

Zwischenergebnisse 2017

ISICOM: Entwicklung eines in situ Sensors zur Überwachung der metabolischen Aktivität in Bioprozessen (19361 N)

Problembeschreibung

Biotechnologische Prozesse sind komplexe Mehrphasenprozesse und die ganzheitliche Beschreibung dieser ist heute nur mit erheblichem Zeit- und Kostenaufwand möglich. Um solche Prozesse sicher und effizient zu gestalten, sind Sensoren nötig, die den Prozess- und insbesondere den Zellzustand möglichst nicht-invasiv und in situ erfassen. Speziell Sensoren zur Beobachtung der metabolischen Aktivität der Zellen und zur Beurteilung des Zustands des Gesamtprozesses fehlen bisher. Hier eignet sich die Sauerstoffaufnahme (OUR) bzw. die spezifische Sauerstoffaufnahme (qOUR) als ein robuster Indikator zur Bestimmung zellulärer Aktivität, denn eine Vielzahl von mikrobiellen Prozessen, die meisten Pilz- und Pflanzenkulturen und alle Säugerzellkulturen sind aerobe Prozesse.

Zielstellung

In diesem Forschungsprojekt soll ein neuartiger in situ Kombi-Sensor (ISICOM) entwickelt werden, 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 zeitweise, dicht verschließbaren Messkammer. In dieser homogen durchmischten Zone werden pH- und pO₂- Sensoren, basierend auf Glasfaseroptik, integriert. Über eine Streulicht-, IR- oder Fluoreszenzoptode ist außerdem die Biomassekonzentration bestimmbar. Bei geschlossener Kammer ist die spezifische Sauerstoffaufnahme direkt, aus der Kombination dieser Messwerte, mittels der dynamischen Methode zugänglich. Der Vorteil dieser Sensorkombination ist, dass der ISICOM bei geöffnetem Messraum als konventionelle pH-, pO₂- und Streulicht, IR oder Fluoreszenzsensor arbeitet und mit den anderen Sensoren im Reaktor abgeglichen werden kann. Bei geschlossener Messkammer ist die qOUR der Zellen charakterisierbar, ohne den Kultivierungsprozess zu beeinflussen oder eine Probe aus dem Reaktor zu nehmen. Eine Beschreibung der biologischen Aktivität bzw. des metabolischen Zustands der Kultur wird hierdurch möglich.

Ergebnisse

Entwicklung des Verschlussmechanismus

Der Verschlussmechanismus des ISICOM muss gasdicht, autoklavierbar und über den gesamten Kultivierungszeitraum steril zu betreiben sein. 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 zurück bewegt. Die Verstelleinheit wird am hinteren, äußeren Ende des ISICOMs befestigt und kann entfernt werden.

Abbildung 1 stellt die Funktion des Verschlusses dar. Bei geöffneter Kammer befindet sich der Stempel in Position 1 und gibt den Zugang zur Messkammer frei. Damit der

Reaktorinhalt nicht in den Sensorkörper läuft, dichtet ein O-Ring (2) direkt hinter dem Öffnungspalt 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 die Kammer abdichtet.

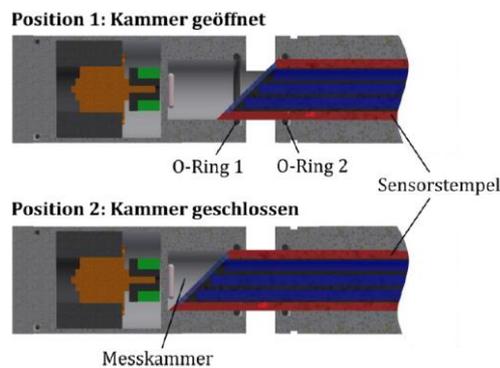


Abbildung 1 - Funktionsweise des Verschlussmechanismus im Halbschnitt.

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

Damit der Sauerstoffverbrauch bestimmt werden kann, darf bei geschlossener Kammer kein Gas- und Flüssigkeitsaustausch zwischen einem separiertem und dem umgebenen Volumen stattfinden.

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 2 dargestellt. Der Sauerstoffpartialdruck bleibt nach dem Schließen der Kammer über 30 Minuten konstant, was einen gasdichten Verschluss belegt.

