* Einsatz findet. Dort dient sie zum Beispiel als Gerüstmaterial für die Regeneration von Nervenzellen [110].

Der Prozess dient als Modell, da hierfür sowohl die optimalen Kultivierungsbedingungen eingehend untersucht wurden als auch ein chemisch definiertes Medium zur Verfügung steht (siehe Kapitel 9.1.1) [109, 110]. Als Inokulum dienten 100 mL einer *E. coli* K1 Schüttelkultur in LB-Medium bei einer OD<sub>600</sub> von 6. Tabelle 10 fasst die Kultivierungsbedingungen zusammen. Während der Kultivierung wurden regelmäßig steril *offline* Proben entnommen.

**Tabelle 10:** Kultivierungsbedingungen 10 L *E. coli* K1 *Batch*-Prozess, nach[109, 110]

Parameter	Eigenschaft
Kulturmedium	Definiertes Salzmedium
Temperatur	30 °C
Rührwerk	1000 rpm, 4 Rushton-Turbinen
Begasung	10 L·min <sup>-1</sup> über Ringsparger
pH	7,5 geregelt mit HCL und NaOH
pO <sub>2</sub>	20 %-sat über Rührer geregelt
Inokulum	OD <sub>600</sub> 0,2 - 0,5

#### 9.2.5.2 *P. pastoris*

Die *Batch*-Kultivierung von *P. pastoris* diene als Modellprozess zur Erprobung des ISICOM bei hohen Biomassekonzentrationen. Als Medium diene ein definiertes Salzmedium (siehe Kapitel 9.1.1). Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Als Inokulum dienten Vorkulturen, wie in Kapitel 9.2.4.3 beschrieben. Während der Kultivierung wurden regelmäßig steril *offline* Proben entnommen.

**Tabelle 11:** Kultivierungsbedingungen 10 L *P. pastoris* Batch-Prozess, nach [123].

<b>Parameter</b>	<b>Eigenschaft</b>
Kulturmedium	Definiertes Medium
Temperatur	30 °C
Rührwerk	Kaskadierend 150 - 1000rpm, 4 Rushton-Turbinen
Begasung	25 L·min <sup>-1</sup> Druckluft, Ringsparger
pH	5,5 geregelt mit 12,5 % (v/v) Ammoniak und HCL
pO <sub>2</sub>	20 %-sat.
Inokulum	OD <sub>600</sub> 0,2 - 0,5

### 9.2.5.3 CHO K1

Die CHO K1 Reaktorkultivierung erfolgte mit einem Arbeitsvolumen von 7,5 L in chemisch definiertem CHOMACS CD Medium, dem 300 mL L-Glutamin (8 mM) zugesetzt wurden. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Mittels einer automatischen Probenahme wurden regelmäßig *offline* Proben entnommen und einmal täglich zur Bestimmung der Zell-, Glukose-, Laktat- und Glutaminkonzentration entsprechend den Protokollen aus [118] vermessen.

**Tabelle 12:** Kultivierungsbedingungen des 7,5 L CHO K1 *Batch*-Prozesses.

<b>Parameter</b>	<b>Eigenschaft</b>
Kulturmedium	CHOMACS CD + 8 mM L-Glutamin
Temperatur	37 °C
Rührwerk	100 rpm, Rushton Turbine oberhalb des Mediums zur Schaumentfernung Schrägblatt-Rührer unterhalb der Oberfläche Rushton Turbine am unteren Ende der Rührwelle

Parameter	Eigenschaft
Begasung	Kopfraumspülung mit Druckluft, Regelbares Druckluft Sauerstoffgemisch über Ringsparger (max. 1 L·min <sup>-1</sup> )
pH-Wert	7,1 geregelt über 1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und CO <sub>2</sub> (über Sparger)
pO <sub>2</sub>	40 %-sat. über Begasungsrate und Luft/Sauerstoffgemisch
Inokulum	4 – 5·10 <sup>5</sup> Zellen·mL <sup>-1</sup>

#### 9.2.5.4 Datenaufzeichnung

Die Software ProfiSignal (*Delphin Technology AG*, Bergisch Gladbach) diente bei den Kultivierungen zur automatische Aufzeichnung von den *online* Daten von Rührerdrehzahl, Temperatur, Gelöst-Sauerstoffgehalt, Abgaszusammensetzung (CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>), Trübungsdaten, ISICOM-Messdaten und pH-Wert. Bei der CHO Kultivierung erfolgte die Datenaufzeichnung zusätzlich über die Software MFCS (*Sartorius Stedim Biotech GmbH*, Göttingen).

#### 9.2.5.5 Abgasanalytik und Gasmassenbilanzierung

Zur Abgasanalytik während der *E. coli* und *P. pastoris* Kultivierungen wurde ein BlueInOne Ferm (*BlueSens gas sensor GmbH*, Herten) verwendet. Das Gerät misst sowohl die Sauerstoff- als auch Kohlendioxidkonzentration. Es muss vor jeder Kultivierung einmalig für 30 Minuten mit dem Prozessgas gespült und anschließend kalibriert werden. Die Messung des Sauerstoffgehalts basiert auf einer Zirkoniumdioxid-Sonde. CO<sub>2</sub> wird spektroskopisch basierend auf IR-Absorption detektiert. Zur OUR Bestimmung mittels Gasmassenbilanzierung nutzt die Software des BlueInOne Gleichung ( 11):

$$OUR = \frac{\dot{V}_{G\,ein} \cdot p^\alpha}{V_L \cdot R \cdot T} \cdot \left( y_{ein}^{O_2} - \frac{1 - y_{ein}^{O_2} - y_{ein}^{CO_2}}{1 - y_{aus}^{O_2} - y_{aus}^{CO_2}} \cdot y_{aus}^{O_2} \right) \quad (11)$$

Mit:

$\dot{V}_{G\,ein}$ :	Volumenstrom des eintretenden Gases	[L·h <sup>-1</sup> ]
$p^\alpha$ :	Normaldruck	1,0133 bar
$V_L$ :	Flüssigvolumen des Reaktors	[L]
$R$ :	Gaskonstante	8,214·10 <sup>-2</sup> bar L·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>
$T$ :	Temperatur	273,15 K
$y_{ein}^{O_2}$ :	Molenbruch von O <sub>2</sub> im Gaseintritt	0,2097
$y_{aus}^{O_2}$ :	Molenbruch von O <sub>2</sub> im Gausaustritt	gemessener Wert / 100
$y_{ein}^{CO_2}$ :	Molenbruch von CO <sub>2</sub> im Gaseintritt	0,0004
$y_{aus}^{CO_2}$ :	Molenbruch von CO <sub>2</sub> im Gausaustritt	gemessener Wert / 100

### 9.2.6 Offline Analytik

Aufzählung und Erläuterung über die verwendete *offline* Analytik.

#### 9.2.6.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte der Bakterien und Hefekulturen wurde bei Raumtemperatur in einem Photometer (Libra S50, *Biochrom Ltd*, Cambridge, UK) bei einer Wellenlänge von 600 nm in 1,5 mL Einwegküvetten (Halbmikroküvette, *Sarstedt AG & Co. KG*, Nümbrecht) bestimmt. Um im linearen Messbereich des Geräts zu messen, wurden die Proben ab einer OD<sub>600</sub> größer 0,6 entsprechend mit 0,9 % NaCl (Saline) verdünnt. Saline diente zudem als Referenz zur Nullwertbestimmung. Die Messungen erfolgten stets in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung.

#### 9.2.6.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden jeweils 1,5 mL einer Probe in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gefüllt. Das Leergewicht dieser Gefäße wurde zuvor nach Trocknung im Trockenschrank und Abkühlung im Exsikkator ermittelt. Die Probe wurde anschließend für 5 Minuten bei 13.000 xg zentrifugiert und der Überstand

für weitere Analysen abgenommen bzw. eingefroren. Das Zellpellet konnte anschließend im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet und die Differenz zum Leergewicht bestimmt werden. Die BTM-Bestimmungen erfolgten in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung.

#### 9.2.6.3 Zellkonzentrationsmessungen

Zur Messung der Zellkonzentration und Viabilität der CHO Zellen wurde der automatische Zellzähler Cedex (*Roche Innovatis AG*, Penzberg) verwendet. Basierend auf Mikroskopaufnahmen, die von den Zellen beim Durchtritt einer Durchlaufzelle erstellt werden, kann die Zählung mittels Bildauswertalgorithmus erfolgen. Lebende und nekrotische Zellen werden dabei durch automatisches Anfärben mit Trypanblau unterschieden. Dieser Farbstoff dringt nur durch die Plasmamembran von toten Zellen, wodurch diese deutlich blau in der Aufnahme erscheinen [124]. Alle Messungen erfolgten zur statistischen Absicherung in Dreifachbestimmung und der Einstellung „*superior*“, bei der pro Probe 30 Bildaufnahmen ausgewertet werden. Um stets innerhalb des Messbereichs des Cedex zu messen, wurden die Proben bei einer Überschreitung von  $1 \cdot 10^7$  Zellen·mL<sup>-1</sup> zuvor manuell mit PBS verdünnt.

#### 9.2.6.4 Nährstoff- und Metabolitkonzentrationsmessungen

Die Bestimmung der Konzentration von Glutamin, Laktat und Glukose erfolgt aus dem Überstand der Kulturproben mit dem Analysator YSI 2950 (*KREIENBAUM Wissenschaftliche Meßsysteme e.K.*, Langenfeld).

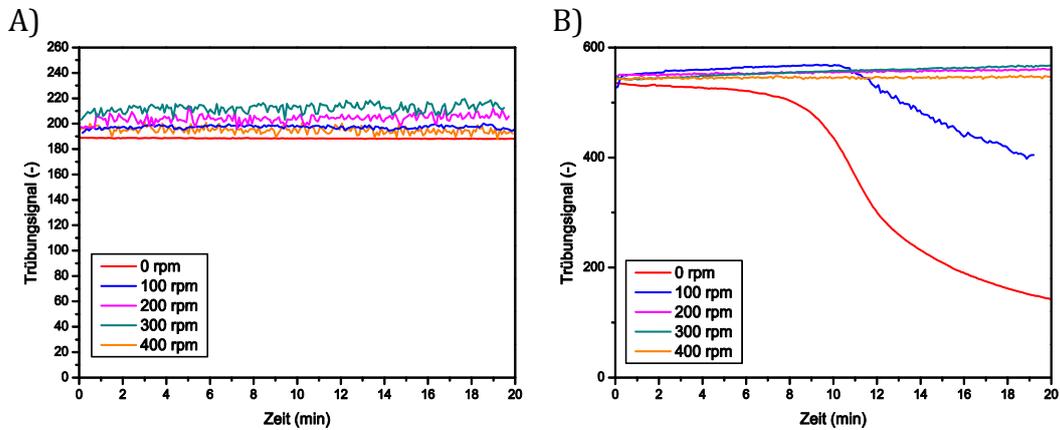
Auf der jeweiligen analytspezifischen Membran wird das Substrat durch ein immobilisiertes Enzym stöchiometrisch zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt. Als *Transducer* wirkt eine Platinelektrode, an der das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Sauerstoff oxidiert wird. Dabei entsteht ein Strom, der proportional zur Analytkonzentration ansteigt und gemessen wird. [6, 125, 126]

Um Fehler durch manuelle Verdünnung zu vermeiden, wurden alle Proben unverdünnt analysiert. Eine Ausnahme bildet die Glutaminbestimmung, da die Ausgangskonzentration im Medium außerhalb des Messbereichs des Gerätes liegt.

Diese Proben wurden innerhalb der ersten 48 Stunden 1:2 verdünnt. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung. Zur Minimierung des Gerätefehlers erfolgte nach jeder fünften Probe eine automatische Kalibrierung.

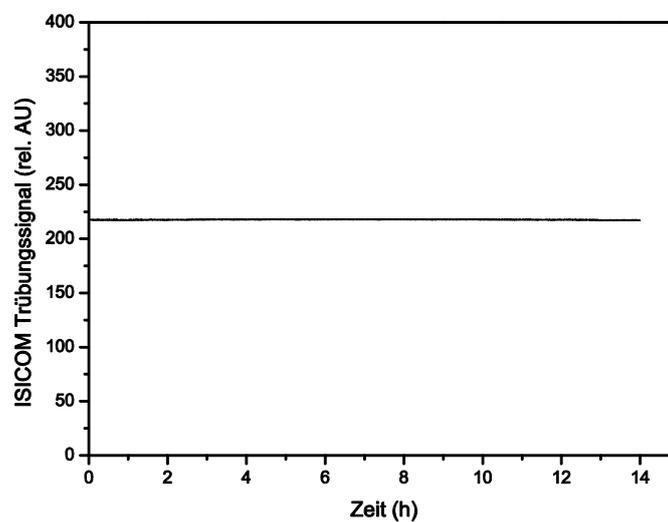
### 9.3 Ergänzende Graphen

#### 9.3.1 Ermittlung der optimalen Rührfrequenz mit *E. coli* und *S. cerevisiae*



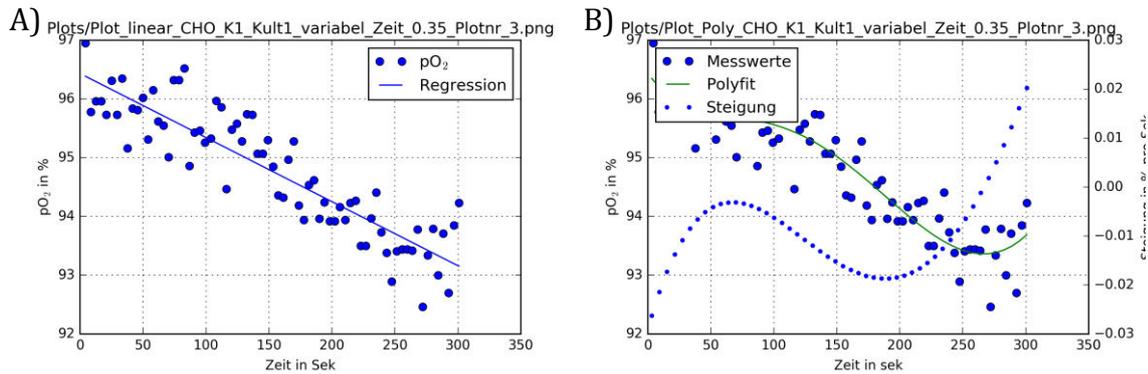
**Abbildung 46:** Zeitlicher Verlauf des Trübungssignals in der Messkammer bei verschiedenen Rührerdrehzahlen für (A) *E. coli* und (B) *S. cerevisiae*.

#### 9.3.2 Langzeitstabilität der Trübungsmessung mit dem ISICOM



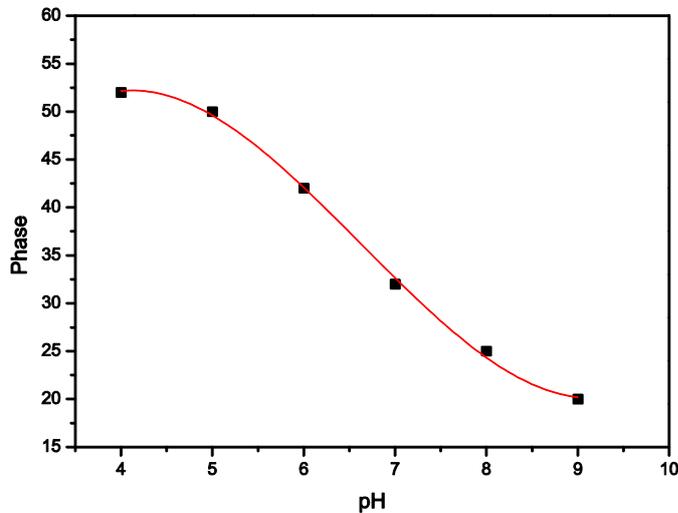
**Abbildung 47:** Langzeitstabilität des Trübungssignals des ISICOMs bei konstanten Umgebungsbedingungen.

### 9.3.3 Variable lineare oder polynomische Auswertung der Steigung



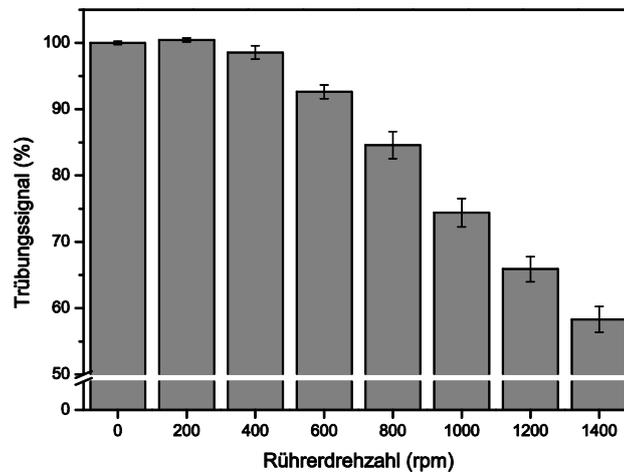
**Abbildung 48:** Variabler Auswertalgorithmus bei linearer Regression (A) und Polynomianpassung (B) derselben ISICOM-Messung bei geschlossener Kammer. Bei der flachen Steigung ist die lineare Regression robuster und die Polynomianpassung weist mehrere Minima auf, die nicht die korrekte Steigung wiedergeben.