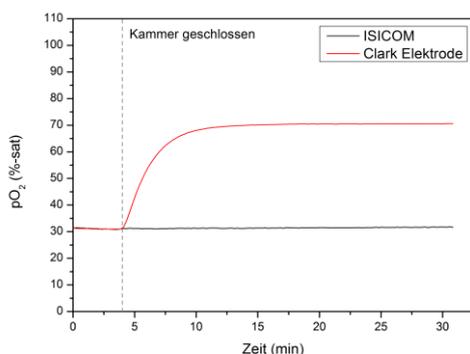


Abbildung 2 – Gasdichtigkeitsprüfung des ISICOM für 30 Minuten

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 3 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 zügig den der Referenzelektrode.

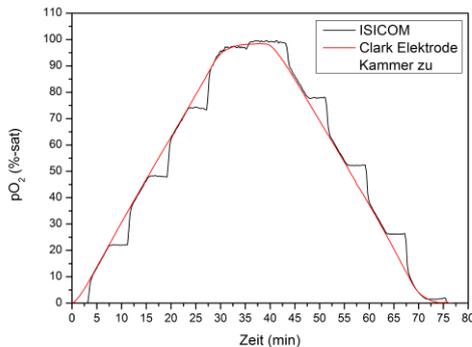


Abbildung 3 - Gasdichtigkeitsprüfung vom ISICOM bei wiederholtem Öffnen und Schließen der Kammer und sich ändernden Umgebungsbedingungen

Entwicklung 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 zunächst 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.

Weitere Rührsysteme, wie das Rühren durch Ultraschall werden noch untersucht.

Die optimale Rührfrequenz zur Durchmischung der Sensorkammer wurde zunächst mit einem Modellsystem, dem Polymere 4000 FNU (Formazin nephelometric unit) 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 hier eine Messung, bei der in der Kammer nicht gerührt wurde.

In Abbildung 4 ist zu erkennen, dass das Trübungssignal ohne Durchmischung nach 20 Minuten 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.

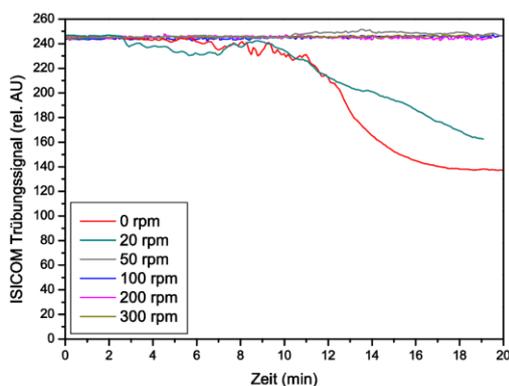


Abbildung 4 - Trübungsänderung in der Messkammer bei verschiedenen Rührerdrehzahlen für Formazin.

Da das Sedimentationsverhalten von Formazin nicht direkt auf Mikroorganismen oder Hefen 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 dem Puffersystem PBS (Phosphat buffered Saline – Phosphat gepufferte Salzlösung) gewaschen. Anschließend wurden die Kulturen in PBS resuspendiert, sodass eine OD600 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 daher eine Rührfrequenz von mindestens 200 rpm benötigt, um eine Sedimentation zu verhindern (vgl. Abbildung 5 B).

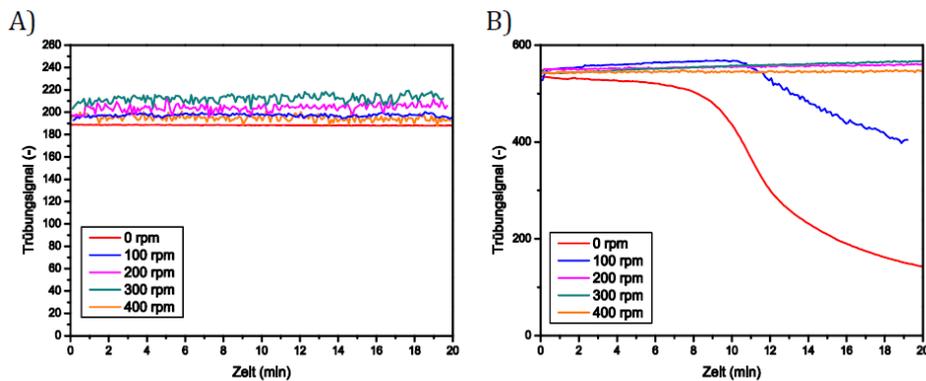


Abbildung 5 – Trübungssignal bei unterschiedlichen Rührfrequenzen von *E.coli* (A) und *s. cerevisiae* (B)