### 9.3.4 Typische Kalibrationsfunktion einer pH-Optode



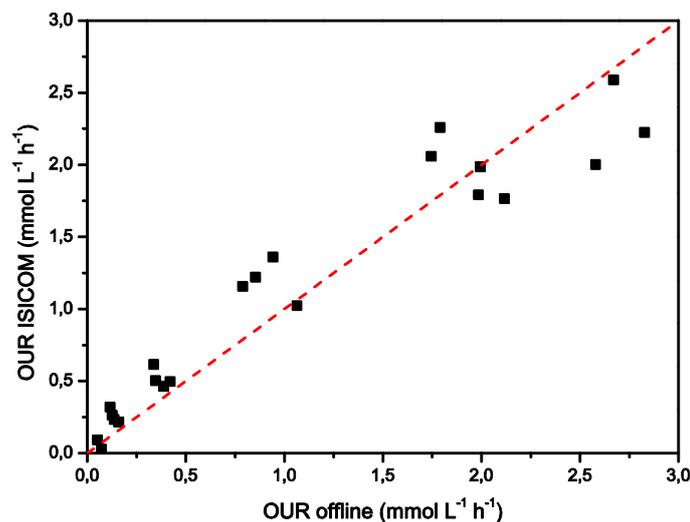
**Abbildung 49:** Beispiel einer Kalibrationsfunktion für eine pH-Optode. Der Zusammenhang zwischen der gemessenen Phase und dem pH-Wert ist nicht linear. Eine Rekalibration mit nur einem Messwert ist somit nicht möglich. Nach [127].

### 9.3.5 Abhängigkeit der Trübungsmessung von der Reaktor-Rührerdrehzahl



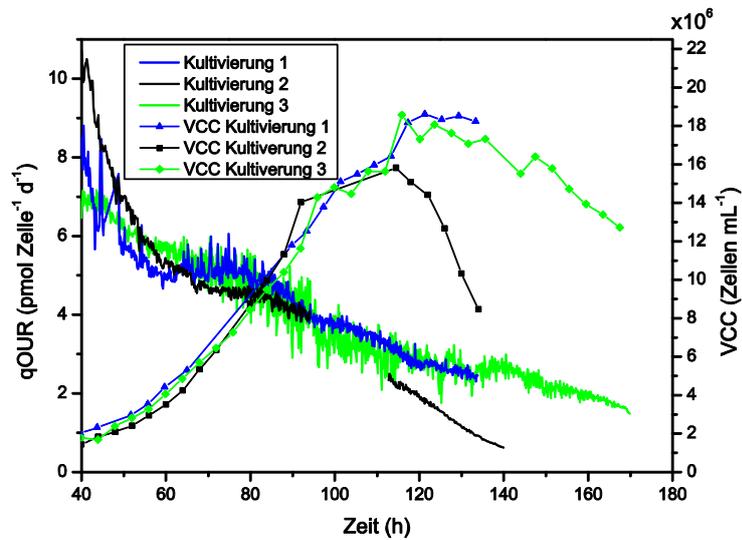
**Abbildung 50:** Abhängigkeit der Trübungsmessung von der Reaktor-Rührerdrehzahl im 10 L Biostat C (10 L dH<sub>2</sub>O, 37 °C) bei geöffneter ISICOM Kammer. Ab einer Drehzahl von 400 rpm reduziert sich das Signal mit weiterer Erhöhung und beträgt bei 1400 rpm nur noch 58 % der Ausgangssignalstärke bei 0 rpm. (jeweils Mittelwerte einer Messung über zwei Minuten)

### 9.3.6 Vergleich der *offline* OUR Bestimmung mit den ISICOM Messwerten für drei CHO K1 *Batch*-Kultivierungen



**Abbildung 51:** Vergleich der *offline* OUR Bestimmung mit den ISICOM Messwerten für drei CHO K1 *Batch*-Kultivierungen. Die rote, gestrichelte Linie stellt den Verlauf bei idealer Übereinstimmung dar.

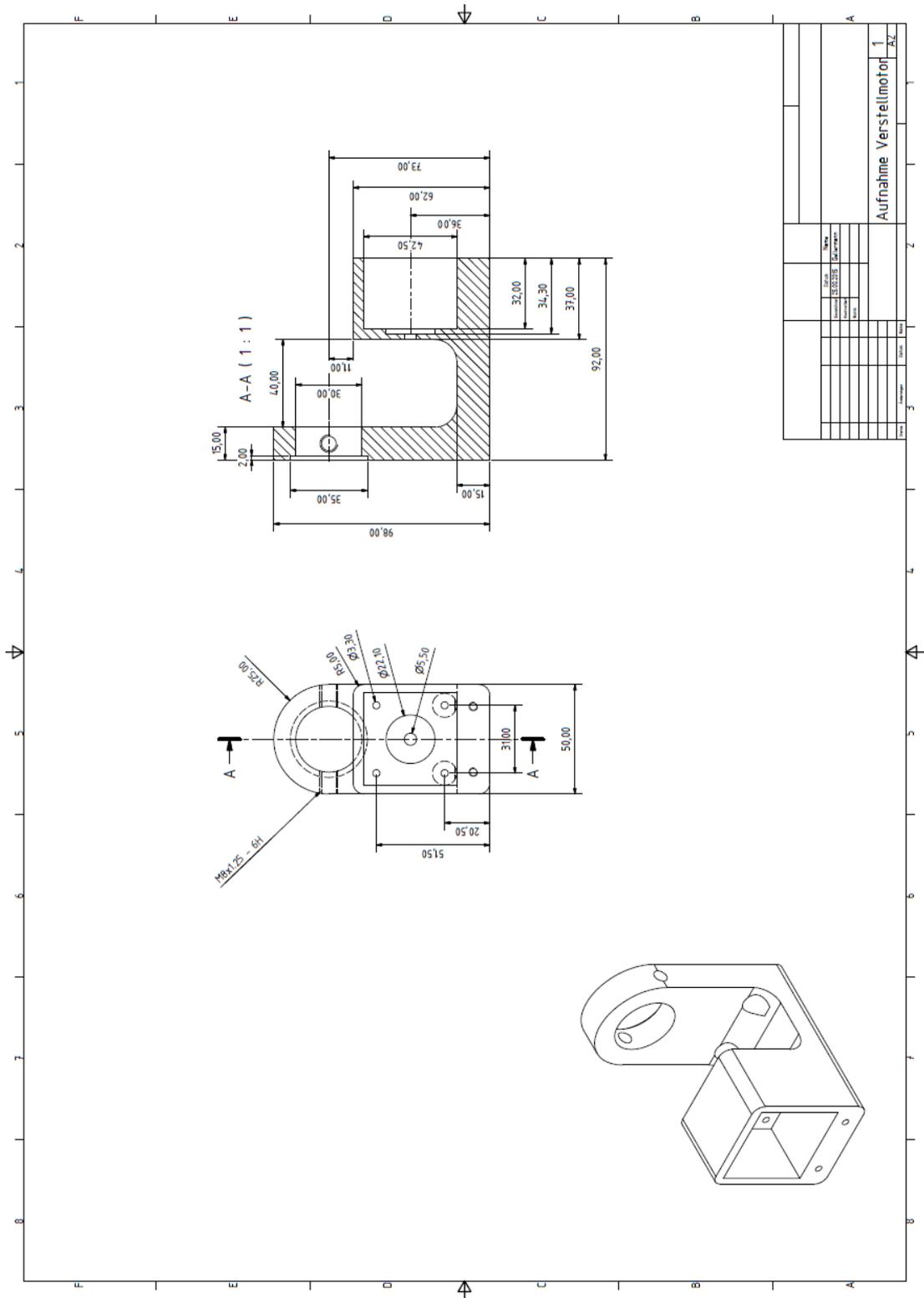
## 9.3.7 qOUR Verläufe von drei CHO K1 Kultivierungen

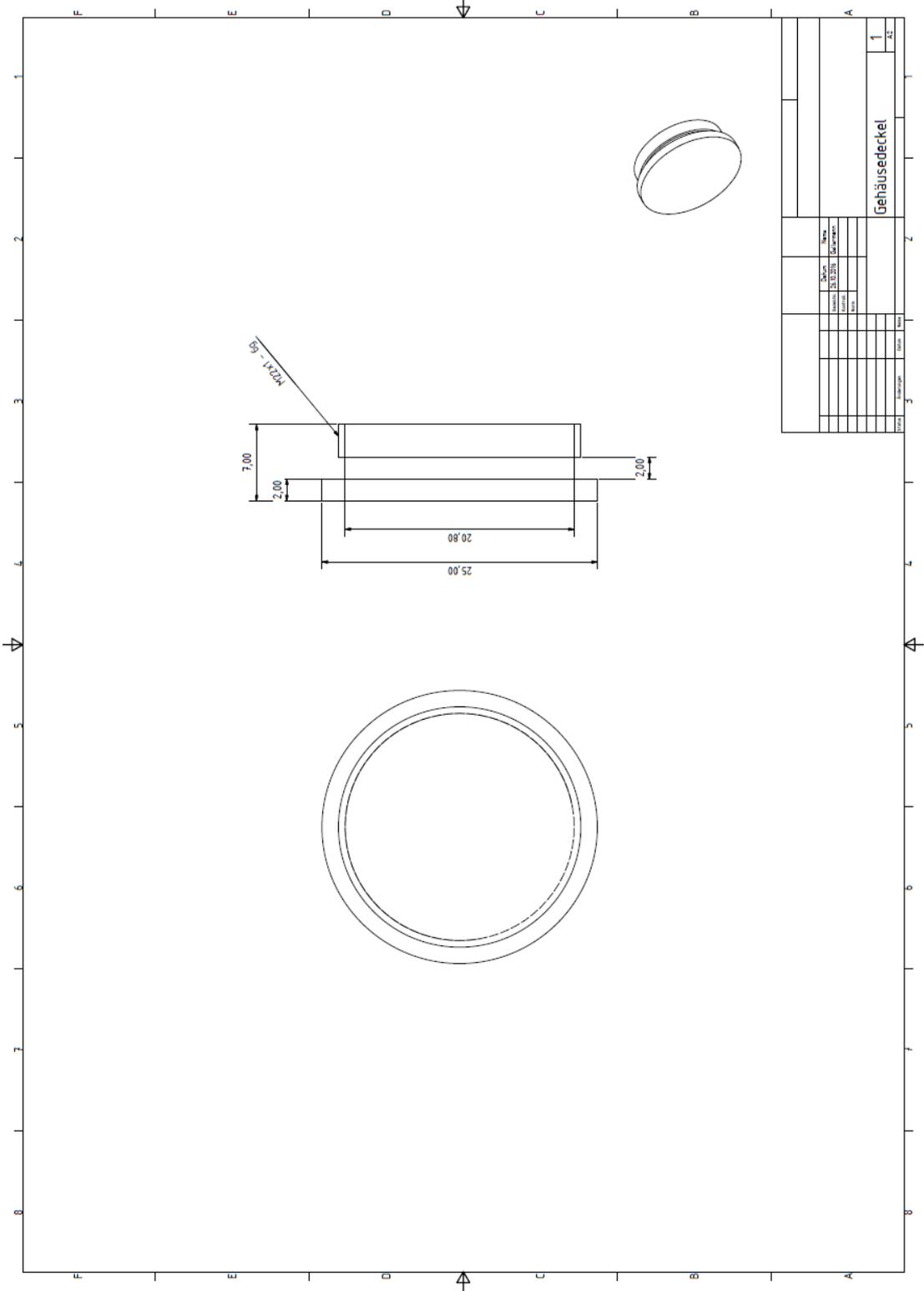


**Abbildung 52:** Zeitlicher Verlauf der qOUR und VCC (ermittelt mit dem Cedex) während dreier CHO K1 *Batch*-Kultivierung. Die Daten sind erst ab Zeitpunkt gezeigt, ab dem die Zellkonzentration verlässlich mit dem ISICOM bestimmt werden kann ( $1 \cdot 10^6$  Zellen mL<sup>-1</sup>).



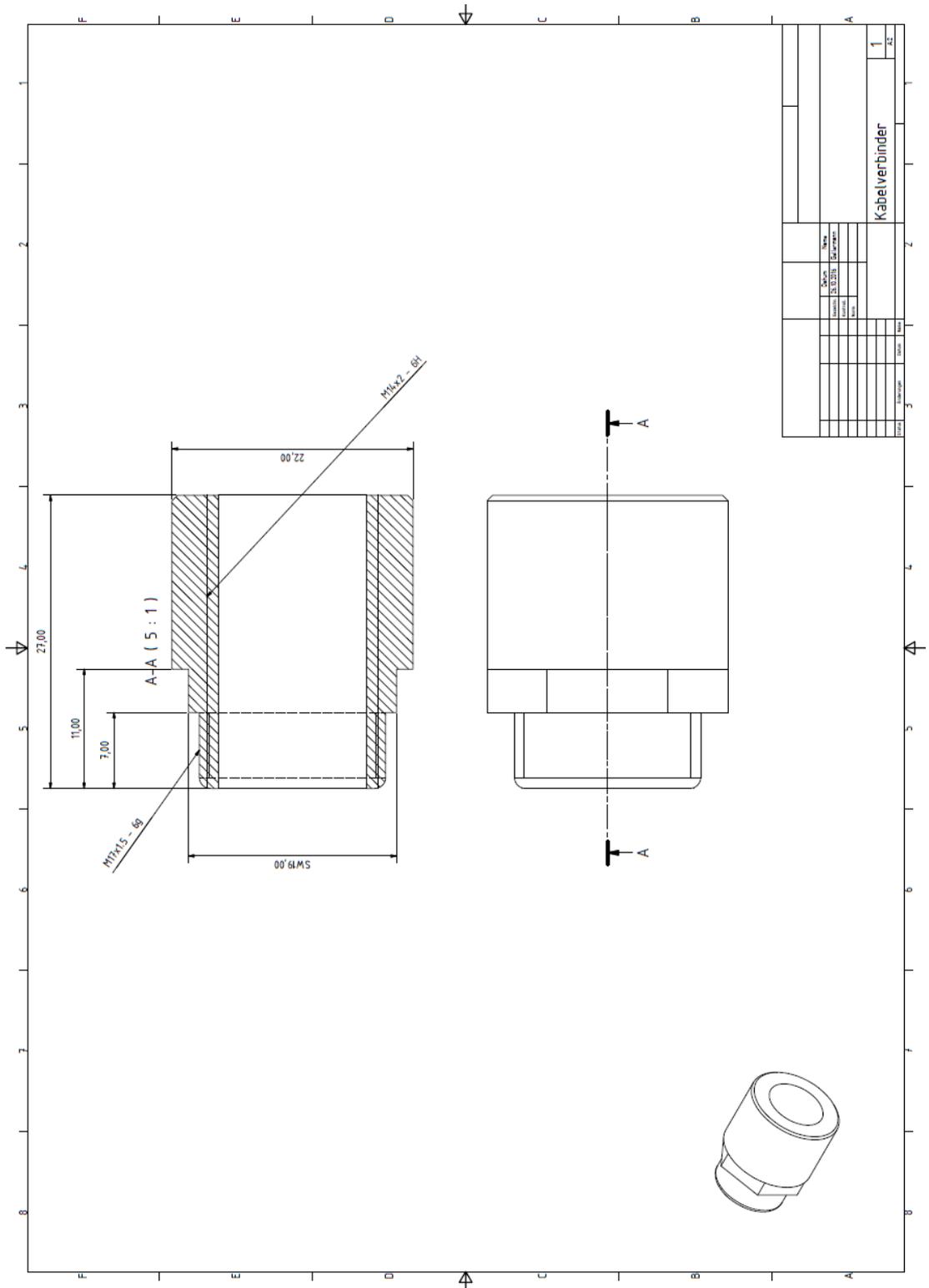


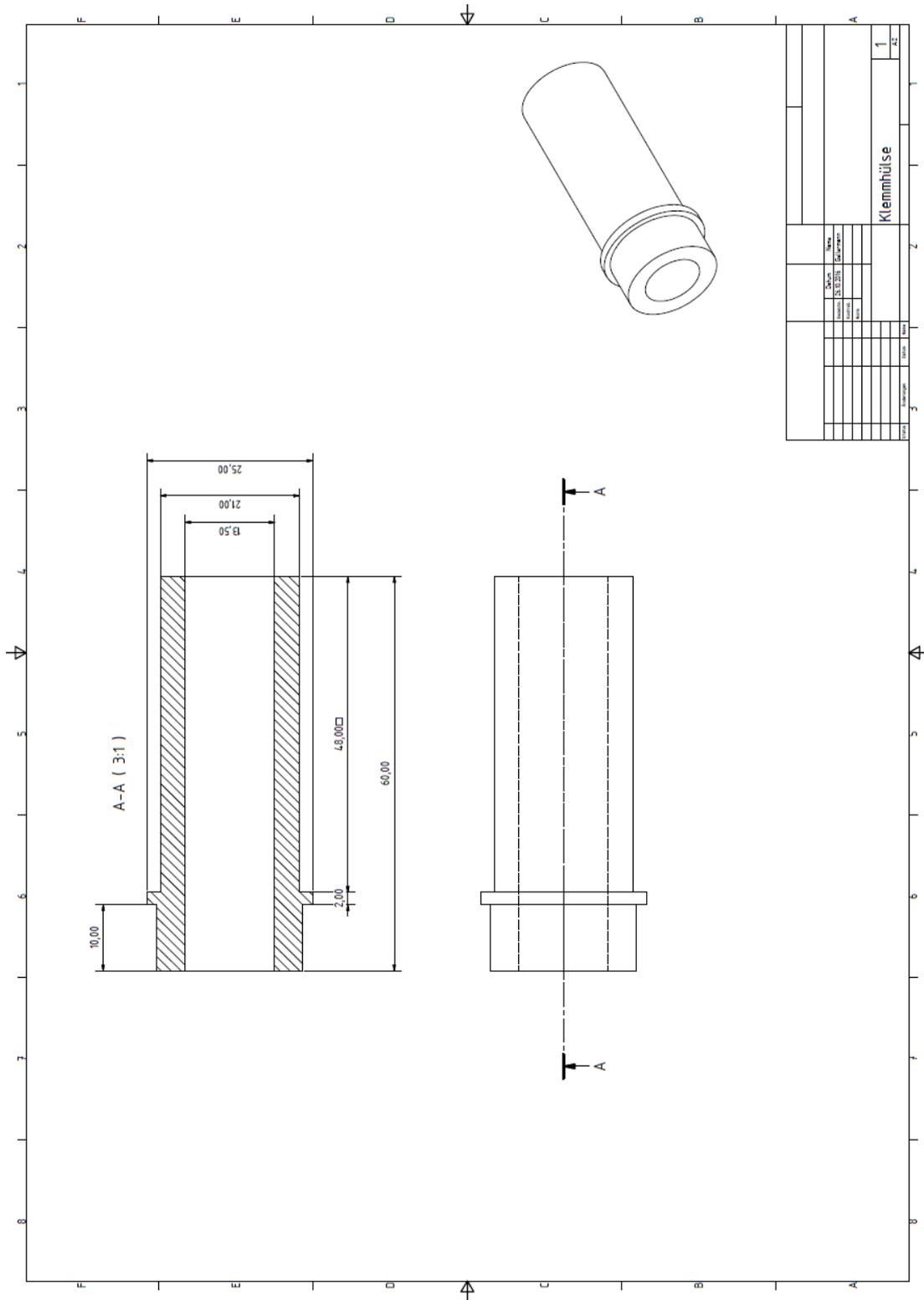




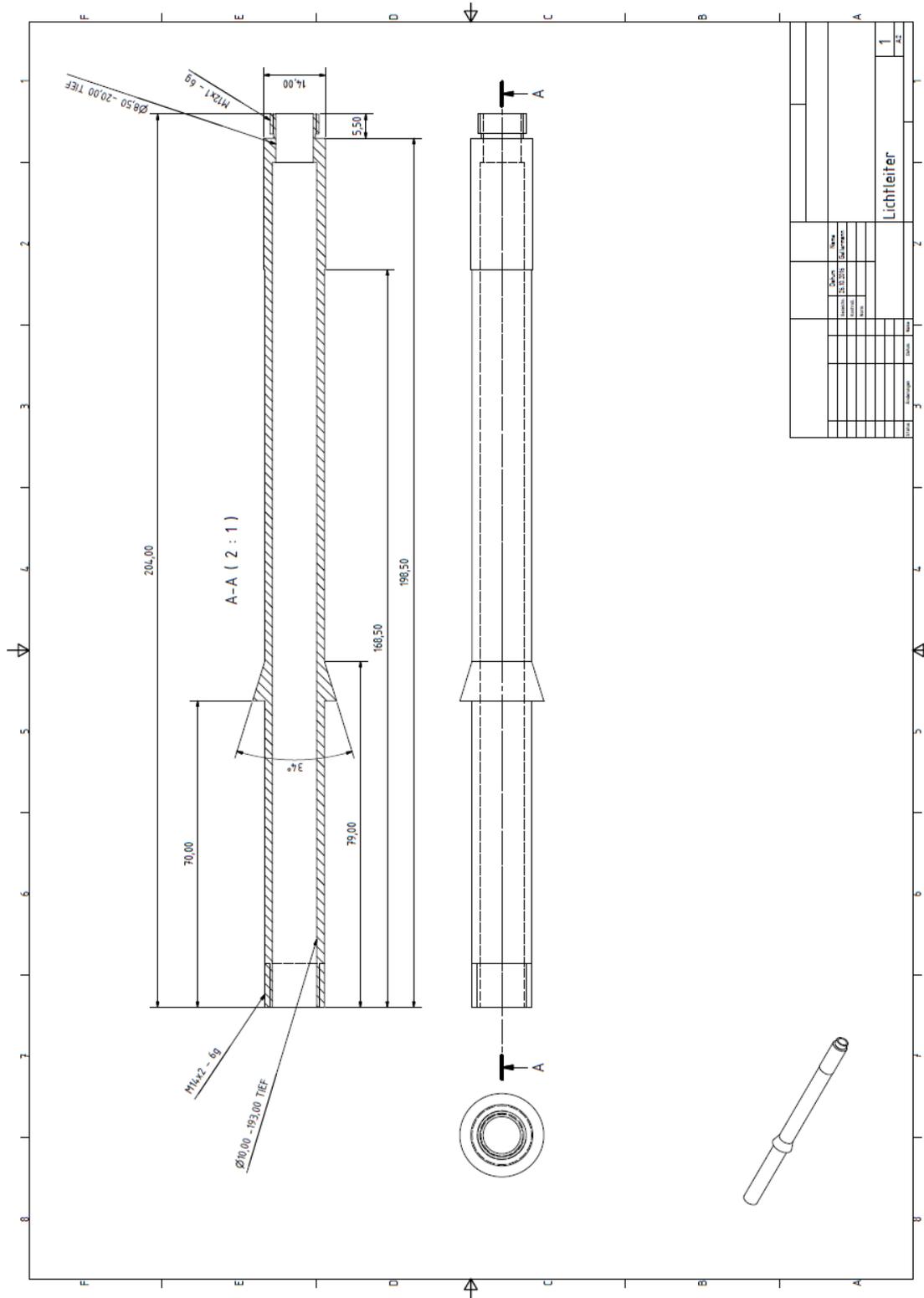


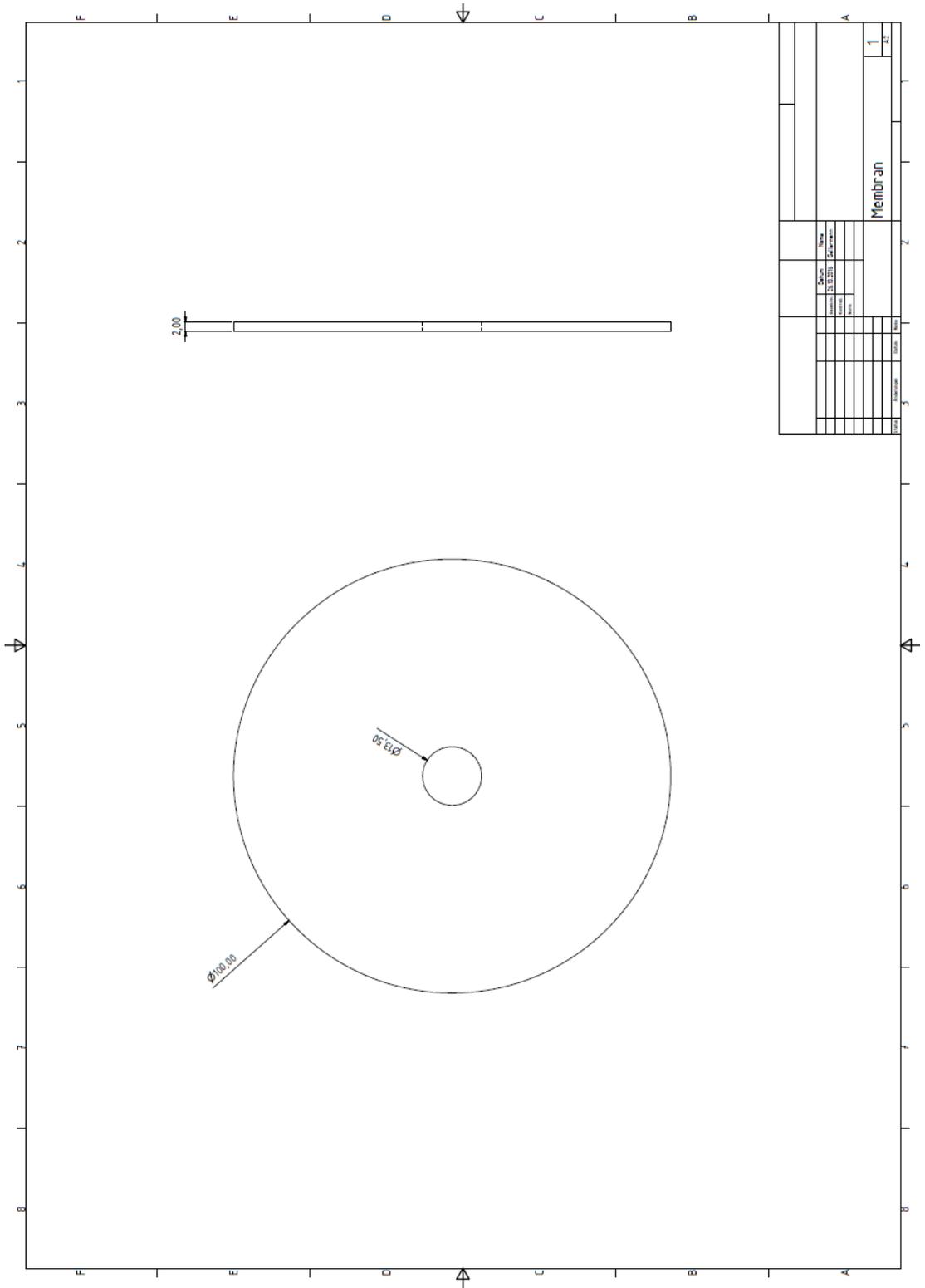


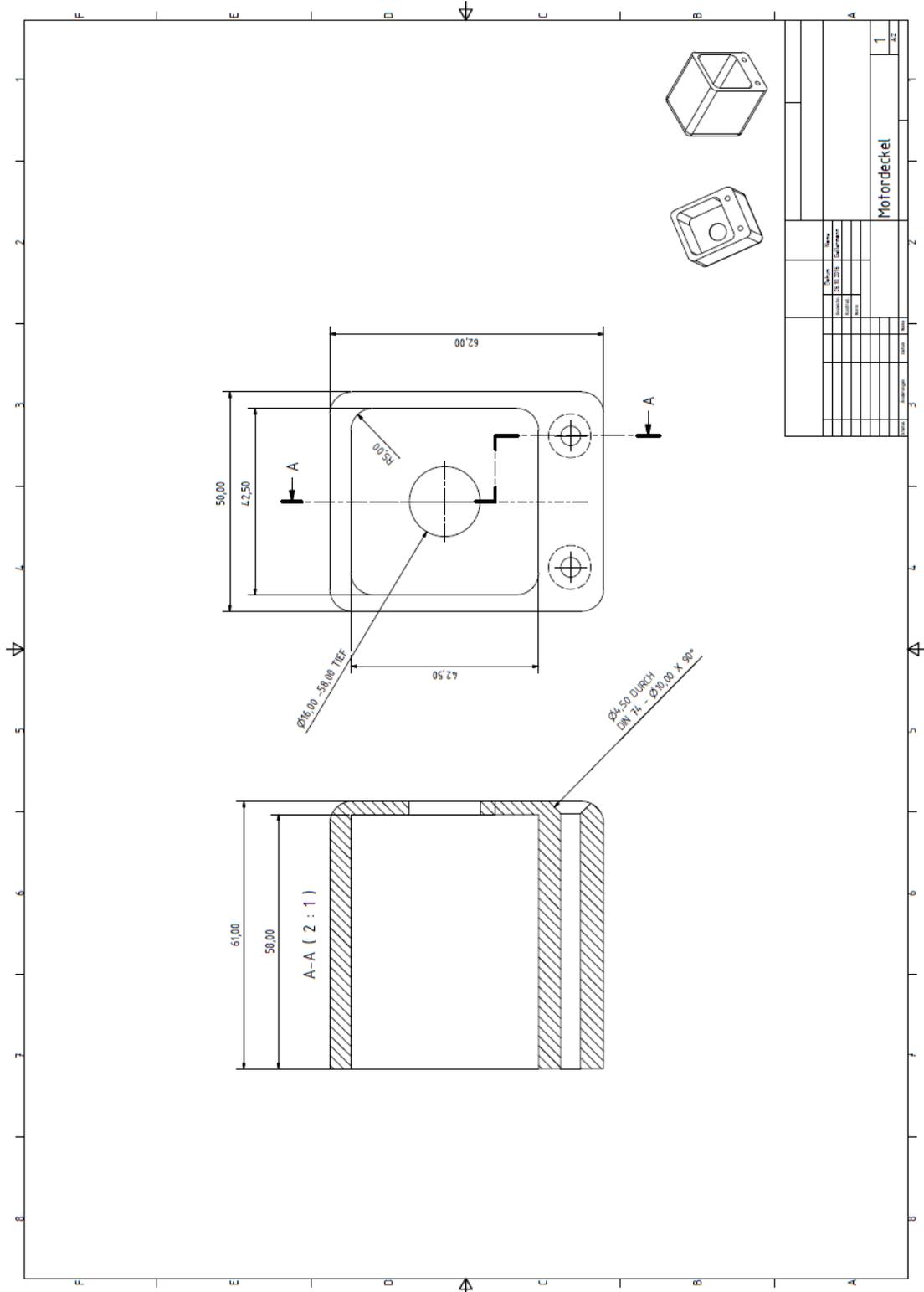


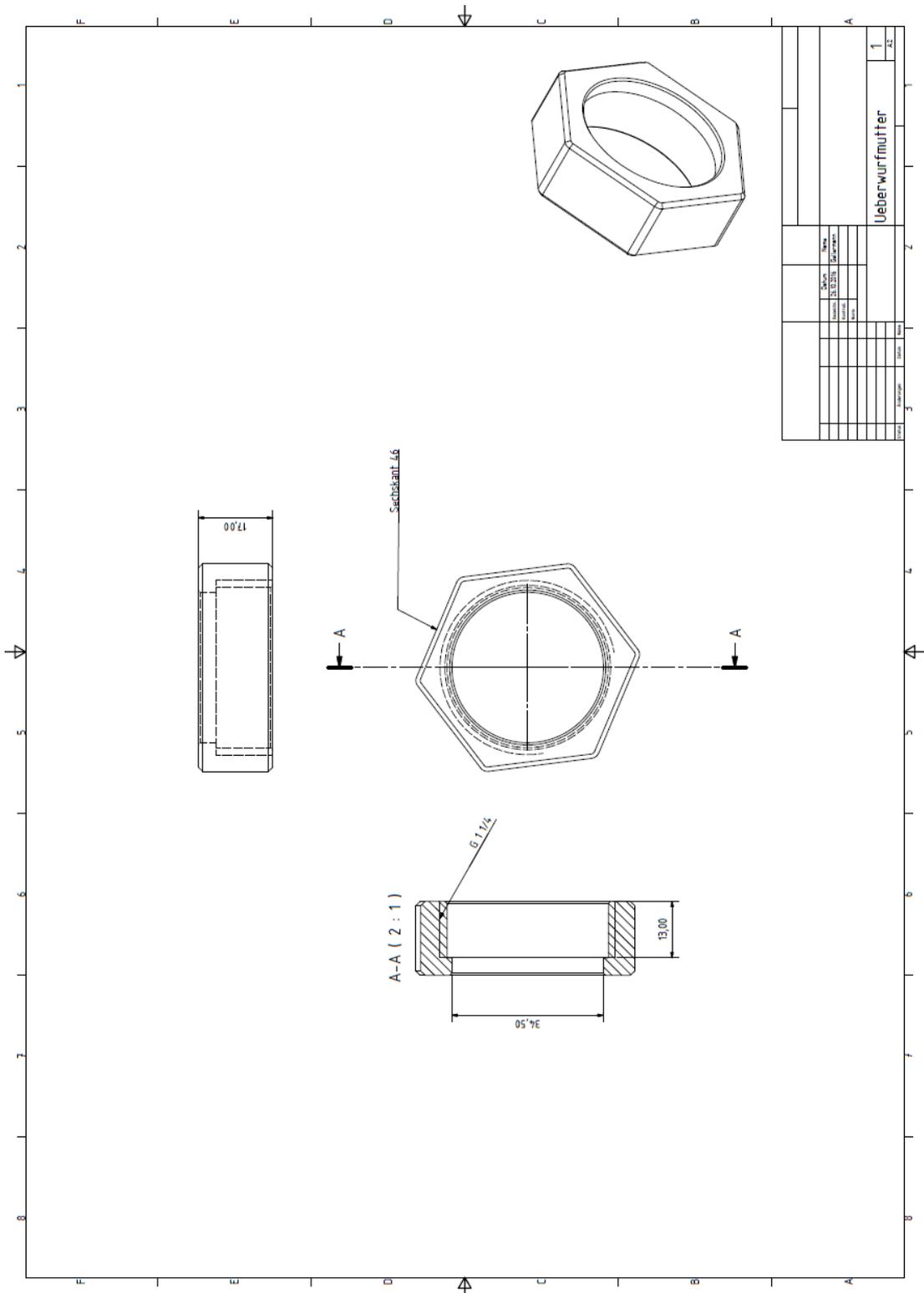


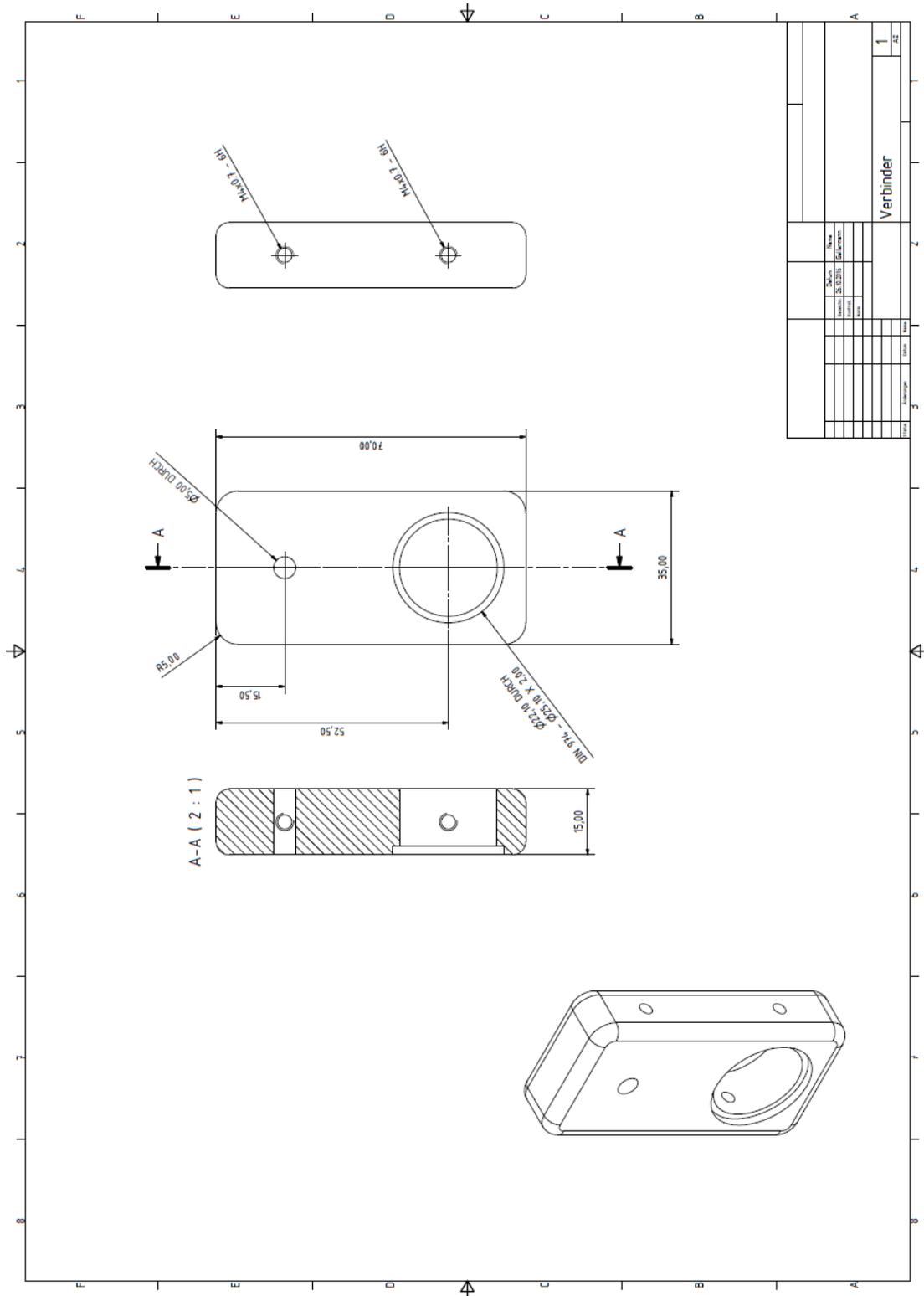


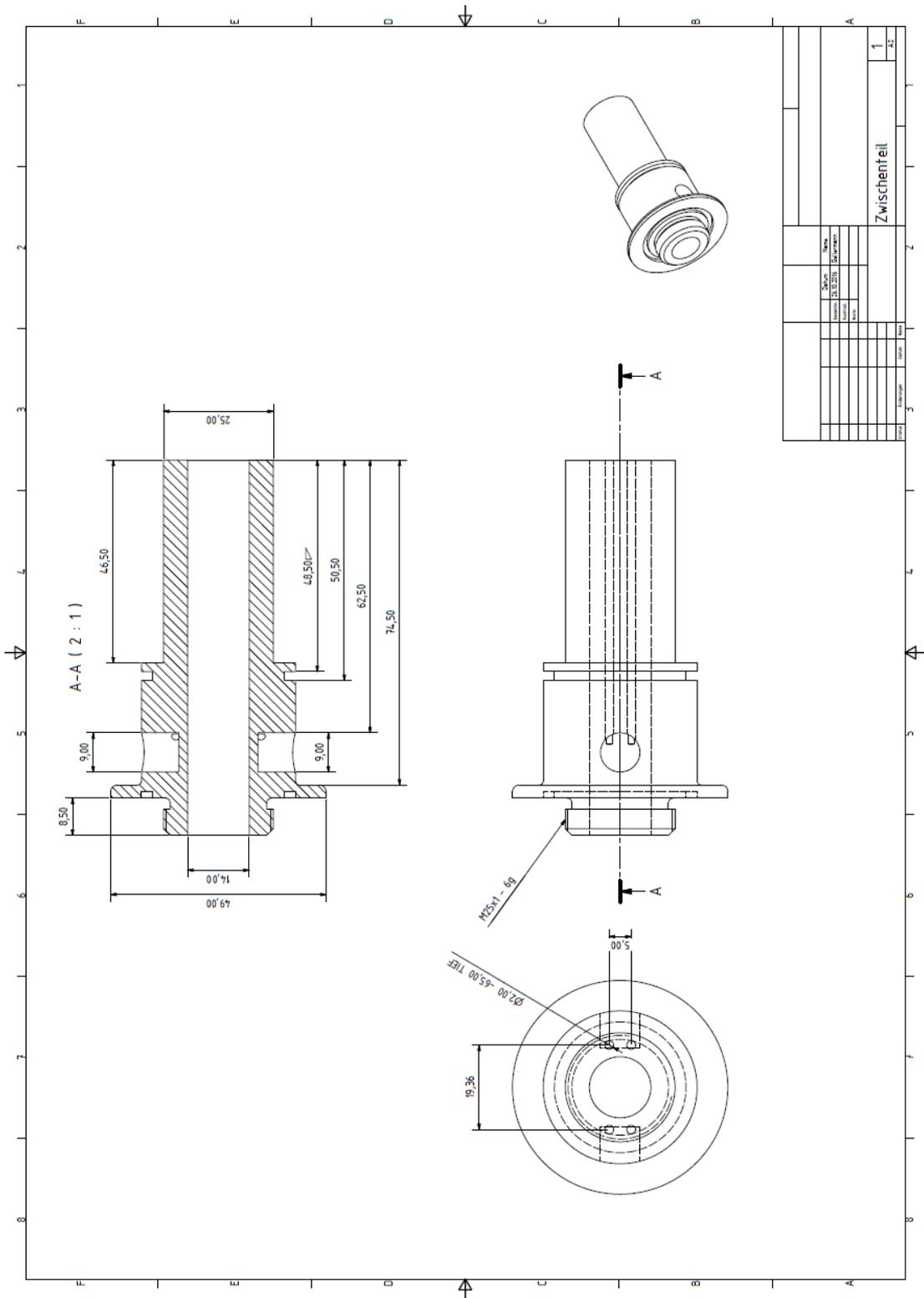












### 9.5 Schaltplan der Elektronik der Streulichtsonde des ISICOM.

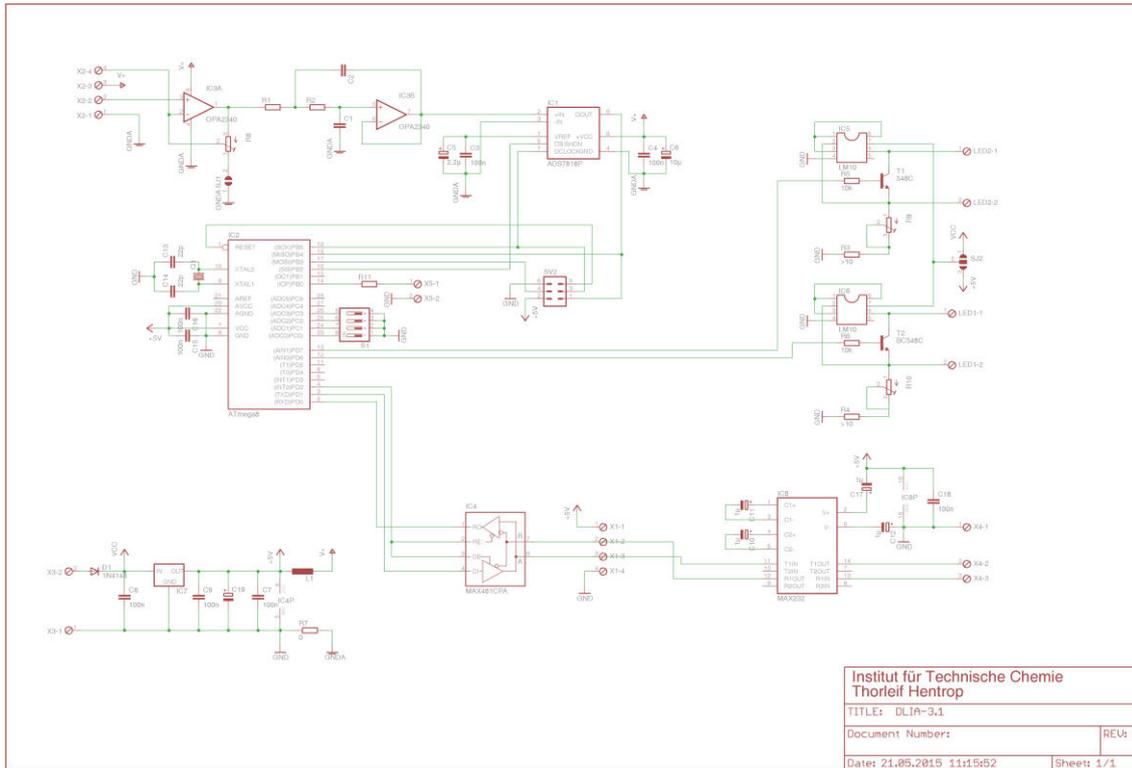


Abbildung 53: Schaltplan der Elektronik der Streulichtsonde des ISICOM.

## 9.6 Unterstützende Arbeiten

Im Folgenden werden Personen aufgeführt, die bei der vorliegenden Arbeit unterstützend tätig waren.

**Tabelle 13:** Unterstützende Tätigkeiten im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

<b>Unterstützende Tätigkeit</b>	<b>Name</b>
CHO K1 Kultivierungen	Philipp Biechele, M.Sc.
	Jens Claßen, M.Sc.
	Florian Aupert, M.Sc.
	Tamanna Nagraik, M.Sc.
Datenauswertung der Trübung	Dr. Dörte Solle
CHO Kultivierungen	Dr. Patrick Lindner
<i>E. coli</i> K1 Kultivierungen	Ingo de Vries, MEng
Elektrische Installation	Dipl.-Ing. (FH) Thorleif Hentrop
	Andreas Kösterke
<i>P. pastoris</i> Kultiverungen	Daniel Marquard, M.Sc.
Sensorfertigung, Modifikation und mechanische Aufbauten	Thorsten Stempel
	Friedbert Gellermann
Software	Dipl.-Ing. (FH) Thorleif Hentrop
Vorabtest der Trübungssonde, Verschluss- u. Rührmechanismus	Esra Kesdiren, B.Sc.

## Publikationsliste

### Journal und Poster Publikationen:

de Vries I., Busse C., Kopatz J., Neumann H., Beutel S., Scheper T.  
„Polysialic acid production using *Escherichia coli* K1 in a disposable bag reactor“, *Engineering in Life Sciences*, 2017, accepted manuscript online.

Raddatz L., Austerjost J., Lücking T.H., Busse C., Beutel S., Scheper T.  
„Additive Fertigung in der Biotechnologie“, 32. *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (Posterbeitrag)*, Aachen, 2016.

de Vries I., Busse C., Beutel S., Scheper T.  
„Polysialinsäureproduktion in einem Einweg-Beutel-Reaktor“, 32. *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen (Posterbeitrag)*, Aachen, 2016.

Busse C., de Vries I., Solle D., Scheper T.  
„Online Überwachung des metabolischen Zustands in Kultivierungsprozessen mit dem ISICOM“, *Dresdener Sensor Symposium (Posterbeitrag)*, 2015.

Lücking T.H., Busse C., Lüder C., Bulnes-Abundis D., Solle D. and Scheper T.  
„A novel measuring chamber and automation platform for mammalian cell culture processes“, *BMC Proceedings*, 2015, 9, 9, 30 *From European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting*, 2015, Barcelona, Spanien.

Biechele P., Busse C., Solle D., Scheper T., Reardon K.  
„Sensor systems for bioprocess monitoring“, *Engineering in Life Sciences*, 2015, 15, 5, 469-488

Busse C., Lücking T.H., Sambale F., Bulnes-Abundis D., Raddatz L., Beutel S., Scheper T.  
„3D-printed individual labware in biosciences“, *DECHEMA Himmelfahrtstagung: Scale-up and scale-down of bioprocesses*, Hamburg (Posterbeitrag), 2015

Lücking T.H., Sambale F., Bulnes-Abundis D., Busse C., Beutel S., Scheper T.  
„3D printing in biosciences: Applications and perspectives“, *Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel (Posterbeitrag)*, Hannover, 2015

Lücking T.H., Busse C., Beutel S. und Scheper T.  
„3D-Druck-Verfahren für die Herstellung von porösen Festkörperimplantaten“, *Im Rahmen der Feierlichkeiten zum Tag der Deutschen Einheit (Posterbeitrag)*, Hannover, 2014.

## Danksagung

Zu allererst danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Besonders für die Bereitstellung dieses spannenden und vielseitigen Themas sowie für die ausgezeichnete Betreuung während dieser Zeit.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich sehr Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann.

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

Ein sehr großer Dank gilt Frau Dr. Dörte Solle, die nicht nur mit wertvollen Ratschlägen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, sondern auch während meiner gesamten Zeit am Institut stets bei allen Fragen und Problemen behilflich war.

Ganz herzlich danken möchte ich Friedbert Gellermann und Thorsten Stempel, ohne deren zahlreichen technischen Tipps und handwerkliches Geschick diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Auch bei sehr kurzfristigen Modifikationen oder Reparaturen habt ihr mir stets sehr weitergeholfen.

Thorleif Hentrop gilt ein besonderer Dank für die Unterstützung der Entwicklung und des Baus der Steuereinheit sowie den damit verbundenen Programmierarbeiten. Außerdem danke ich Andreas Kösterke und Kai Patzer für die schnelle Hilfe bei allen elektrischen Problemen.

Cornelia Alic, Ulrike Dreschel, Dr. Michael Dors, Dr. Ivo Havlik, Martin Pähler und Martina Weiß danke ich für die Hilfe und Unterstützung, nicht nur im Labor, sondern auch im betrieblichen Alltag.

Dr. Sascha Beutel möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das Korrekturlesen diverser Berichte und Poster danken.

Dr. Patrick Lindner danke ich für die Hilfe bei der Datenauswertung mit MatLab und für die spaßige Zusammenarbeit am Projekt SecondSun.

Ein großes Dankeschön geht an meine Kollegen Ingo de Vries und Daniel Marquard für die gemeinsamen mikrobiellen Kultivierungen. Auch allen aktuellen und alten Mitarbeitern der CHO Kultivierungen Florian Aupert, Philipp Biechele, Jens Claßen, Tamanna Nagraik, Tim Lücking sowie Shaobin Lu möchte ich danken. Lukas

Raddatz danke ich für die vielen schönen 3D-Drucke, Fachgespräche und die super Zusammenarbeit bei der Masterarbeitsbetreuung.

Mein Dank gilt außerdem Esra Kesdiren für ihre tatkräftige Mitarbeit an der technischen Charakterisierung des Sensors im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.

Ein ganz großes Dankeschön geht an das gesamte TCI für die tolle gemeinsame Zeit. Ich habe die super Atmosphäre, Hilfsbereitschaft und die Arbeit an den gemeinsamen Spezialprojekten immer sehr genossen! Es sind in dieser Zeit viele neue Freundschaften entstanden, die ich nicht mehr missen möchte. Besonders meinen Bürokollegen aus Raum 163 danke ich für die lustige und harmonische Zeit. Speziell Semra Alemdar für ihre regelmäßige Verpflegung mit vielen leckeren Backspezialitäten.

Dem gesamten VE\_Team mit allen ehemaligen Braumeistern danke ich sehr für die vielen lustigen Sude und Brauwettbewerbe. Ich drücke euch auch weiterhin beide Daumen, ihr seid spitze!

Mein riesiger Dank gilt Tim Lücking. Ohne dich wäre ich wahrscheinlich niemals in Hannover am TCI gelandet und hätte meine Freundin Julia nicht kennengelernt. Ich bin froh, dich meinen engsten Freund nennen zu können.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten bisherigen Lebensweges und meiner Ausbildung in jeglicher Hinsicht kompromisslos unterstützt und immer an mich geglaubt hat. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft!

Schließlich bedanke ich mich bei meiner geliebten Julia, die bei all meinen Hochs und Tiefs immer für mich da ist. Deine Geduld, Vertrauen und Rückhalt sind für mich mit nichts aufzuwiegen.

# Lebenslauf

## **Persönliche Daten**

---

Name Christoph Busse  
Geburtsdatum und -ort: 01.06.1986 in Bad Oeynhausen

## **Akademische und schulische Ausbildung**

---

07.2013 – heute                      Anfertigung der Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

10.2009 - 03.2012                      Universität Bielefeld  
Master-Studiengang „Molekulare Biotechnologie“  
Abschluss: M.Sc.  
Master-Arbeit: *„Evaluation eines automatischen Extraktions- und Amplifikationsverfahrens zum Nachweis methylierter DNA aus nativem und modifiziertem Plasma (Septin-9-Test)“*

10.2006 - 09.2009                      Fachhochschule Bielefeld  
Bachelor-Studiengang „Apparative Biotechnologie“  
Abschluss: B.Sc.  
Bachelor-Arbeit: *„Leistungsevaluierung des Chipelektrophorese Systems LabChip GX II (Fa. Caliper) mit einem klassischen Fertig-Gelsystem“*

08.1996 - 06.2005                      Gesamtschule Hüllhorst  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife