

# **Multi-Sensornetzwerke für Parallel-Reaktorsysteme**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Christian Ude, M. Sc.

geboren am 24.06.1988 in Bad Gandersheim

2017

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

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

Externer Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Bley

Tag der Promotion: 16.01.2017

*für Sebastian*

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben. Ich danke an erster Stelle Herrn **Prof. Dr. Thomas Scheper** für die Vergabe des Forschungsthemas und dem großen Vertrauen und der Zuversicht, die er mir während meiner Promotionszeit entgegengebracht hat. Ganz herzlich danke ich Herrn **Prof. Dr. Bernd Hitzmann** für die Übernahme des Co-Referats. Ich danke Herrn **Dr. Sascha Beutel** für sein großes Interesse an meinen Forschungsarbeiten und seiner fachlichen Begleitung über die gesamte Promotionszeit hinweg. Im speziellen danke ich ihm für seine Arbeit und Rat zum Gelingen der vielen erfolgreichen Publikation und Forschungsanträgen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind. Meinen Projektpartnern Herrn **Dr. Gernot John**, Herrn **Dr. Michael Findeis** der PreSens GmbH, Herrn **Dr. Stephen Kroll** der Universität Bremen und Herrn **Dr. Nadav Ben-Dov** des Technion in Haifa danke ich für die spannende Zusammenarbeit und ihrer großen Unterstützung meiner Arbeiten. Besonders möchte ich mich bei **Thorleif Hentrop**, **Burghard Probst** und **Andreas Kösterke** für die Unterstützung beim Bau der elektronischen Geräte und Anlagen bedanken. Ich danke ihnen für die zahllosen Gespräche und Fachsimpeleien. Mein Dank gilt **Thorsten Stempel** und der gesamten Feinmechanikwerkstatt für die hervorragende Zusammenarbeit beim Bau technischer Geräte und der Ausgabe von Materialien. Weiterhin danke ich **Martina Weiß** für ihre große fachliche Unterstützung im Labor. Ich danke **Philipp Grünert** für seine große Kollegialität und Freundschaftlichkeit, die er immer wieder unter Beweis gestellt hat. Großer Dank geht an **Tim Lücking** für seine Hilfe bei der Einführung in das Rapid-Prototyping und dem 3D-Druck. Der größte Dank gilt meinen Eltern und meinem älteren Bruder, die mich in den letzten Jahren unterstützt und ermutigt haben.

# Zusammenfassung

Biotechnologische Prozesse unterliegen heute mehr denn je einem hohen Effizienzdruck. Prozesslaufzeiten müssen reduziert, der Ressourcenverbrauch gesenkt und die Nachhaltigkeit gesteigert werden. Um diese Ziele zu erreichen, bedarf es grundlegendes und umfangreiches Wissen über den Bioprozess, das möglichst früh gesammelt werden sollte. Darüber hinaus spielt die Bioprozesskontrolle auch am Anfang der Bioprozessentwicklung eine immer wichtige Rolle, um das Scale-up so weit wie möglich zu vereinfachen. Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines 180°-Streulichtsenors zur online-Messung der Biomassekonzentration während Schüttelkolbenkultivierungen mikrobieller Kulturen und Säugerzelllinien. Dazu wurde der Streulichtsensor mit verschiedenen bakteriellen sowie ein- und mehrzelligen, eukaryotischen Organismen evaluiert. Außerdem wurde eine erweiterte Messoptik zur Zellkonzentrationsbestimmung von CHO-K1-Suspensionskulturen entwickelt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer pH-Prozesskontrolle für Schüttelkolben. Hierzu wurde im zweiten Teil ein Kombinationssystem aus online-pH-Sensorik und kabelgebundener, miniaturisierter Aktorik entwickelt. Damit wurde eine automatische Regelung des pH-Wertes während Schüttelkolbenkultivierungen in Echtzeit angestrebt. Zur schnellen Erprobung von Prototypen wurden neue Fertigungstechnologien wie das Rapid-Prototyping via SLS-basiertem 3D-Druck erprobt. Weiterhin kamen neuartige Miniatur-Piezopumpen und Miniatur-Magnetventile zum Einsatz. Der dritte Teil dieser Arbeit hatte zum Ziel die online-Streulichtmessung als Messmethode zum Nachweis unlöslicher, intrazellulärer Proteinaggregate (Inclusion Bodies) zu evaluieren und ggf. eine online-Analysemethode darauf aufbauend zu entwickeln. Mit der Korrelation von Signalshift und Proteinaggregatkonzentration wurde hierbei das Applikationsspektrum von der Überwachung der Kultivierungsbasisgrößen (pO<sub>2</sub>, pH, Biomasse) im Rahmen eines Multisensorkonzeptes auf relevante Zell-intrinsische Messgrößen erweitert.

**Schlagwörter:** Online-Biomassesensor, Prozesskontrolle, Multisensor

# Abstract

Processes in biotechnology are dedicated more than ever to high efficiency in these days. Process runtimes have to be reduced, consumption of resources decreased while sustainability has to be increased. To reach these goals a fundamental and extensive knowledge of the process itself is necessary. It should be possible to acquire this knowledge at the very beginning in small scale before big investments are applied. Furthermore bioprocess control is playing an ever greater role at the beginning of bioprocess development in order to simplify scale up. The first part of this work investigated the possibility of a 180° scattered light sensor to be used for online biomass monitoring during shake flasks cultivation. The evaluation of the scattered light sensor using different bacterial as well as uni- and multicellular eukaryotic organisms showed its capability to serve as biomass sensor. Furthermore advanced measurement optics for biomass monitoring of CHO-K1 suspension cultures was developed. In order to establish process control in shake flask a combinatory system of online pH sensor technology and miniature actuators was developed in the second part, enabling an automatic control of pH during cultivation in shake flask. In this context state of the art technologies like rapid prototyping via SLS-based 3D printing were used for a fast benchmark of prototypes. In addition miniature piezo pumps and valves were successfully applied. In the third part the scattered light signal of the biomass sensor was evaluated for online detection of insoluble, intracellular protein aggregations and a new analysis method was developed. Thus, the application spectrum was advanced to important cell-intrinsic measurement parameters in the context of a multisensory concept.

**Keywords:** Online biomass sensor, process control, multisensor

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil</b> . . . . .	<b>3</b>
2.1	Bioprozessentwicklung . . . . .	3
2.1.1	Grundlegende Paradigmen der Bioprozessentwicklung . . . . .	3
2.1.2	Bioprozessentwicklung in Bioreaktoren . . . . .	4
2.2	Sensoren in der Bioprozessüberwachung . . . . .	7
2.2.1	Multisensoren in der Bioprozessanalytik . . . . .	7
2.2.2	Nicht-invasive Biomassemessung in Schüttelkolben . . . . .	11
2.3	Bioprozessregelung im Scale-down . . . . .	14
2.3.1	Prozesskontrolle in geschüttelten Bioreaktoren . . . . .	14
2.3.2	Rapid-Prototyping zur Entwicklung aktiver Laborgeräte . . . . .	15
2.4	Online-Monitoring der Produktion rekombinanter Proteine . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil</b> . . . . .	<b>21</b>
3.1	Online-Biomasse-Monitoring in Schüttelkolben . . . . .	22
3.2	Online-pH-Regelung in Schüttelkolben . . . . .	41
3.3	Online-Detektion von Inclusion Bodies während Schüttelkolbenkultivierungen . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b> . . . . .	<b>70</b>
	<b>Literatur</b> . . . . .	<b>73</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> . . . . .	<b>88</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b> . . . . .	<b>88</b>
<b>A</b>	<b>Anhang: Theoretischer Teil</b> . . . . .	<b>89</b>
A.1	Grundlegende Paradigmen der Bioprozessentwicklung . . . . .	89
A.2	Bioprozessentwicklung in Bioreaktoren . . . . .	91

A.2.1	Parallel-Rührkesselbioreaktoren . . . . .	91
A.2.2	Wellplates . . . . .	97
A.2.3	Schüttelkolben . . . . .	99
<b>B</b>	<b>Anhang: Experimenteller Teil . . . . .</b>	<b>102</b>
B.1	Lizenzen . . . . .	102
<b>C</b>	<b>Kooperierende Arbeiten . . . . .</b>	<b>104</b>
<b>D</b>	<b>Lebenslauf des Autors . . . . .</b>	<b>106</b>



# Abkürzungsverzeichnis

<b>ARD</b>	acoustic resonance densitometry
<b>AU</b>	amplitude units [mV]
<b>BPE</b>	Bioprozessentwicklung
<b>BSA</b>	bovine serum albumine
<b>BTM</b>	Biotrockenmasse
<b>CC</b>	cell concentration
<b>CCD</b>	charge-coupled device
<b>CDW</b>	cell dry weight
<b>CHO</b>	chinese hamster ovary
<b>CIP</b>	cleaning in place
<b>CNC</b>	computerized numerical control
<b>CSTR</b>	continuous flow stirred tank reactor
<b>CV</b>	Variationskoeffizient
<b>DCU</b>	digital control unit
<b>DLR</b>	dual lifetime referencing
<b>DMSO</b>	dimethyl sulfoxide
<b>DO</b>	dissolved oxygen
<b>ENFET</b>	enzyme field-effect transistor
<b>FQS</b>	Fehlerquadratsumme
<b>FSC</b>	forward scatter
<b>GFP-GST</b>	glutathione-S-transferase-tagged green fluorescent protein
<b>Glc</b>	Glucose
<b>GLP</b>	good laboratory practice
<b>GMP</b>	good manufacturing practices
<b>HCP</b>	host cell protein
<b>hLIF</b>	human leukemia inhibitory factor
<b>HTS</b>	high throughput screening
<b>IB</b>	inclusion bodies

<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>ISFET</b>	ion sensitive field-effect transistor
<b>KNN</b>	Künstliche Neuronale Netzwerke
<b>LB</b>	lysogeny broth
<b>LED</b>	light emitting diode
<b>MIR</b>	mid-infrared
<b>MO</b>	Mikroorganismen
<b>MOSFET</b>	metal-oxide-semiconductor field-effect transistor
<b>MRS</b>	de Man, Rogosa und Sharpe
<b>MTP</b>	Mikrotiterplatten
<b>NADH</b>	Nicotinamidadenindinukleotid
<b>NB</b>	non baffled
<b>NIR</b>	near-infrared
<b>OD<sub>x</sub></b>	Optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
<b>OEM</b>	original equipment manufacturer
<b>OTR</b>	oxygen transfer rate
<b>OUR</b>	oxygen uptake rate
<b>PA</b>	Polyamid
<b>PAT</b>	process analytical technology
<b>PBRs</b>	Parallelbioreaktorsysteme
<b>PD</b>	photodiode
<b>PDMS</b>	Polydimethylsiloxan
<b>PEEK</b>	polyether ether ketone
<b>PID</b>	potential integral differential
<b>PSO</b>	particle swarm optimization
<b>PTFE</b>	polytetrafluoroethylene
<b>PVC</b>	polyvinylchloride
<b>RFID</b>	radio-frequency identification
<b>RIFTS</b>	interferometrische Fouriertransformationsspektroskopie

<b>RMSEP</b>	root mean square error of prediction
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamid gelelectrophoresis
<b>SEM</b>	scanning electron microscope
<b>SFC</b>	shake flask controller
<b>SFR</b>	shake flask reader
<b>SIP</b>	sterilization in place
<b>SiPA</b>	porous Si-based optical sensor
<b>SLA</b>	stereo lithography
<b>SLS</b>	selective laser sintering
<b>SSC</b>	side scatter
<b>SU</b>	Single–use
<b>TB</b>	terrific broth
<b>UF</b>	Ultrafiltration
<b>VBA</b>	visual basic for applictions
<b>WB</b>	with baffles

# 1 Einleitung

*„Whole areas of knowledge and information have been defined into nonexistence because the system cannot know, understand, control, or measure them.“*

*Anne Wilson Schaefer*

Wissen und Information haben sich zu den wichtigsten Ressourcen des 21. Jahrhunderts entwickelt. Viele Prozesse und Entscheidungen in Industrie und Wirtschaft hängen von wenigen Schlüsselinformationen ab. Das rechtzeitige Bewusstsein über relevante Informationen ist dabei genauso so wichtig wie die Vorhersage von zukünftige Entwicklungen. Einen industriellen Prozess auf Basis von erhaltenen Informationen aktiv und genau zu steuern, stellte einen Meilenstein in der technischen Entwicklung dar. Kombiniert werden hierbei Sensoren mit Reglern zur Messung und aktiven Änderung eines Zustandes. Ein frühes Beispiel für das Zusammenwirken von Information und Aktion ist der von Cornelius Drebbel 1624 entwickelte automatische Brutapparat, der mit Hilfe der aktuell gemessenen Temperatur die Heizleistung mechanisch steuerte. Heute hat sich die vollautomatisierte Prozessüberwachung und –steuerung in vielen Bereichen vollständig etabliert. Vielmehr wird von Maschinen ein zunehmend autonomes Arbeiten, Analysieren und Entscheiden erwartet. Dabei werden auch kognitive Fähigkeiten des Menschen wie Kreativität und Flexibilität bei Entscheidungsprozessen in die „künstliche Intelligenz“ (KI) des Gerätes integriert. Diese Technologien stehen aus praktischer Sicht noch am Anfang, haben aber ein sehr großes Potenzial Prozesse intelligenter zu planen, Unregelmäßigkeiten besser zu beherrschen und Analyseergebnisse zielgerichteter zu bewerten. Technische Entwicklungen tragen seither maßgeblich zu zukunftsweisenden Veränderungen in der Biotechnologie und biotechnologischen Forschung bei. So wurde erst durch Echtzeitmessung und automatischer Einstellung des pH-Wertes bei der Herstellung des lebenswichtigen Antibiotikums Penicillin G in Bioreaktoren in den 1940er Jahren eine effektive Trennung von Wachstums- und Produktionsphase erreicht [59, 80, 104]. Dies wirkte

sich erheblich auf die Penicillin-Ausbeute und Reproduzierbarkeit der Herstellung aus. Seit dieser Zeit hat insbesondere die technische Miniaturisierung von Sensoren und Reglern zum Steuern von Bioprozessen die Entwicklung neuer Verfahren zur Herstellung medizinischer Präparate oder chemischer Produkte effizienter und ökonomischer gemacht. Dabei können verschiedene Bedingungen (z. B. Temperatur, pH-Wert) und Stoffe (z. B. Substrate) für die Entwicklung eines Bioprozesses bereits im Kleinen (z. B. mit Schüttelkolben) getestet und analysiert werden. Das anschließende Aufskalieren (Scale-up) des Verfahrens in größeren Bioreaktoren wird dadurch risikoärmer und ressourcenschonender. Deshalb bestand das Ziel dieser Arbeit darin Echtzeitanalytik und pH-Wert-Steuerung im Bioprozess zu miniaturisieren. Hierbei sollte die Echtzeitmessung von Zelldichte, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und die automatische Regelung des pH-Wertes in Schüttelkolben ermöglicht werden.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Bioprozessentwicklung

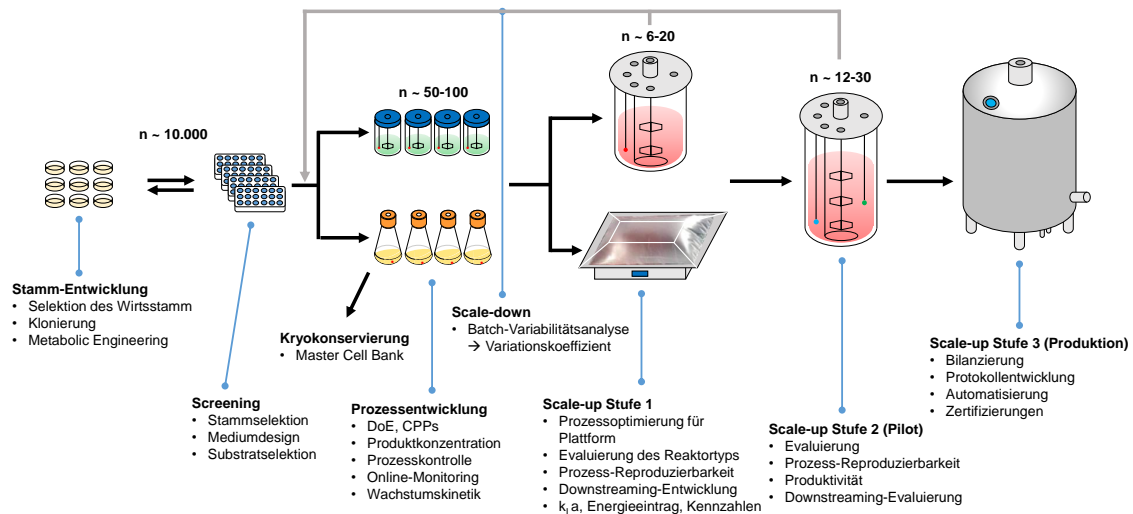
#### 2.1.1 Grundlegende Paradigmen der Bioprozessentwicklung

Die Bioprozessentwicklung (BPE) ist eines der Grundpfeiler zur Etablierung und Optimierung biotechnologischer Großprozesse in Wirtschaft und Industrie. Ihre Ziele liegen dabei in der kommerziellen Biosynthese von verschiedensten chemischen Grundstoffen, Spezialchemikalien, Naturstoffen, Proteinen und anderen biogenen Makromolekülen. Es werden abhängig von den jeweiligen Entwicklungsphasen grundlegende Teilaufgaben wie Metabolic Engineering, Stammselektion, Medien/Feed-Entwicklung, Reaktordesign, Sensorentwicklung und Entwicklung einer angepassten Prozesskontrolle verfolgt [14, 39]. Der große experimentelle Aufwand zur Ermittlung günstiger Prozessparameter und leistungsfähiger Zellstämme hat zur Entwicklung progressiver Verfahren wie dem Hochdurchsatz-Screening (HTS) geführt. Durch Kombination von Reaktor-Miniaturisierung, Parallelisierung und Prozessautomation wird der Zeitaufwand für das Screening drastisch minimiert [79]. Abgesehen von technologischen Lösungen, um die Entwicklungszeiten zu verkürzen, wurden Verfahren wie die statistische Versuchsplanung (DoE) entwickelt, um gleichzeitig die Anzahl der benötigten Experimente auf ein Minimum zu reduzieren [82, 105]. Üblicherweise sind 50–60 Experimente zur Prozesscharakterisierung erforderlich, um einen Prozess innerhalb von 6–8 Monaten zu etablieren. Bei einer rundenbasierten Abfolge von DoE mit jeweils 5–10 Parameter pro Runde kann die Anzahl auf 20–30 Experimente reduziert werden [7]. Weiterhin wurden aufgrund des hohen Optimierungsdrucks, der seitens der verstärkten Vermarktung von Biosimilars entstanden ist, höhere Qualitätsstandards an etablierte Prozesse angelegt. Die Verfahren zum Erreichen dieser Standards lassen sich auch auf die Entwicklung neuer Prozesse übertragen. Neue Paradigmen

wie das „Quality by Design“ (QbD) verfolgen den Ansatz, dass die Qualität eines biotechnologischen Produktes nicht ausschließlich durch einen hohen Aufwand an Testverfahren und Qualitätssicherungsmaßnahmen bestimmt wird, sondern primär bereits mit der Prozessentwicklung gestaltet wird. Der wichtigste Teil dieser Methodik besteht in der Ermittlung von Korrelationen zwischen den kritischen Prozessparametern und der gewünschten bzw. unerwünschten Qualitätsmerkmale eines Produktes [44]. Diese Faktoren werden auch als *critical quality attributes* (CQAs) und *critical process parameters* (CPPs) bezeichnet [105]. Beispiele für diese Prozessparameter sind in Tab. A. 1 (S. 90) und Tab. A. 2 (S. 91) erläutert. Das DoE wird innerhalb des QbD genutzt, um potentielle CQAs und CPPs zu bestimmen und deren Anzahl einzugrenzen. Bei den verwendeten statistischen Verfahren handelt es sich häufig um die *partial least square regression* (PLSR) und *principal component analysis* (PCA) [51]. Abgesehen von aktuellen Prozessdaten liefert die Analyse großer, historischer Datensätze („Data-Mining“) wertvolle Korrelationen für das QbD. Eine vollständige Aufklärung von kausalen Zusammenhängen innerhalb der Korrelationen werden durch diese Verfahren häufig jedoch nicht gefunden oder gesucht [44].

### 2.1.2 Bioprozessentwicklung in Bioreaktoren

Die technische Umsetzung einer BPE basiert auf dem Konzept durch die Miniaturisierung von Bioreaktoren (Scale-down) optimale Parameter, Limitierungen und Risikofaktoren so früh wie möglich bei noch geringen Prozesskosten zu finden (Abb. 2.1.1, S. 5) [14]. Es werden Reaktorsysteme bevorzugt mit denen eine gute Vorhersage dieser Faktoren in späteren Stufen möglich ist [79]. Während des Scale-up müssen die ermittelten optimalen Parameter in Pilotreaktoren (ca. 20–100 l) als Zwischenglied zu Großfermentern erneut validiert werden [7]. Vor allem in geschüttelten Bioreaktoren wie Schüttelkolben, Wave-Bioreaktoren und Mikrotiterplatten sind Fluidodynamiken, Oberflächenspannung und Mischkinetiken grundlegend verschieden von denen in Rührkesselreaktoren (STR). Hierbei müs-



**Abb. 2.1.1** Strategien der Bioprozessentwicklung im Überblick. Dargestellt ist der klassische Weg vom Screening im kleinen Maßstab über Kleinbioreaktoren hin zu Pilotreaktoren und Produktionsfermentern [7, 20, 79]. In der Pilotstufe kann ein Scale-down zur erneuten batch-Variabilitätsanalyse sinnvoll sein.  $N$  = Anzahl der Experimente.

sen für eine valide Übertragung der ermittelten Prozessdaten geeignete, definierte Kriterien herangezogen werden; ein identischer spezifischer Energieeintrag,  $k_L a$ -Wert, Rührer-Schnelllaufzahl und  $pO_2$ -Level [14, 34]. Dabei sollte die Kombination und Priorität der Parameter je nach Aufgabenstellung angepasst werden. In mikrobiellen Prozessen sind der  $k_L a$  und  $pO_2$ -Wert wesentlich wichtigere Kriterien als die Rührer-Schnelllaufzahl, die bei der Begrenzung von Scherstress berücksichtigt wird [34]. Ein weiterer grundlegender Faktor in der BPE ist der Variationskoeffizient (CV) von Wachstumsraten, Substrataufnahmeraten und Produktbildungs-raten zwischen einzelnen Reaktoren, da ein hoher CV zur Missinterpretation von Messergebnissen führt und die Aussagekraft von DoEs reduziert. Dieser Fall tritt beispielsweise bei unterschiedlicher Positionierung von Schüttelkolben innerhalb eines Inkubators auf (Temperaturgradient) [105], wobei auch Fertigungstoleranzen relevant sein können. Im Idealfall ist der CV einer Messgröße kleiner als dessen Bestimmungsgrenze [79]. Einen großen Einfluss auf die BPE der letzten 15 Jahre hatte der Einsatz von Single-use(SU)-Reaktoren sowie vorkalibrier-



ter SU-Chemosensoren (Sensorspots). Insbesondere durch die kurzen Instandsetzungszeiten, der schnellen Verfügbarkeit und dem geringeren Wartungsaufwand von SU-Sensoren gegenüber konventionellen Messsonden können Entwicklungszeiten stark reduziert werden [35, S. 147][65]. Ein zweiter Faktor ist die Automatisierung von Screening-Verfahren durch Liquid-handling-Systeme mit denen auch Seed-trains innerhalb einer geschlossenen, sterilen Umgebung unter online-Messung relevanter Prozessdaten realisiert werden können [8, 14].

Die Wahl eines geeigneten Reaktorsystems für die BPE hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu wird eine detaillierte Beschreibung von Charakteristika der am häufigsten eingesetzten Parallelbioreaktoren inklusive ihrer Sensorsysteme in Kap. A.2 (S. 91) gegeben. Eine zentrale Rolle spielt der verwendete Organismus und die Art des Bioprozesses. Ein unter aeroben Bedingungen durchgeführter Prozess mit hohem Sauerstoffbedarf benötigt beispielsweise hohe Agitationsraten (Schütteln oder Rühren). In der Regel können sehr hohe Sauerstofftransferaten mit geschüttelten Bioreaktoren nur schwer erreicht werden. Dennoch gibt es Möglichkeiten durch spezielle Wellenbrecher oder Schikanen diese zu optimieren, wodurch in Schüttelkolben die gleichen  $k_L a$ -Werte (volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient) wie in Rührkesselreaktoren erreicht werden können. Im direkten Vergleich der typischen Bioreaktoren wird deutlich, dass es große Unterschiede in Bezug auf Investitionskosten, benötigtes Know-how und Möglichkeiten zur Prozesskontrolle gibt (Tab. A. 3, S. 92). Während für parallele Rührkesselbioreaktoren, Wellplates und Schüttelkolben pH-,  $pO_2$ - und Biomassensensoren kommerziell zur Verfügung stehen, ist eine Echtzeit-Prozesskontrolle für pH und  $pO_2$  nur für Rührkesselbioreaktoren etabliert. In der Mehrheit der Bioprozesse kann lediglich durch kontinuierliches Aufzeichnen kritischer Messgrößen der Prozessverlauf exakt wiedergegeben und kurzweilige Prozessgrößenänderungen dargestellt werden. Bei bestimmten Bioprozessen wird eine maximale Produktkonzentration nur in einem bestimmten Zeitintervall erreicht, da der Stoff wieder abgebaut wird. Dies korreliert häufig auch mit Veränderungen der Basisgrößen pH,  $pO_2$  und Bio-

masse. Mit Chemosensoren ausgestattete Schüttelkolben stellen hier einen guten Kompromiss zwischen Investitionskosten und ihrer Scale-up-Fähigkeit dar und werden deshalb in dieser Arbeit genauer behandelt.

## 2.2 Sensoren in der Bioprozessüberwachung

Im ersten Kapitel wurde beschrieben mit welchen Reaktorsystemen Bioprozesse erfolgreich aufgebaut werden können und welche wichtige Rolle Sensoren bei der BPE spielen. Es wurde deutlich, dass aus ökonomischen wie auch ökologischen Gründen hohe Miniaturisierung sowie Parallelisierung von Reaktoren die Grundlage für zukünftige nachhaltige Screening-Prozesse ist. In diesem Kapitel wird deshalb weiterführend die Rolle von Einzelsensoren sowie Multisensoren für Anwendungen mit geringer Raumverfügbarkeit diskutiert. Im speziellen sind Biomassesensoren eine der unentbehrlichen Sensorklassen für Kultivierungsprozesse, um den aktuellen Status der Kultur zu beurteilen und eine automatisierte Prozesssteuerung durchführen zu können.

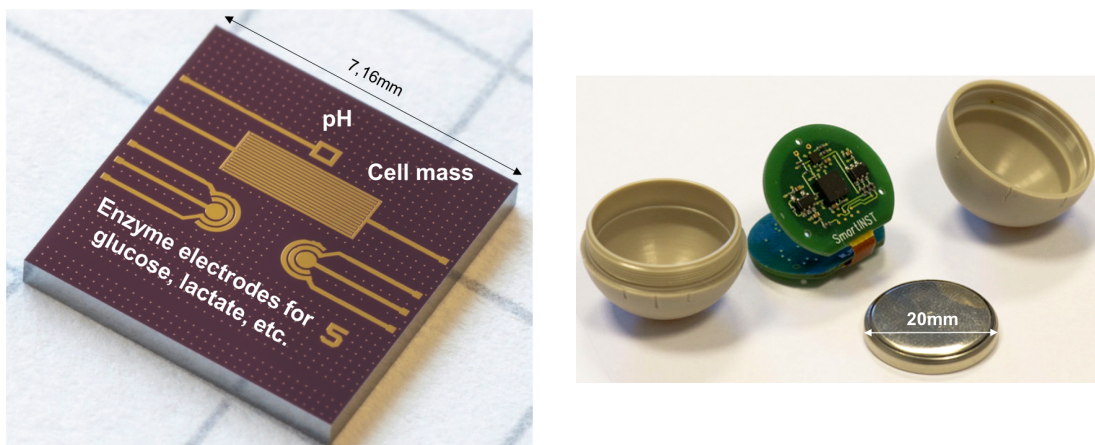
### 2.2.1 Multisensoren in der Bioprozessanalytik

Multisensoren stellen eine Weiterentwicklung der bisherigen routinemäßig eingesetzten Einzelsensoren (z. B. Messelektroden) zur Messung einer Prozessgröße dar. Dabei ist per Definition nicht klar abgegrenzt, ob ein physikalisches Prinzip zur Messung mehrerer Größen genutzt wird oder mehrere Sensorelemente in ein übergeordnetes Bauteil integriert wurde. In beiden Fällen ist der Raumbedarf eines Multisensors geringer als der mehrerer Einzelsensoren. Insbesondere im zweiten Fall, da elektronische und mechanische Bauelemente teilweise redundant sind und von mehreren Sensoren parallel genutzt werden können. Technisch kann bereits durch Zusammenfassung von miniaturisierten und innerhalb eines ein Einschubrohrs ( $d = 4 \text{ cm}$ ) radial angeordneten Messelektroden eine erhebliche Verkleinerung der Reaktorsensorik erreicht werden [93]. Dadurch beeinflussen submers angewandte Multisensoren die Fluidodynamik in Bioreaktoren weniger und Biopro-

zessdaten können leichter zwischen Reaktoren verschiedenen Bauarten verglichen werden. Applikationsbeispiele zeigen die einfache Integration eines Multisensors bestehend aus fluoreszenzbasierten Chemosensoren für pH- und pO<sub>2</sub>-Messung, einem Pt-1000-Temperatursensor sowie einem Leitfähigkeitssensor zur indirekten Messung der Biomasse in SU-Reaktoren [133]. In weiteren Studien wurde die Kombination von Impedanzspektroskopie zur online-Biomassenmessung und 2D-Fluoreszenzspektroskopie zur Überwachung intrazellulärer Fluorophoren evaluiert. Als Testszenario diente die Überexpression rekombinanter Proteine während fed-batch-Kultivierungen. Hierbei zeigten online-Impedanzmessung und offline-BTM eine gute Korrelation. Weiterhin existierte eine Korrelation des Anstiegs von Fluoreszenzsignal im Exzitations-/Emmissionsbereich von NADH sowie des an den Zellen reflektierten Streulichtes im UV-Bereich ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ ) mit dem Zeitpunkt der Induktion der Genexpression. Letzteres wurde insbesondere mit der Bildung von intrazellulären Proteinaggregaten (inclusion bodies, abgek. IB) in Verbindung gebracht. Darüber hinaus konnte erwiesen werden, dass sich die Qualität chemometrischer Modelle durch multiparametrische Datensätze signifikant verbessert (d. h. Reduktion des *root mean square error of prediction* (RMSEP)) [23]. Aus der Kombination der Messdaten verschiedener Sensoren lassen sich im folgenden Stellwerte von Prozessparametern für die Optimierung von Bioprozessen wie z. B. der IPTG-Konzentration ableiten. Hierbei lässt sich die Größenordnung der „metabolic burden“ anhand des online-Biomassemonitoring durch die Reduktion der Wachstumsrate ermitteln, während Fluoreszenz- oder UV/NIR-Streulichtsensoren Messdaten bzgl. der Produktkonzentration liefern.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsfeld für Multisensoren ist die Abgasanalyse von Bioprozessen, um in dieser Weise den Substratumsatz bzw. den respiratorischen Quotienten zu bestimmen und die Bildung leicht flüchtiger Substanzen nachzuweisen. Atline-Sensorarrays zur Abgasanalyse bestehend aus verschiedenen MOSFET(metal oxide semiconducting field effect transistors)-Sensoren und einem CO<sub>2</sub>-Sensor basierend auf IR-Absorptionsmessung. Mit Hilfe von künstli-

chen neuronalen Netzwerken (KNN) können Biomassenkonzentration und Wachstumsrate während einer Kultivierung im Prozess vorhergesagt werden [6]. Im Vorfeld werden KNN dazu mit historischen Kultivierungsdaten trainiert. Derartige Sensoren können auch im Tandembetrieb mit gaschromatographischen Säulen für das online-Monitoring von Produkten wie Ethanol oder Essigsäureethylester genutzt werden [57, 81]. Hierbei ist häufig eine Verarbeitung der Messdaten über PCA notwendig.



**Abb. 2.2.1** Multisensorchip zur Messung der Bioprozessparameter pH und Biomasse via Impedanzspektroskopie sowie zur amperometrischen Messung von Substrat und einiger Metabolite (links) [85]. RFID-Kugelsensor zur Messung von Bioprozessparametern (rechts) [123].

Der Trend in der Entwicklung von Multisensorsystemen zur Bioprozessüberwachung geht weiterhin in Richtung einer starken Miniaturisierung und der damit verbundenen Lokalisierung mehrerer Detektoren auf einem Bauelement (Abb. 2.2.1, S. 9) [85]. Auf einer Fläche von  $51 \text{ mm}^2$  können beispielsweise Detektoren für pH, Biomasse und mehrere chemische Metabolite aufgebracht werden. Auf einem Silizium-Chip freigelegte, spezifisch strukturierte Leiterbahnen stellen dabei Elektroden für jede Messgröße dar. Gemessen wird die Biomassekonzentration basierend auf der Impedanzspektroskopie, wobei durch ineinandergreifende Elektrodenfinger eine große elektrische Kontaktfläche zum Aufbau des elek-

trischen Feldes erreicht wird. Die amperometrische Messung von Substraten oder Metaboliten wird durch eine immobilisierte und quervernetzte Schicht von Enzymen (z. B. Glucoseoxidasen) auf der Elektrode realisiert. Als Membran dient eine dünne Überschichtung aus Polyurethan. Neben amperometrischen Messverfahren zur Substratmessung wird aktuell auch das Messprinzip des Enzymfeldeffekttransistors (ENFETs) für Sensoren eingesetzt und weiterentwickelt [52]. Hinsichtlich pH-Sensoren haben sich ionensensitive Feldeffekttransistoren (ISFETs) bzw. pH-sensitive Feldeffekttransistoren (pH-FETs) für stark miniaturisierte Biosensorsysteme zum Standard entwickelt [35, S. 160–162]. ISFETs und deren Derivate konnten sich allerdings abgesehen von speziellen Anwendungen in F&E oder in der medizinischen Diagnostik noch nicht für das Bioprozessmonitoring durchsetzen [73]. Obwohl große Fortschritte bei der Weiterentwicklung der Detektormaterialien wie Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> oder AlGaN gemacht wurden, sind ISFETs nicht mit der chemisch/mechanischen Stabilität von Glaselektroden vergleichbar. Weiterhin ist die langzeitstabile, glasfreie Verkapselung der Sensoren konstruktiv aufwändig und mangels standardisierter Fertigungsverfahren in Richtung von SU-Sensoren immer noch unökonomisch [26, 35]. Letztlich stellt auch Biofouling der Detektor-komponente ein großes Hindernis beim Einsatz in Bioreaktoren dar.

Multisensoren eignen sich darüber hinaus auch zur Multipositionsanalytik, indem mehrere Sensoren an relevanten Positionen im Bioreaktor platziert werden. Bei einem Parameter können dazu mehrere Kanäle verwendet werden. Mit den bereits vorgestellten Chemosensoren zur pO<sub>2</sub>-Messung ist es beispielsweise möglich bei Festbettreaktoren an verschiedenen Orten innerhalb des Immobilisats (Zellen in Alginat) den pO<sub>2</sub> sowie pH-Wert online zu messen. Dazu werden mit entsprechenden Sensoren gepatchte Lichtleiter in gleicher Weise mit Alginat verkapselt wie das Immobilisat, sodass vergleichbare Diffusionszeiten vorliegen. Analog dazu können auch pO<sub>2</sub>-Gradienten innerhalb einer Alginatschicht bestimmt werden [67]. Die fortgeschrittene Miniaturisierbarkeit einiger Sensoren hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von verkapselten, autoklavierbaren und frei im Medium flotieren-

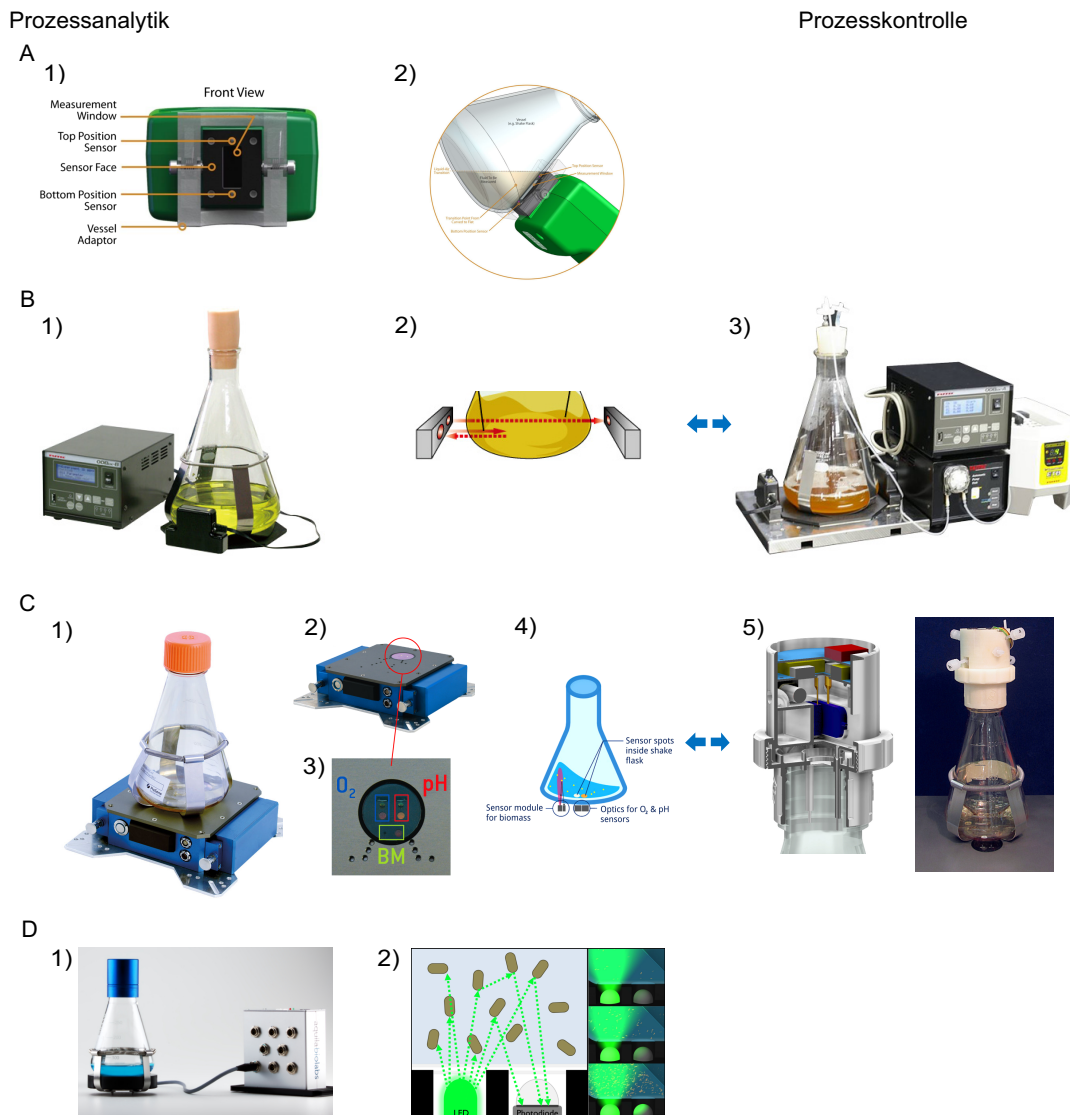
den Kugelsensoren geführt [123][129]. Diese Art der Sensorik erlaubt Multisensorik im doppelten Sinne; verschiedene Parameter können zeitkongruent gemessen werden, wobei die Verteilung der Sensorkugeln im Reaktor eine Multipositionsanalytik ermöglicht. Die Erfassung der aktuellen Sensorposition und Übertragung der Messdaten an einen Messreceiver werden hierbei via Radiowellen ermöglicht. Einige neuere *radio-frequency identification* (RFID)–Sensoren verzichten auf einen internen Energiespeicher, indem das elektrische Feld zur Impedanzmessung durch ein sekundäres magnetisches Feld von außen induziert wird [16, 90]. Sie sind weiterhin mit einem auslesbaren Mikrochip zur Datenübertragung ausgestattet. Passend zu einfachen, flexiblen und kleinen Kultivierungssystemen wie Schüttelkolben und Mikrotiterplatten haben sich Multisensoren auch zur parallelen Messung von bis zu 5 Messgrößen entwickelt, die ab Kap. A.2.2 (S. 97) vorgestellt wurden. Im nachfolgenden Unterkapitel wird deshalb der Fokus auf die Biomassemessung in Schüttelkolben gelegt.

### 2.2.2 Nicht-invasive Biomassemessung in Schüttelkolben

Die Biomassekonzentration ist eine der wichtigsten Prozessgrößen für die Prozessentwicklung. Insbesondere in Parallelreaktorsystemen ist die online-Messung der Biomasse für aussagekräftige HTS und experimentelle Reihen im Rahmen eines DoE unersetzlich [61]. Mittels kontinuierlicher Messung wird nicht nur der Probenahmeaufwand stark reduziert, sondern die zeitliche Entwicklung der Biomassekonzentration liefert indirekt Informationen bezüglich Substrat-Metabolisierung, Inhibierungen, Zellvitalität und Tendenz der Zellen zur Aggregatbildung. Während sich für Rührkesselreaktoren optische Sonden (NIR, MIR-Sonden) etablieren konnten [124, 127, 128, 142, 148], bietet die Impedanz-Spektroskopie mehr Vorteile für Wave-Reaktoren, da die Sensorkomponente als SU-Bauteil in die Wand der Reaktoren integriert werden kann [78]. Auf Grund der technischen Bauart schließen sich Messsonden aus Edelstahl für die Anwendung in Schüttelkolben und MTP aus. Weiterhin stellen zusätzliche sperrige Komponenten einen starken

## 2. Theoretischer Teil

Einfluss auf Fluidynamik und  $k_L a$ -Wert in diesen Systemen dar. Auch Impedanz-Messverfahren konnten sich für diese Reaktortypen bislang nicht etablieren, da u. a. elektrische Verbindungen aus den Reaktoren geführt und mit der Messstation verbunden werden müssen. Eine drahtlose Datenübertragung aus MTP oder Schüttelkolben heraus rentiert sich noch nicht.



**Abb. 2.2.2** Systeme zur Prozessanalytik und Prozesskontrolle in Schüttelkolben: A) OD Scanner (BugLab) [141], B) OD Monitor B&L und Pumpeinheit (Taitec Corp.) [125, 140], C) Multisensorplattform SFR vario (PreSens GmbH) [99][144] und Dosagemodul [112], D) cell growth quantifier (cgq) (aquila biolabs GmbH).

Unter den optischen Verfahren hat sich in den letzten 5 Jahren vor allem die Streulichtmessung, mit einer 180°-Anordnung zwischen Photodioden (PD) und Emitter, als geeignetes Messverfahren erwiesen [86, 97, 110]. Dieses Messverfahren wurde auch in Form von handheld-Geräten bzw. Messplattformen für Schüttelkolben technisch umgesetzt und kommerzialisiert (Abb. 2.2.2, S. 12). Der Sensoraufbau ist bei den Varianten unterschiedlich. Neben der einfachen Kombination von Emitter (LED) und PD [144] wurden Messanordnungen mit zwei Emittern und drei PD [25] sowie ein Array aus Photodioden in Kombination mit einem Emitter realisiert („cell growth quantifier“, aquila biolabs GmbH) [45]. Dadurch wird eine höhere Flexibilität bzgl. des optimalen Messortes bei verschiedenen Füllvolumina und Kolbengrößen gewährleistet. Für MTP wurde das Messprinzip durch Verwendung von Lichtwellenleitern innerhalb eines speziellen Plate-Readers miniaturisiert [11, 61, 94]. Die Vorteile der Streulichtmessung liegen neben der vollständigen Nichtinvasivität bei der einfachen Miniaturisierung und dem unkomplizierten Wechsel des Bioreaktors. Ein weiteres Kriterium ist der Messbereich. Grundsätzlich ermöglicht die 180°-Anordnung eine Proportionalität zwischen der Biomassekonzentration und dem Messsignal auch bei hohen Zelldichten. Mittels PD-Arrays können verschiedene Distanzen zwischen Emitter und PD genutzt werden, um sowohl bei geringen als auch sehr hohen Biomassekonzentrationen lineare Kalibrationen zu erreichen [131]. Letzteres kann durch eine Absorptionsmessung nicht gewährleistet werden. Die Kombination von absorptiver Messung bei 600 nm und Streulichtmessung bei 950 nm wurde ebenfalls umgesetzt (Abb. 2.2.2 B2, S. 12) [140], wobei der Messbereich der absorptiven Messung auf optische Dichten  $\leq OD_{600} 10$  beschränkt ist. Ein lineares Kalibrationsmodell liegt über diesen Messbereich hier nicht vor [83]. In speziellen Fällen (Mikroalgen, chinese hamster ovary (CHO)-Zellen) kann die Bestimmung der BTM ausschließlich indirekt optisch durchgeführt werden, da eine aussagekräftige gravimetrische Messung von sehr geringen Zelldichten nur unter Entfernung großer Probenvolumina möglich ist, was speziell in MTP ausgeschlossen ist.



## 2.3 Bioprozessregelung im Scale-down

### 2.3.1 Prozesskontrolle in geschüttelten Bioreaktoren

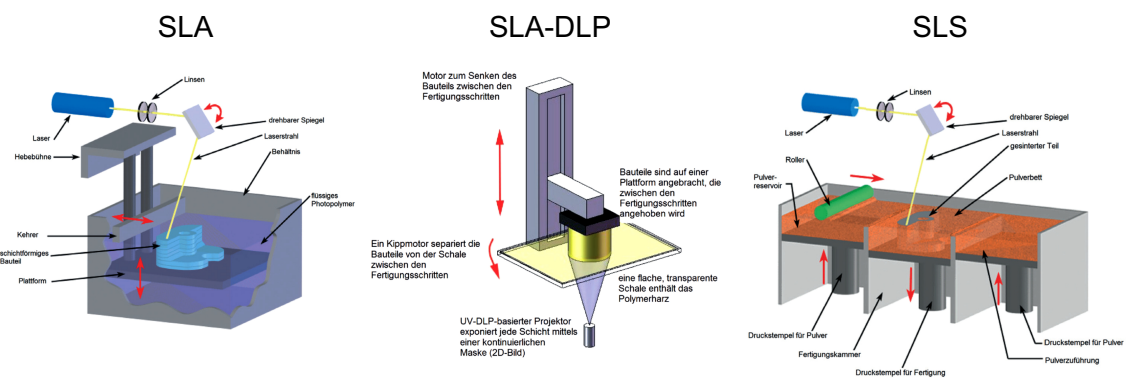
Bei der aktiven Bioprozesskontrolle in Schüttelkolben handelt es sich um ein wenig entwickeltes Feld in der Steuerungstechnik, wobei sich kommerzialisierte, technische Lösungen bis heute nicht etablieren konnten. Daher blieb im Rahmen von BPEs die Aussagekraft und Übertragbarkeit der Kultivierungsdaten von Schüttelkolben auf Bioreaktoren unter Prozesskontrolle limitiert. Die Mehrheit der Prozess- bzw. Kultivierungsverläufe ist insbesondere während der Screening-Phase stark von den eingestellten Prozessparametern abhängig. Mit der Anzahl an Prozessgrößen, die voneinander abhängig sind, steigt auch die Komplexität der Interpretation von Messdatensätzen. Unter Statierung von Kultivierungsgrößen, wie dem pH-Wert, können charakteristische Kenndaten wie Wachstums-, Substratabnahme- und Produktbildungsraten zwischen verschiedenen Experimenten einfacher verglichen werden. In Szenarien, bei denen eine kontraproduktive Inhibition des Wachstums oder der Genexpression durch pH-Drifts auftreten, ist die pH-Statierung besonders relevant [91, 121]. Dies gilt auch für Substrate oder Produkte, die abhängig vom pH-Wert in die Zellen im- bzw. exportiert werden [53]. Wichtige praktische Vorteile der Prozesskontrolle in Schüttelkolben bestehen in der möglichen Reduktion der Pufferkapazität, einer einfachen Etablierung von fed-batch-Prozessen und einer gezielten Zugabe von Substanzen (Induktoren, Repressoren, Aminosäuren) in Abhängigkeit des aktuellen Kulturstatus. Dieser spiegelt sich im online-Monitoring von pH, Biomasse und  $pO_2$  wider. Aus technischer Sicht bestand die primäre Ursache für die vernachlässigte Entwicklung im Fehlen eines kompatiblen Sensorsystems für Schüttelkolben, da der Einbau von pH-Elektroden unpraktisch ist und die native Geometrie des Schüttelkolbens sowie seine Fluidbewegung verzerrt [41]. Zum anderen waren über lange Zeit kompatible, miniaturisierte und kostengünstige Systeme zur Flüssigkeitsförderung nicht verfügbar. Dabei kommt der Entwicklung von münzgroßen Piezopumpen eine große Bedeutung zu, da sie

abgesehen von der piezoelektrischen Einheit in Massen im Spritzgussverfahren aus Polymeren hergestellt werden können [137]. Konventionelle Pumpsysteme (OD Monitor B&L, Abb. 2.2.2 B3 (S.12) oder Weuster-Botz *et al.* [117]) sind dagegen für Schüttelkolben zu groß, zu teuer oder für die Massenfertigung ungeeignet. Das für Mikrotiterplatten kommerziell erhältliche System Biolector<sup>®</sup> Pro arbeitet im Vergleich dazu mit zusätzlichen unter Druck gesetzten Wells, welche die Kultivierungswells über im Disposable integrierte Mikrokanäle und Druckluftgesteuerten Mikropumpen mit Ausgleichslösungen versorgen [33]. Die verwendeten SU-Mikropumpen und Mikroventile bestehen aus einer Membran am Boden der Wellplate und versiegeln jeweils kleine Flüssigkeits-führende Kammern. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass es in sich geschlossen ist und als Disposable  $\gamma$ -sterilisiert werden kann. In Hinblick auf die Kommunikation zwischen Stellgliedern und Reglern (Kommando & Feedback) wird mit neuen, miniaturisierten WLAN-Modulen eine erhöhte Mobilität und Flexibilität von Pumpgeräten gewährleistet (Entnahme eines Schüttelkolbens ohne Entfernung von Kabeln) [150]. In der Summe sind die Produktionskosten für mehrere Gesamtsysteme bestehend aus Schüttelkolben und Controllereinheit vergleichsweise geringer als für Parallelreaktorsysteme mit konventionellen Peristaltikpumpen, wobei auf eine aktive  $pO_2$ -Steuerung im Schüttelkolben verzichtet werden muss.

### 2.3.2 Rapid-Prototyping zur Entwicklung aktiver Laborgeräte

Additive Produktionsverfahren spielen bereits seit mehr als 10 Jahren eine wichtige Rolle zur Herstellung von spezifischen, miniaturisierten, chemischen Reaktionsräumen. Eine besondere Stellung nehmen die Mikroanalysesysteme ( $\mu$ TAS) ein, mit denen eine Analyse von Probenvolumina bis 4,7 nl möglich sind [27]. Seit den 1990er Jahren werden dafür lithographische Verfahren („Soft Lithography“) zur günstigen Herstellung von dreidimensionalen Strukturen aus Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet [4, 19]. Das auf starren Masken und Stempeln basierende Ver-

fahren ist jedoch limitiert in der Komplexität der erzeugten Strukturen. Häufig ist es nicht möglich beliebige Adapter in ein Analysesystem zu integrieren und der typische PDMS-Guss zur Herstellung von Replikaten ist zeitaufwändig [5]. Seit einigen Jahren werden 3D-Druckverfahren zur Herstellung von Mikroreaktionsräumen erprobt. Hierzu gehören z. B. Systeme zur optischen Analyse von CHO-Zellen und zur Evaluierung der Selektivität von Membranen sowie Mikrolitermischer [3, 5, 88]. Zu den für diesen Zweck favorisierten Druckverfahren zählen das Multi-Jet Modeling (MJM) und die Stereolithographie (SLA). Ersteres Verfahren basiert auf der Extrusion UV-härtender Photopolymerharze, die schichtweise aus mehreren Düsen aufgetragen und direkt am Druckkopf gehärtet werden. Das Verfahren zeichnet sich durch eine relativ hohe Auflösung und der parallelen Integration von einfach herauslösbaren Stützstrukturen im Objekt aus (z. B. aus Paraffin) [48]. Bei der SLA wird das flüssige Photopolymerharz in einer tiefen Wanne vorgelegt. Auf einer in der Wanne linear verfahrbaren Hebebühne (inkl. Tableau) wird mittels Punktlaser die Polymerisation an der Grenzfläche Harz/Luft initiiert. Zeitgleich zum Herunterfahren des Tableaus wird das Objekt innerhalb der gefüllten Wanne schichtweise von unten nach oben aufgebaut (Abb. 2.3.1, S. 16).



**Abb. 2.3.1** Etablierte 3D-Druckverfahren als Teil des Rapid-Prototyping zur Herstellung von Laborgeräten: Stereolithographie (SLA), SLA kombiniert mit der „Digital Light Processing“-Technologie (SLA-DLP), Selektives-Lasersintern (SLS) [5, 114][145, 146].

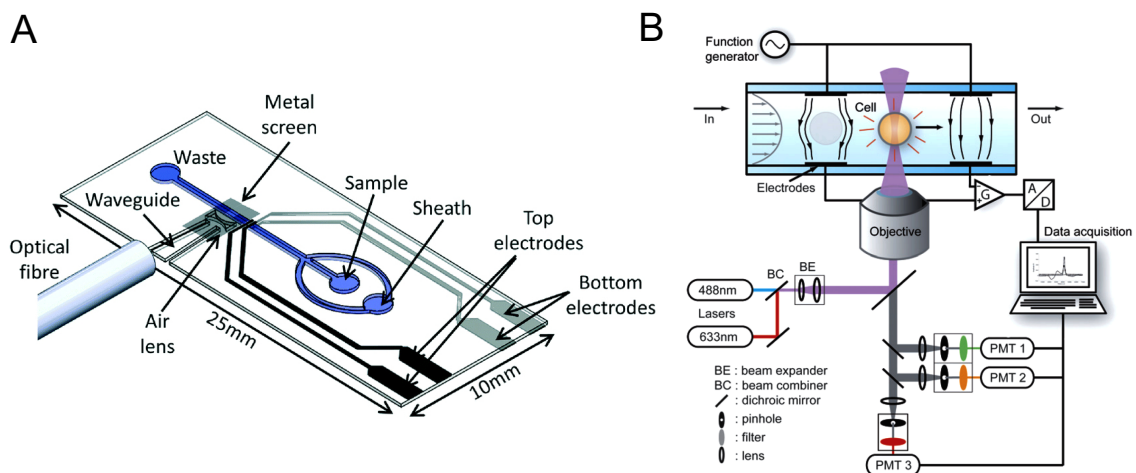
Mit diesen Verfahren kann eine sehr hohe Druckauflösung (bis zu 16  $\mu\text{m}$ ) erreicht werden, wobei sie stark von der Eindringtiefe des Lasers bzw. den Lichtabsorptionseigenschaften des Harzes abhängig ist [5, 88]. Häufig ist ein abschließendes Härten unter UV-Bestrahlung notwendig. Das SLA-Verfahrens wurde in den letzten Jahren um den Einsatz der „Digital Light Processing“(DLP)-Technologie erweitert. Hierbei wird statt einem Punktlaser ein vollständiges 2D-Bild des aktuellen Objektquerschnittes in das Polymerharz innerhalb eines flachen, lichtdurchlässigen Gefäßes projiziert. Das Objekt wird aus dem Harz kontinuierlich nach oben herausgezogen und entsteht „kopfüber“, während es an der Unterseite des Tableaus befestigt ist. Vorteile dieses Verfahrens liegen in der geringeren Störung der Polymerisation durch Luftsauerstoff, der Entkopplung von Länge des Bauteils und Volumen des Gefäßes, der höheren Druckgeschwindigkeit im Vergleich zur SLA und der ausschließlich über die Verfahreinheit in Z-Richtung einstellbaren Schichtdicke [5]. Ein Nachteil vieler UV-härtender Photopolymere ist ihre mangelnde Biokompatibilität und Autoklavierbarkeit, was ihren Einsatz in der Biotechnologie derzeit noch limitiert. Deshalb werden für medizinische Zwecke häufig andere Druckverfahren wie das Selektive-Lasersintern (SLS) zur Herstellung von Implantaten verwendet. Das bei diesem Verfahren vorwiegend verwendete Polyamid 12 (PA 12) konnte in seiner gedruckten Form mittels ISO-zertifizierten Zytotoxizitätstest an Säugerzellkulturen als biokompatibel identifiziert werden [1, 72]. In der am verbreitetsten Variante des Verfahrens wird knapp unter dem Schmelzpunkt vorgeheiztes PA 12-Pulver über eine Rolle schichtweise auf eine Plattform aufgetragen. Die Schicht wird anschließend mittels Punktlaser entsprechend der Objektkonturen gesintert. Die Plattform wird dabei diskontinuierlich heruntergefahren [37]. Die Integration von Stützstrukturen ist bei kleinen Bauteilen i.d.R nicht notwendig, da das Pulverbett als solches fungiert. SLS-gedruckte Bauteile zeichnen sich vor allem durch hohe thermische und chemische Stabilität (autoklavierbar bei 121 °C) sowie eine hervorragende mechanische Stabilität aus [48, 77]. Aus technischer Sicht eröffnen 3D-Druckverfahren im Vergleich zu konventionel-

len *computer numeric control*(CNC)–Frästechniken eine große Bandbreite komplexer Strukturgeometrien: Gebogene und verdrillte Kanäle, interne Hohlräume, Netzwerke, Mischkammern, Mikroventile und Mikroströmungsbrecher [5, 60, 77]. Obwohl viele komplexe Formen technologisch auch mit Spritzgussverfahren realisierbar wären, sind es Faktoren wie hohe Herstellungsgeschwindigkeit, Reproduzierbarkeit, schnelle Modifizierbarkeit und hohe Flexibilität, die Druckverfahren für die Entwicklung von Prototypen prädestinieren.

## 2.4 Online–Monitoring der Produktion rekombinanter Proteine

Die rekombinante Proteinproduktion in Mikroorganismen gehört weltweit zu dem am häufigsten verwendeten Verfahren um spezielle Proteine effektiv für Industrie und Forschung herzustellen. Ein Großteil der Proteine stammt aus Produzentfremden Organismen und wird dementsprechend heterolog produziert. Es fehlt daher häufig die artspezifische zellbiologische Proteinfaltungsmaschinerie, um Proteine in ihrer korrekten, nativen Struktur darzustellen. Diese ist besonders wichtig, wenn Proteine eine bestimmte Funktion (z. B. enzymatisch, rezeptorbindend) nur korrekt gefaltet erfüllen. Die stattdessen fehlgefalteten, aggregierenden Proteine bilden intrazelluläre IB. Schätzungsweise 70 % der heterolog in *E. coli* produzierten Proteine liegen als unlösliche IB vor, was die Relevanz der Problematik verdeutlicht [120]. Die nach einem Zellaufschluss in der unlöslichen Fraktion vorliegenden IB müssen aufwändig aus dem Präzipitat aufgereinigt und renaturiert werden. An dieser Stelle würde eine online–Analytik im Rahmen von BPEs die Möglichkeit bieten Kulturen und Parametersets mit geringer Tendenz zur IB–Bildung zu selektieren. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene offline–Analyseverfahren wie Durchflusszytometrie, Fluoreszenz–, Infrarot– und Impedanzspektroskopie in verschiedenen Variationen zum online–Monitoring der Protein– bzw. IB–Konzentration angewendet (Kap. 3.3, S. 54). Während bei letz-

teren Verfahren online-Messsonden oder *in situ*-Sensoren entwickelt und kommerzialisiert wurden, konnten sich miniaturisierte Sensorsysteme speziell für kleine parallelisierte Bioreaktoren wie Schüttelkolben noch nicht etablieren. Auf der anderen Seite rechnet sich der Aufbau einer atline-Analytik mit großen Durchflusssytometern für die angesprochenen Reaktoren nicht. Ein Lösungsweg stellen die bereits im vorherigen Kapitel vorgestellten Sensorplattformen und „lab on a chip“-Geräte in Kombination dar. Erstere können Fluoreszenz oder Streulicht bei verschiedenen Wellenlängen messen (Biolector<sup>®</sup> Pro, SFR vario), während letztere eine einfachere und kompaktere atline-Analytik einzelner Zellen in Form eines Zusatzmoduls der Sensorplattformen möglich macht. Hierbei könnten auch die bereits vorgestellten Piezopumpen zur Förderung von Zellsuspension innerhalb eines miniaturisiertes Durchflusssytometers verwendet werden.



**Abb. 2.4.1** A) Aufbau eines Mikrozytometers als „Lab-on-a-chip“-Gerät. Optische Komponenten zur Führung von Lichtwellen (z. B. Gaslinsen) sind Teil des Sensors. Durch variable Anordnung der Lichtwellenleiterschienen sind verschiedene Messwinkel möglich. B) Messprinzip von Mikrozytometer als Multisensoren zur Impedanz-, Streulicht- und Fluoreszenzmessung [49, 107].

Verschiedene mikrofluidische, sehr kompakte Sensoren wurden in den letzten Jahren zur Erfassung von Veränderungen der optischen Eigenschaften von Zellen entwickelt und evaluiert. Dabei wird versucht das komplette Messprinzip von Durch-

flusszytometern zu miniaturisieren und das System um eine Fluoreszenzmessung sowie Elektroden zur Impedanzmessung zu erweitern (Abb. 2.4.1, S. 19). Die Vereinzelung der Zellen wird durch hydrodynamische Fokussierung der Zellsuspension in einen Mikrokanal erreicht (Sheath-Flow), wobei auch Sensoren ohne Fokussierungskomponente entwickelt worden sind [107]. Auf der optischen Seite werden aus Kunststoff (SU-8) oder PDMS hergestellte Chips verwendet, die neben den Kanälen zur Probenaufnahme und Flüssigkeitsführung alle zur Fokussierung des Exzitationslichtes notwendigen optischen Elemente in Form von beliebig zum Probenstrom gewinkelter Lichtwellenleiterschienen (60–300  $\mu\text{m}$ ) und Gaslinsen enthalten. An den Chip wird ein geeigneter Lichtleiter einer externen Lichtquelle (z. B. Laser) herangeführt [22, 107]. Die Detektion erfolgt klassischerweise über hochsensitive Photomultiplier, wobei die sehr sensitiven Avalanche-Photodioden wesentlich kleiner sind und eine Alternative für miniaturisierte Sensoren darstellen [70]. Photodetektorsysteme der Größe einer Streichholzschachtel im Spektralbereich 190–1100 nm stehen bereits kommerziell zur Verfügung (STS Series, Ocean Optics Inc. [143]). Bei der Impedanzmessung wird zwischen zwei separaten Paaren aus miniaturisierten Elektroden ein moduliertes, elektrisches Feld aufgebaut, das beim Durchgang von Zellen verändert wird [107]. Die Membran der Zelle wird beim Durchgang durch das erste Elektrodenpaar vollständig polarisiert (negatives Signal) und beim Durchgang durch das zweite Paar erneut gemessen (positives Signal). Je nach Frequenzmodulation ergeben sich dabei unterschiedliche Sensitivitäten. Während bei geringen Frequenzen (1–5 MHz) die Sensitivität für das Biovolumen am größten ist, werden intrazelluläre Strukturen bei  $F > 10$  MHz besser aufgelöst [108]. Diese Multisensoren ermöglichen es bei einem geringen Variationskoeffizienten ( $\leq 2,1\%$ ) und einer typischen Flussrate von  $80 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  Zellgrößen zu bestimmen und verschiedene Zelltypen effektiv voneinander zu diskriminieren [22, 49, 107].

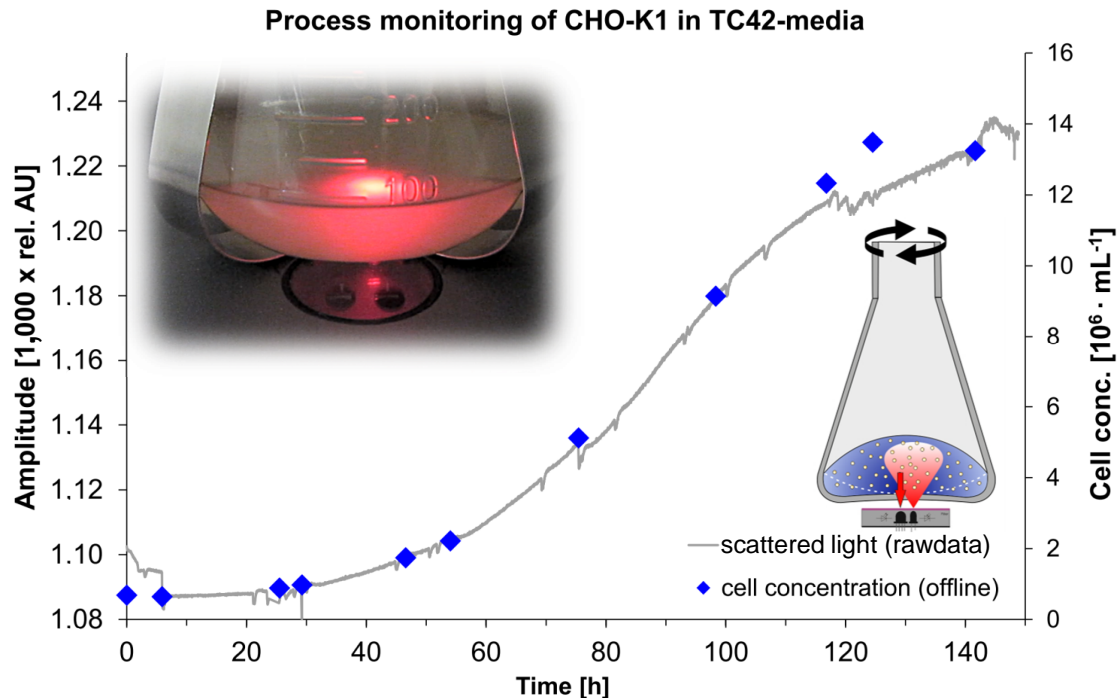
## 3 Experimenteller Teil

### Gliederung:

- 1) Online-Biomasse-Monitoring in Schüttelkolben (Kap. 3.1, S. 22)
- 2) Online-pH-Regelung in Schüttelkolben (Kap. 3.2, S. 41)
- 3) Online-Detektion von Inclusion Bodies während Schüttelkolbenkultivierungen (Kap. 3.3, S. 54)



### 3.1 Online-Biomasse-Monitoring in Schüttelkolben



Im folgenden Abschnitt wird am Beispiel eines Biomassesensors erläutert, wie optische Sensoren konfiguriert, in eine bestehende Messplattform integriert, evaluiert und weiterentwickelt werden. In der konkreten Evaluierung der Messplattform (SFR OGM FM1, PreSens GmbH) für Schüttelkolben zeigte sich neben der grundsätzlich verschiedenen Sensorsensitivität in Abhängigkeit unterschiedlicher Sensorkonfigurationen auch eine abweichende Intensität des Streulichtsignals abhängig von der Zellgröße und Zellmorphologie. Folglich war eine spezifische Kalibrierung für jede Zellart nötig (Myzelbildner, Bakterien, Hefen). In dem untersuchten Konzentrationsbereich wurden während batch-Kultivierungen zwei Klassen von Funktionen erfolgreich validiert: Logarithmische Funktionen und Potenzfunktion. Es wurde weiterhin ein typischer Trend zur Sättigung des Signals oberhalb einer Biomassekonzentrationen von  $6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  im Fall von Zellen des Stammes *S. cerevisiae* beobachtet. Es zeigte sich, dass bei der einfachen parallelen Anordnung von Emitter und PD keine lineare Kalibrierung bei  $180^\circ$ -Anordnung möglich

ist. Im Rahmen der Evaluierung des Sensors für verschieden Organismen wurden weitere Einflussfaktoren und ihre Auswirkung auf das Messsignal festgestellt (Tab. 3.1.1, S. 23).

**Tab. 3.1.1** Einflussfaktoren auf das Messsignal. Ursachen für Messrauschen und Fehlmessungen des SFR mittels 180°-Rückwärtsstreulichtmessung.

Art	Effekt	Ursache
<b>Physikalisch</b>	++ R	Grenzflächenreflexion Flüssigkeit / Gas
	+ P	Reflexion durch große Bläschen
	+ S, + R	Reflexion an submersem Schaum
	+ S	Reflexion an Grenzflächenschaum
<b>Technisch</b>	+/- R	Inhomogenität durch Schüttelbetrieb
	+/- R	Schüttelfrequenz
<b>Chemisch</b>	- S	Licht-absorbierende Medienbestandteile
<b>Biologisch</b>	+ R	Zellcluster, Proteinaggregate, Salze
<b>Informatisch</b>	+/- S	Vergrößerung der Median-Fensterbreite

++/- : starkes positives / negatives Signal gegenüber Median, +/- : positives / negatives Signal gegenüber Median, P: Einzelpeaks, R: Rauschen, S: Signallevel.

Die Schaumbildung als Störfaktor konnte durch den Einsatz von Antischaummitteln ausgeschlossen werden, wogegen die Absorption des Lichtes durch Medienbestandteile bei 600 nm insbesondere bei Komplexmedien mit hohem Hefeextrakt-Gehalt die Kalibration verändern kann. Dieser Einfluss lässt sich durch die Verwendung höherer Wellenlängen (880 nm) reduzieren, wobei der Signalgewinn von vielen PD bei ca. 850 nm ein Maximum besitzt und sich dieses positiv auf die Sensitivität auswirkt [132]. Da eine konstante Messzone im System fehlt, wurde bedingt durch Grenzflächenreflexionen ein hoher S/N ratio bei der Messung geringer optischer Zelldichten (ca.  $OD_{600} < 2$ ) beobachtet. Durch Integration eines speziellen Bauteils, das die Funktion einer Blende übernimmt, konnten auch Wachstumsdynamiken in diesem OD-Bereich gemessen werden. Die Optik wurde außerdem

durch Winkelung der Einstrahlung ( $60^\circ$ ) mittels eines radialen Prismas und Bündelung mehrerer Emitter weiterentwickelt. So wurde die Messung des Kulturwachstums von CHO-K1 ab Zellkonzentrationen von  $c = 5 \cdot 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$  ( $\text{OD}_{600} = 0,19$ ) ermöglicht (Abb. B. 1, S. 104). Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer Mehr- oder Multipositionsanalytik um in Kultivierungsgefäßen mit dynamischer Fluidbewegung die optimale Messposition flexibel wählen zu können.

Article

# Application of an Online-Biomass Sensor in an Optical Multisensory Platform Prototype for Growth Monitoring of Biotechnical Relevant Microorganism and Cell Lines in Single-Use Shake Flasks

Christian Ude<sup>1</sup>, Jörg Schmidt-Hager<sup>1</sup>, Michael Findeis<sup>2</sup>, Gernot Thomas John<sup>2</sup>, Thomas Scheper<sup>1</sup> and Sascha Beutel<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Leibniz University of Hanover, Institute of Technical Chemistry, Callinstr. 5, 30167 Hannover, Germany; E-Mails: ude@iftc.uni-hannover.de (C.U.); Schmidt-hager@iftc.uni-hannover.de (J.S.-H.), scheper@iftc.uni-hannover.de (T.S.)

<sup>2</sup> PreSens Precision Sensing GmbH, Josef-Engert-Str. 11, 93053 Regensburg, Germany; E-Mails: Michael.Findeis@presens.de (M.F.); G.John@presens.de (G.T.J.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: beutel@iftc.uni-hannover.de; Tel.: +49-0511-762-2868; Fax: +49-0511-762-3004.

Received: 24 July 2014; in revised form: 2 September 2014 / Accepted: 3 September 2014 / Published: 17 September 2014

---

**Abstract:** In the context of this work we evaluated a multisensory, noninvasive prototype platform for shake flask cultivations by monitoring three basic parameters (pH, pO<sub>2</sub> and biomass). The focus lies on the evaluation of the biomass sensor based on backward light scattering. The application spectrum was expanded to four new organisms in addition to *E. coli* K12 and *S. cerevisiae* [1]. It could be shown that the sensor is appropriate for a wide range of standard microorganisms, e.g., *L. zeae*, *K. pastoris*, *A. niger* and CHO-K1. The biomass sensor signal could successfully be correlated and calibrated with well-known measurement methods like OD<sub>600</sub>, cell dry weight (CDW) and cell concentration. Logarithmic and Bleasdale-Nelder derived functions were adequate for data fitting. Measurements at low cell concentrations proved to be critical in terms of a high signal to noise ratio, but the integration of a custom made light shade in the shake flask improved these measurements significantly. This sensor based measurement method has a high potential to initiate a new generation of online bioprocess monitoring. Metabolic studies will particularly benefit from the multisensory data acquisition. The sensor is already used in lab-scale experiments for shake flask cultivations.

**Keywords:** biomass sensor; light scattering; optical density; process monitoring; shake flask

---

## Abbreviations:

CC	cell concentration
CDW	cell dry weight
CHO	Chinese hamster ovary
DLR	dual lifetime referencing
DMSO	dimethyl sulfoxide
DO	dissolved oxygen
NB	no baffles
NCYC	national collection of yeast cultures
NIR	near infrared
OD <sub>x</sub>	optical density at $\lambda = x$ nm
PD	photodiode
RMSEP	root mean square error of prediction
SFR	shake flask reader
WB	with baffles

## 1. Introduction

### 1.1. Online Process Monitoring in Shake Flasks

Shake flasks are still used in biotechnology because of their easy handling, low cost and simple setup. The most common process measurements, all of which are applied by sampling and offline-measurements for shake flask growth monitoring, are: Optical density, CDW (cell dry weight) and cell concentration. In the past there has been little research on online bioprocess monitoring for shake flasks. Extensive analytics within the flask represented rather too much equipment considering the original simple concept of shake flasks. Electrochemical electrodes used for bioreactors are not suitable due to their size and their influence on the liquid-dynamics. That causes major problems in terms of full immersion of the electrodes or other submersed sensors. The idea of a minimum space demand and totally non-invasive measuring system led to the development of optical chemosensors in combination with optical fibers.

### 1.2. Optical Biomass Monitoring Methods and Devices

Online biomass monitoring via scattered light has several advantages over offline sampling. Apart from the general advantages of noninvasive, nondestructive online monitoring there are special advantages concerning the combination of light and shake flasks. Especially in small scale systems, for instance widely used shake flasks, sampling volume is highly limited while opening and removal of liquid represents a significant disturbance of the whole process.

The first *in situ* online biomass sensors were developed for large fermenters. Different types of optical sensor probes are commonly used in bioreactors [2–4]. The main differences concern

wavelength, the geometric arrangement and the angle between light source and sensor. The angle determines the sensitivity and specificity of the measured signal. Turbidity probes measure the absorbance (like photometers) with a constant light path at a  $0^\circ$  angle. They exhibit a small linear range because of the Beer-Lambert law. Measuring scattered light instead of absorbance offers a wider linear range compared to turbidity. In general the measurement using an  $90^\circ$  arrangement (nephelometry) is more sensitive at low cell concentrations, while backward scattered light (often stated as  $160^\circ$ – $180^\circ$  scattered light) still exhibits a linear correlation at high cell concentrations [2,3]. Apart from sensitivity, the specificity for certain parts of cells is affected by the arrangement of light source and sensor. The  $90^\circ$  scattered light is rather insensitive to particle size [5]. At angles  $>90^\circ$  (towards backward scattered light) the scattered light becomes more sensitive to the nucleus and organelle concentration [6,7]. It is also more sensitive to the cell membrane structure [7]. Some devices combine turbidity- and nephelometric-measurement in one sensor [8]. When optical sensors are used, interferences are caused by bubbles, foam, biofilm formation on optical components, solids and cell aggregations [4,9,10]. While foam can be prevented using anti-foam agent, bigger bubbles can only be removed in combination with a degasser or a bypass arrangement of the sensor is needed [3]. This method is inappropriate for small scale cultivation systems and advanced data filtering is necessary to remove erroneous data points.

Biomass measurement within shake flasks is facing similar challenges compared to pH and DO-measurement. There are attempts to measure optical density in shake flasks using prisms and optical fibers *in situ* [11]. A critical limitation of this concept is the reproducible installation of the optical components and the installation of the flask on the sensor. Additionally, the components in the flask act as a disturbance of the fluid dynamics and may influence the experiment. An appropriate non-invasive measurement method can be carried out by measuring scattered light. A light cone is emitted by a LED while scattered light will be detected by a photodiode (PD) using light of 600 nm wavelength or NIR (near infrared) light range [4,9]. NIR light has the advantage of being less absorbed by soluble media components [10]. LED and PD can be arranged around the flask with a certain angle offering different sensitivities and calibration ranges. In the case of shake flasks, angles  $\alpha \leq 90^\circ$  (between LED and PD) are preferable due to technical reasons. A US Patent (US 7339671) titled “Apparatus and method for monitoring biological cell culture” (published in 2005) is an example of a device which could measure the biomass concentration online [12]. It is intended to have two light sources featuring a wavelength at 650 nm for bacteria and 780 nm for mammalian cells. The angle between light source and photodiode is approx.  $60^\circ$  in order to enable a higher sensitivity at low cell concentrations. Another approach is the measurement using a non-invasive handheld device (Buglab “OD Scanner”). It works with near-infrared light [13]. A minimum liquid height of 3 cm is needed to sustain stable measurements. A linear calibration of CDW *versus* the biomass sensor signal from 0.05 up to  $10 \text{ g L}^{-1}$  with an error of  $<15\%$  was reportedly achieved using *E. coli* (Buglab, Concord, USA). The main disadvantages of handheld systems are the need for instructed staff (reproducibility), the lack of online measurement capability and a time consuming analysis procedure in case of parallel cultivations. Furthermore, stopping the cultivation in order to perform the measurement causes disturbance. This article investigates the applicability of a platform-embedded  $180^\circ$  scattered light sensor prototype (*PreSens* GmbH, Regensburg, Germany) that faces the aforementioned challenges and may be able to overcome the limitations of existing systems. Several model microorganisms and

cell lines representing aerobic and facultative anaerobic bacteria, fungi, yeasts and mammalian cells were chosen for the evaluation of the sensor. The technical design and the functional principle using an acceleration sensor have been described previously [1].

## 2. Experimental Section

### 2.1. Cultivation Methods

The used microorganisms, cell lines and the applied media are listed in Table 1. All media were prepared with deionized water obtained by Arium<sup>®</sup> 661 Ultrapure water system (*Sartorius Stedim Biotech S. A*, Göttingen, Germany). Media preparation [ $\text{g L}^{-1}$ ]: MRS (de Man, Rogorosa and Sharpe) for *Lactobacillus* (5.0 yeast extract (AppliChem), 10.0 bacto-tryptone (BD), 20.0 glucose (Sigma-Aldrich), 5.0 natriumacetate (Fluka), 2.0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Fluka), 0.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fluka), 0.05  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 1.58 citric acid (Riedel de Haën), 5.0  $\text{mL L}^{-1}$  vitamin solution, pH 6.5). YM (yeast and mold) (3.0 yeast extract, 5.0 malt extract (Sigma-Aldrich), 5.0 soy broth (Sigma-Aldrich), 10.0 glucose, pH 6.0). FM (fungi medium) for *Aspergillus* (10.0 soy broth, 20.0 glucose, 1.0  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Riedel de Haën), 1.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fluka), 5.0  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  (Roth), 2.0  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  pH 6.0). TC42-medium (TeutoCell) for CHO-K1. 200  $\mu\text{L L}^{-1}$  of TEGO<sup>®</sup> Antifoam KS 911 were added to each medium.

**Table 1.** Microorganisms and media used for sensor evaluation.

Species	Strain	Medium
<i>A. niger</i>	D15 Xyn2	“FM”
CHO	K1	TC-42 (TeutoCell) + 8 mM glutamine
<i>L. zeae</i>	DSM 20178	MRS
<i>K. pastoris</i>	DSM 70382	YM

Vitamin-solution [ $\text{mg L}^{-1}$ ]: 2.0 Biotin, 2.0 folic acid, 10.0 pyridoxine-HCl, 5.0 thiamin-HCl, 5.0 riboflavin, 5.0 nicotinic acid, 5.0 D-Ca-pantothenate, vitamin B12, 5.0 p-aminobenzoic acid, 5.0 lipoic acid.

The cultivation parameters are listed in Table 2. Standard X-ray sterilized, disposable shake flasks (Corning<sup>®</sup>) equipped with DO/pH-sensorspots, with baffles (WB) or without baffles (NB) were used (*PreSens GmbH*, Regensburg, Germany). Shaking was performed on an orbital shaker with 20 mm shaking radius (Certomat<sup>®</sup> SII, *Sartorius Stedim Biotech S. A*, Göttingen, Germany). For mammalian cell cultivation, a shaker with 10 mm shaking radius was used (DOS-10M, *Elmi Ltd.*, Riga, Latvia).

**Table 2.** Cultivation parameters used for the sensor evaluation.

Species	T. [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Agitation [rpm]	Flask Type [mL]	Volume [mL]	Preculture [h]
<i>A. niger</i>	37	150	500 WB	250	20
CHO-K1	37	130	500 NB	200	144
<i>L. zeae</i>	37	100	500 NB	100	48
<i>K. pastoris</i>	30	150	500 WB	100	18

WB = with baffles, NB = non baffled

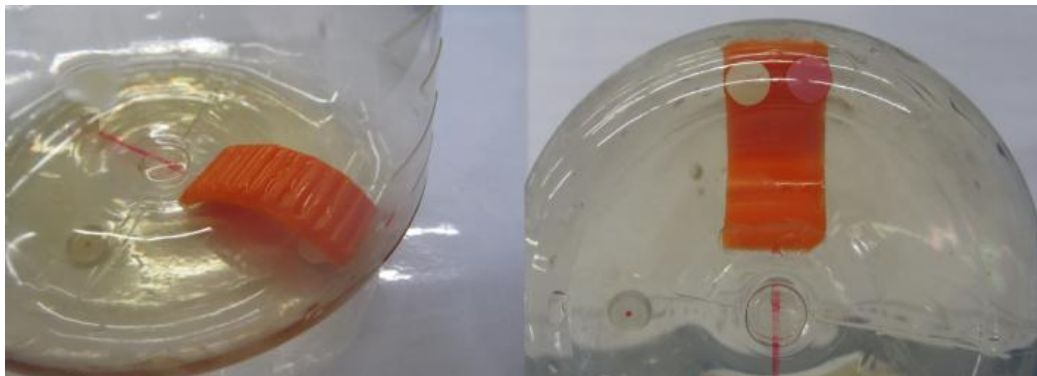
### 2.1.1. A. Niger Cultivation Method

*A. niger* was grown from spores which were conserved in cryovials containing 0.9% (w/v) NaCl-solution and 5% (w/v) glycerol. Precultures were inoculated with  $5 \times 10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$ . After 20 h the mycelium balls were homogenized under sterile conditions by an ultra-turrax<sup>®</sup> T25 for 2 min. For the main culture 10% (v/v) of the homogenate was used. For each CDW data point one flask was prepared and cultivated in parallel.

### 2.1.2. CHO-K1 Cultivation Method

CHO-K1 cells were grown from cryovials containing 10% (v/v) DMSO (dimethyl sulfoxide). Main cultures were inoculated with  $6\text{--}7 \times 10^5$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . The cells were grown in two passages in order to adapt them to the media and cultivation conditions. In this stage cells were grown at least to  $1 \times 10^7$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$  in about 6 days on the sensor-platform. For passage cells with a viability of 95%–100% were used. The growth of CHO-K1 could not be measured by the standard sensor setup because of their growth at comparably low cell densities and low optical density compared to bacteria or fungi. To avoid the crucial problem of high signal noise caused by boundary layer reflections, a small light shade was mounted into the flask (Figure 1). It was made from biocompatible high density polyethylene and has the shape of a ribbed roof. It provides a constant measuring zone and absorbs reflections from the boundary layer.

**Figure 1.** Positioning of the light shade on the bottom of a corning non-baffled 500 mL disposable shake flask. White dot = pH sensorspot, reddish dot = oxygen sensorspot.



## 2.2. Offline Sampling Methods

### 2.2.1. OD<sub>600</sub> Measurement

OD measurement was performed by taking an aliquot from the culture vessel under sterile conditions. Dilutions were created with 0.9% (w/v) NaCl solution in a polystyrene cuvette (path length = 1 cm). Three dilutions were prepared and measured at 600 nm (Uvikon 922, Kontron Instruments GmbH, Düsseldorf, Germany). The dilution proportion was calculated under the condition that absorbance is below 0.7. The obtained values were averaged.



### 2.2.2. CDW Determination

For CDW determination a 2 mL aliquot was taken from the culture vessel under sterile conditions and transferred into a dried, preweighted 2 mL reaction tube. The cells were centrifuged at 16,060  $\times g$  for 5 min (yeast), 6 min (*L. zeaе*). The pellet was washed once with 0.9% (w/v) NaCl-Solution and centrifuged again (see above). The clean pellet was dried at 85 °C until a constant mass was measured. In case of *A. niger* the complete culture in the shake flask was harvested. The mycel was separated from the culture broth by filtration through a dried, preweighted 20  $\mu m$  pore filter sheet (Calbiochem® Miracloth). The mycel was purged with autoclaved deionized water. The clean mycel was dried at 85 °C until a constant mass was measured. The CDW was calculated on base of the mass difference. The reliability of the CDW determination method for bacteria and yeast was exemplarily tested with *S. cerevisiae* NCYC 1024. A 10-fold determination with a mean biomass concentration of 5.5 g L<sup>-1</sup> was performed and standard deviation determined.

### 2.2.3. Cell Counting

For cell counting a Thoma chamber with 20  $\mu m$  depth was used. Dilutions were prepared with 0.9% (w/v) NaCl-Solution. Four 25  $\mu m$  squares were counted and the cell count was multiplied with a chamber factor of  $2 \times 10^5$  in order to obtain the cell concentration in cells per mL. Dilutions were prepared in a way that cell count should not exceed 100 cells per 4 big squares. In the case of *L. zeaе* cells were counted manually. Cells of *K. pastoris* were counted by taking two pictures of the loaded counting chamber per sample with a CCD-camera. Cells on the pictures were counted according to Section 2.2.4. CHO-K1 cells were counted automatically with the cell counter AS20 (Cedex Bio HT, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Cell solutions were automatically mixed with trypan blue.

### 2.2.4. Cell Size Determination

During cultivation pictures of 1280  $\times$  960 pixels were taken of a loaded Thoma chamber (1 pixel  $\cong$  0.532  $\mu m$ ). Therefore the whole frame is equivalent with 347,669  $\mu m^2$ . The chamber factor was calculated with 143,815. Digital image processing was performed by the software *ImageJ*. That included the application of standard operations: Edge detection by Laplace-operator, binarization, opening, Watershed-algorithm (see supplementary material and data deposit). For each organism a picture of two independent cultivations was chosen. The pictures were taken during exponential growth phase. The determined area of all cells within the picture was divided by their detected count. The averaged cell plain was exponentiated by 0.5 in order to get an averaged cell size.

## 2.3. Technical Sensor Specifications

The embedded LED model used was a NSPR310S (*Nichia* Corp.), the photodiode was a GSI10530 (*General Semiconductor Industries* Ltd), the optical filter was a Calflex™ C, the cover glass was a 1 mm Schott OG590. The distance between LED and photodiode was 7.2 mm.

#### 2.4. Parameters of Online Biomass Monitoring Using the SFR

The presented experiments were performed with two types of disposable shake flasks (Corning) including sensorspots as follows:

- (1) SFS-HP5-PS<sub>t</sub>3-500-WB-VEC-v3 ID 11-34-01.
- (2) SFS-HP5-PS<sub>t</sub>3-500-NB-VEC-v3 ID 11-07-04.

The default sensorspot calibrations were:

- (1) Phase 0% air sat [ % ] 58.04, Phase 100 [ % ] 24.40, Temp 0 [ °C ] 36.70, Temp 100 [ °C ] 36.70, P [ mbar ] 975.00, pH<sub>max</sub> 22.27, pH<sub>min</sub> 55.03, pHTemp 37.00, dpH 0.56, pH<sub>0</sub> 6.67.
- (2) Phase 0% air sat [ % ] 55.16, Phase 100 [ % ] 24.17, Temp 0 [ °C ] 37.10 Temp 100 [ °C ] 37.10, P [ mbar ] 956.00, pH<sub>max</sub> 22.06, pH<sub>min</sub> 55.16, pHTemp 37.1, dpH 0.55, pH<sub>0</sub> 6.66.

The trigger angle configurations were: −134 (*L. zea*), 0 (*K. pastoris*, *A. niger*), −66 (CHO-K1). The measuring interval was 7 s while amplitude correction was set to 1.0 (bacteria, yeast, fungi), 59 s and 0.01 (CHO-K1).

#### 2.5. Dynamic Calibration Procedure

Dynamic calibration was performed by monitoring cultivation with classical offline methods and online measurement at the same time. The collected data were calibrated subsequently against each other. Sampling was generally carried out in intervals of one hour. In the case of CHO-K1 and *A. niger* twice a day. Due to the high amount of online data a set of individual VBA macros were used for calibration. The aim was up to calibrate the biomass sensor signal against CDW, OD<sub>600</sub> and cell concentration. The biomass sensor signal was forward-median-filtered with a frame of 45 data points directly after the sampling procedure. The applied calibration algorithm to find the correspondent offline value is a “vlookup” similar searching algorithm (see Supplementary Material and Data Deposit). In the case of *A. niger* one flask for each offline biomass measurement was prepared and parallel cultivations were carried out. The flasks were placed on the sensor and at least 45 data points for each calibration point were recorded. No lag-phase data was included in the calibration process. Cultivations were independently performed three times. The data of two cultivations were used for data fitting, while the data of the third cultivation was used for validation. In the case of CHO-K1 one cultivation was used for calibration. The data fitting was achieved by minimization of the  $\chi^2$  value by the Levenberg-Marquardt-Algorithm (using *Origin*<sup>®</sup> 8.5, OriginLab). Three types of functions proved to be adequate (Equations (1)–(3)).

$$f(x, a, b, c) = (a + bx)^{\frac{1}{c}} \quad (1)$$

$$f(x, a, b, c) = a - b \cdot \ln(x + c) \quad (2)$$

$$f(x, a, b, c, d, e) = a + bx + cx^2 + dx^3 + ex^4 \quad (3)$$

## 2.6. Validation Method of Dynamic Calibrations

The calibrations were validated by their reproducibility and their root mean square error of prediction (RMSEP) (Equation (4)). In this case  $m_i$  represents the offline data which was part of the calibration (see Section 2.2),  $f$  is the fitting function of the plot: “Offline measurement *versus* biomass sensor signal”.  $p_j$  represents the different parameters (a, b, c ...) which are part of the specific fitting functions. The percentaged error was calculated according to Equation (5).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (f(x_i, p_j) - m_i)^2}{n}} \quad (4)$$

$$error [\%] = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{|f(x_i, p_j) - m_i|}{f(x_i, p_j)}}{n} \cdot 100 \quad (5)$$

## 2.7. Static Calibration Procedure

The static calibration method was used to determine the upper threshold of the biomass sensor. Biomass was produced by cultivations in complex media at early stationary growth phase at  $OD_{600} = 26$ . The cell suspension was centrifuged at 2000 xg for 10 min (yeast) in 50 mL reaction tubes. The media was discarded, while the cell pellet was washed once in 0.9% (w/v) NaCl-solution. 10 mL of saline were added to the pellet and shortly, vigorously mixed. The milky supernatant was discarded. This procedure was repeated twice. The pellet was used to prepare sequential dilutions which were measured with the sensor, collecting 45 data points.

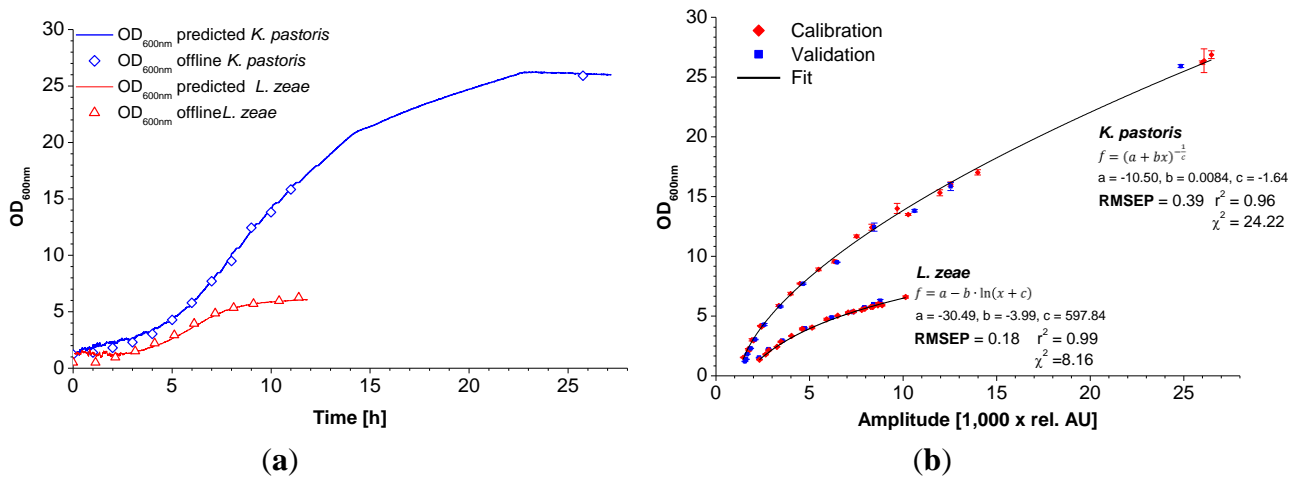
## 3. Results and Discussion

### 3.1. Application on Different Cell Strains

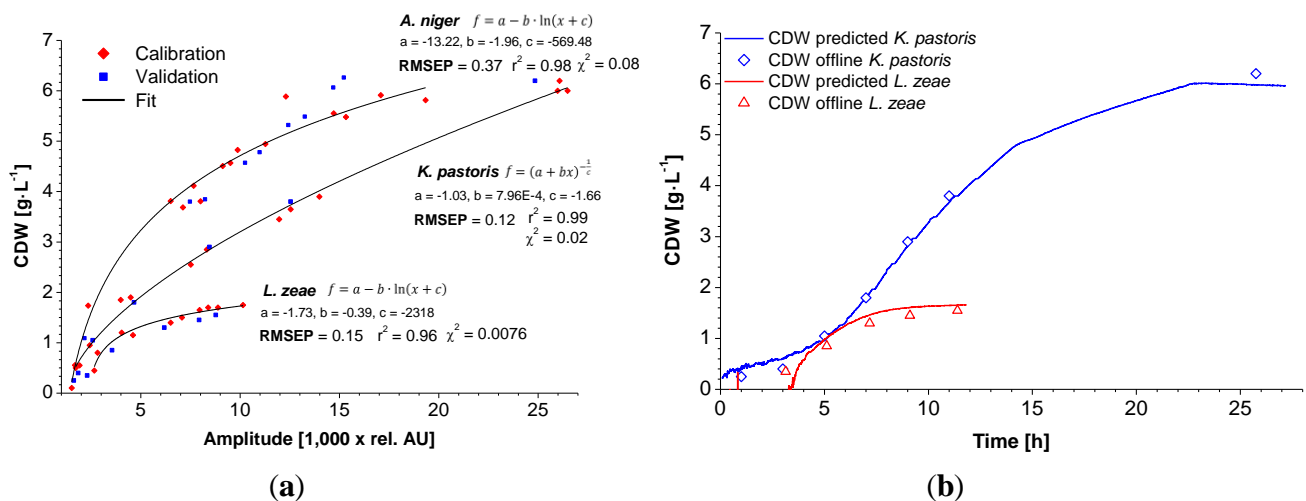
#### 3.1.1. Calibration Characteristics and Data Fitting

The used scattered light sensor proved its applicability to monitor the growth of different model organisms and cell lines commonly used in biotechnology. As previously described, the calibration against conventional methods of cultivation measurement has been successful for *E. coli* K12 and yeast [1]. In this new report, the application range was extended to *K. pastoris*, *L. zaeae*, *A. niger* and CHO-K1 cells. As shown in Figure 2, calibration of the biomass sensor signal *versus*  $OD_{600}$  exhibits a significant difference between the data sets of *K. pastoris* and *L. zaeae*. The latter holds an approx. two times higher biomass sensor signal ratio compared to the corresponding  $OD_{600}$  values. This difference increases towards higher  $OD_{600}$  values.

**Figure 2.** Exemplary dynamic calibration of the biomass sensor signal *versus* optical density at  $\lambda = 600$  nm for *K. pastoris* and *L. zeae* (a). Red diamonds represent two experiments. Blue squares represent one validation experiment. Application of the calibration function on the biomass sensor signal of the validation growth curve along with the offline measured data (b).



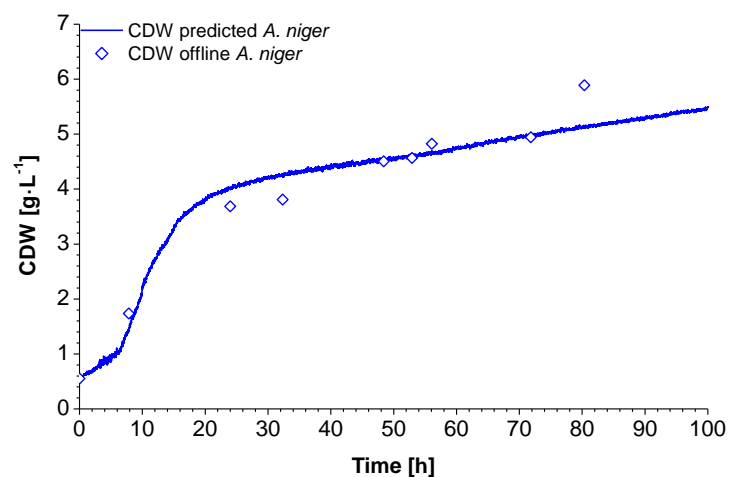
**Figure 3.** Exemplary dynamic calibration of the biomass sensor signal *versus* CDW for *K. pastoris*, *A. niger* and *L. zeae* (a). Red diamonds represent two experiments. Blue squares represent one validation experiment. Application of the calibration function on the biomass sensor signal of the validation growth curve along with the offline measured data (b).



The characteristics of the calibration functions used for data fitting are similar for both cases. In the case of *K. pastoris*, the 3-parametric power function named after Bleasdale and Nelder (Equation (1)) results in the lowest  $\chi^2$  [14]. The calibration of *L. zeae* could be better described with a 3-parametric logarithmic function (Equation (2)). A similar correlation was found during calibration of the CDW (Figure 3). Smaller stick-like cells (*L. zeae* 2.2  $\mu\text{m}$ ) exhibit more scattered light than round yeast cells (*K. pastoris* 3.7  $\mu\text{m}$ ) per  $OD_{600}$  and CDW. The mycelium of *A. niger* showed the lowest scattered light per biomass.

The bended character of the calibrations is explained by the nature of  $180^\circ$  scattered light measurements in a vessel. It is known that  $OD_{600}$ -CDW correlations can be generally described with linear functions for homogenous dilutions of cells. In contrast, the sensor light cone, generated by the LED, has a limited invasion depth into the suspension which follows the Lambert-Beer's-law. At very low biomass concentrations (approx.  $< 0.4 \text{ g L}^{-1}$ ) the light invades deep into the suspension and beyond, causing signal noise due to boundary layer reflections. These data points were excluded from the calibration. At low biomass concentrations the scattered light is induced by the entire light cone. The cell concentration close to the photodiode is comparatively low. In this case the light has to travel a relative long way to the sensor, comprising a loss in intensity (absorption). Towards higher concentrations the invasion depth decreases. The majority of the light is scattered by the cells which are close to the vessel wall, *i.e.*, close to the photodiode. The biomass sensor signal is subsequently increasing faster at higher biomass concentrations. In the case of *K. pastoris*, the bended character of the calibration maintains until  $6 \text{ g L}^{-1}$ . The application of the created calibrations using fitting functions showed a good correlation between predicted and offline data (Figure 2b, Figure 3b, Figure 4).

**Figure 4.** Application of the calibration function of *A. niger* on the biomass sensor signal of the validation growth curve along with the offline measured data.

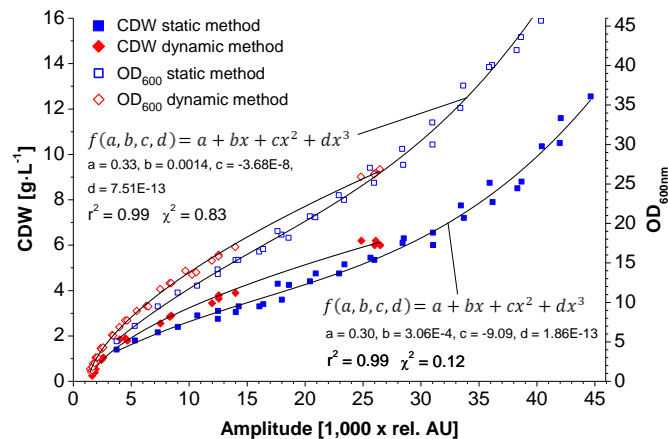


### 3.1.2. Influence of Media Composition and Sensor Detection Range

There also is a dependency of the used medium. In complex media, light absorption can be associated to different concentrations of yeast extract and its components respectively. Vitamins as well as Maillard-reaction byproducts formed during fabrication process and autoclaving play a major role (data not shown). In these investigations, MRS had the highest capability to reduce the scattered light by absorption. In addition, the optical properties of the medium are changing during cultivation; *e.g.*, substances are assimilated into the cell, which affects calibrations as well. *K. pastoris* is widely used for yield biomass cultivations. In order to investigate the upper detection limits of the sensor, cells were separated from the medium, concentrated and measured in sequential dilutions with 0.9% (w/v)-NaCl-solution. A calibration up to  $12.55 \text{ g L}^{-1}$  was possible (Figure 5) using a cubic fitting function instead of Bleasdale-Nelder. A saturation effect of the emitted scattered light above  $6 \text{ g L}^{-1}$  could be seen.

In comparison the reflectance signal of a 180° scattered light sensor probe using NIR (810 nm) showed a linear correlation up to 30 g L<sup>-1</sup> [15].

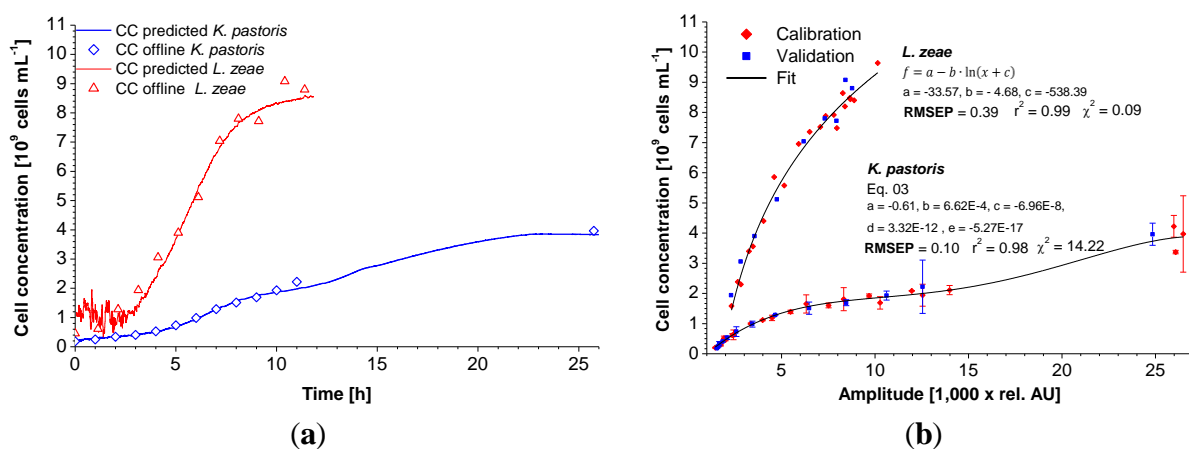
**Figure 5.** Calibration of the biomass sensor signal *versus* cell dry weight (CDW), OD<sub>600</sub> using medium free cell suspension dilutions. Parameters: 500 mL WB, 100 mL vol., 150 rpm (r = 2 cm).



### 3.1.3. Sensor Sensitivity in Consideration of Cell Morphology

Calibration of the biomass sensor signal against the cell concentration gives a clear view of the high influence of cell morphology on the scattered light intensity. Between 1.0 and 2.0 × 10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup> the generated signal of *K. pastoris* is 10-fold higher at the same cell concentration than for *Lactobacillus* (Figure 6).

**Figure 6.** Exemplary dynamic calibration of the biomass sensor signal *versus* cell concentration for *K. pastoris* and *L. zeae*. Red diamonds represent two experiments. Blue squares represent one validation experiment (a). Application of the calibration function on the biomass sensor signal of the validation growth curve along with the offline measured data (b).



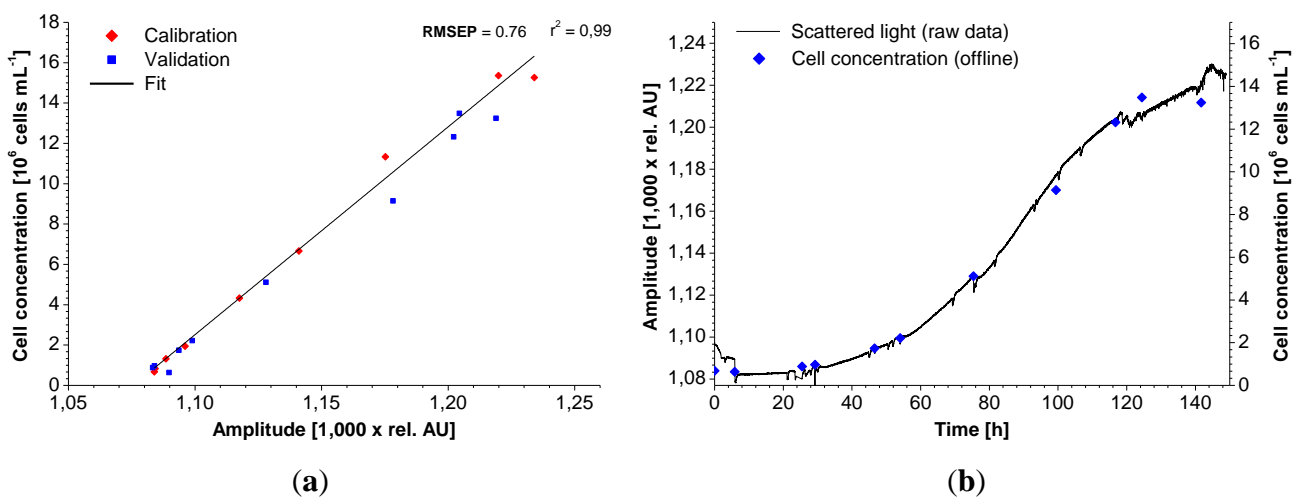
Since there is little difference of the refractive index of yeast cells (1.36–1.40 [16]) compared to *Bacillus* (1.45 [17]), this correlation is more likely determined by the shape and size of the cells. The assumption of a dependency of backward scattered light on cell morphology is supported by the drift

in the calibration of *K. pastoris*. A polynomial function is needed to fit the data (Equation (3)) while in the case of *L. zeae* the same fitting function as in OD<sub>600</sub> and CDW-calibration can be used. The analysis of the microscopical pictures revealed that the size of *K. pastoris* was significantly decreasing because of nutrient deficiency in the stationary phase of the cultivation. This behavior was not found during cultivation of *S. cerevisiae*, while calibration against the cell concentration did not show a polynomial trend either (data not shown). For microbial organisms, CDW seems to be the most universal calibration reference because of its independence from any additional optical influences and photometer specifications. In general, OD<sub>600</sub> and CDW can be used alongside because of the linearity of their correlation. Calibration against the cell concentration is only useful when cells are uniform and do not change their morphology or specific cell mass. Morphological changes would influence the backscattered light while not being visible in the cell concentration data.

### 3.2. Cultivation at Low Optical Densities

The monitoring of CHO-K1 cells with the standard sensor setup did not supply suitable calibrations in terms of a good sensitivity and dynamic range. The use of a modified shake flask (Figure 1) allowed a linear calibration against the cell concentration (Figure 7).

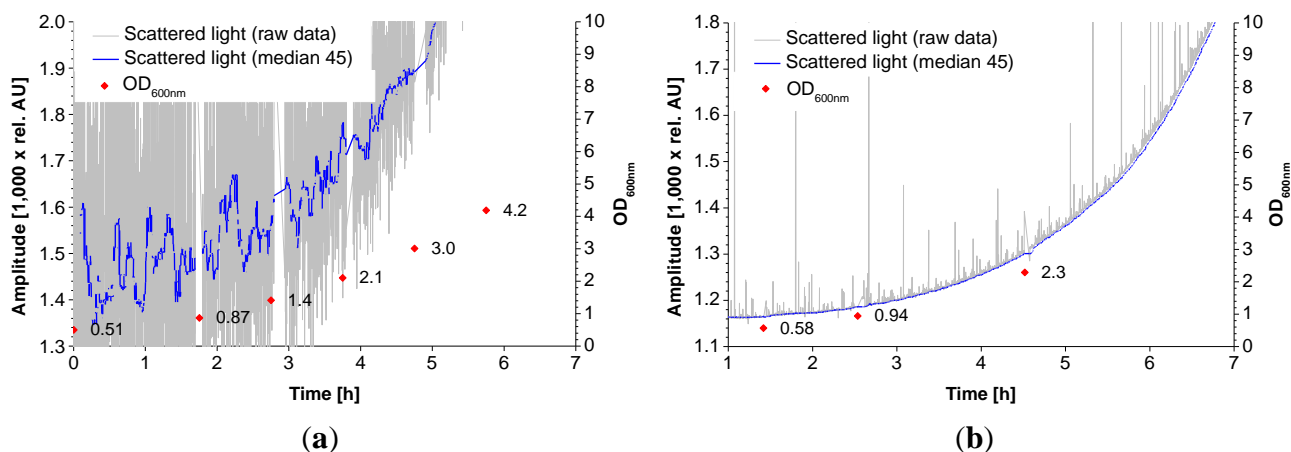
**Figure 7.** Calibration of the biomass sensor signal *versus* cell concentration using Chinese hamster ovary (CHO)-K1 and a special light shade. Red diamonds represent two experiments. Blue squares represent 1 validation experiment (a). Comparison between the biomass sensor signal and offline cell counting (Cedex) during the growth of CHO-K1 (b).



The calibration range is  $0.67 \times 10^6$ – $1.5 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup> which is sufficient for a complete cultivation monitoring. Lower cell concentrations could not be measured because the amount of backscattered light of the cells at 600 nm was too low. At these concentrations, the light reflected by the light shade dominates the base signal. It is likely that a concentration of  $>1.5 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup> could be measured and calibrated with this setup. NIR turbidity probes, which are common for bioreactors (aquasant AF 44, SIR Ingold FSC 402), also exhibit a linear calibration against the cell concentration [18]. At the end of the cultivation shown signal noise was apparently increasing. This effect is due to accumulation of cell debris and released organelle which also affects scattered light [19]. A light shade modification in the flask was also

tested during the lag-phase of microbial cultures. As seen in Figure 8, the signal to noise ratio during the lag-phase massively increased. That enabled measurements down to  $OD_{600} = 0.58$  ( $0.1 \text{ g L}^{-1}$  CDW). A critical parameter in this concept is the positioning of the light shade. Like the shake flask itself it has to be fabricated and fixed precisely. That could be a major drawback concerning mass production.

**Figure 8.** Biomass sensor signal trend during lag-phase and early exponential growth phase of *K. pastoris* with an unmodified shake flask (a) Same cultivation using a custom made light shade within the shake flask (b).



### 3.3. Reproducibility and Quality of Prediction

The statistical analysis of the calibrations showed that the scattered light sensor had a two to three times higher RMSEP (Table 3) compared to the standard deviation of the offline  $OD_{600}$  measurement (Table 4). Concerning CDW the RMSEP was comparable to the standard deviation. In the case of calibration against the cell concentration the RMSEP was two times higher for *L. zaeae*, while it was lower for *K. pastoris*. The most precise calibrations were obtained against  $OD_{600}$  and cell concentration. The higher relative error of CDW-calibrations is rather based on the high error of the CDW-determination method at low biomass concentrations. However, CDW-calibrations should be preferred to  $OD_{600}$ . CDW is more universal while  $OD_{600}$  measurement strongly depends on the used device. The range to observe is also important for the precision of the received data. Below  $OD_{600} = 2$  (about  $0.35 \text{ g L}^{-1}$  *K. pastoris*-CDW and  $0.6 \text{ g L}^{-1}$  *L. zaeae*-CDW with the given photometer) measurements had a low precision due to the low signal to noise ratio (Figure 8). In contrast relative errors were significantly lower at higher biomass concentrations (Table 3). Compared to bacteria and yeast, *A. niger* and CHO-K1 showed the highest RMSEP in CDW and cell concentration, respectively. This indicates that inhomogeneity of the mycel and measuring at low  $OD_{600}$  is a challenge for further developments of the sensor system. The choice of calibration (CDW,  $OD_{600}$ , CC) is up to the preferences of the user. In some cases (e.g., CHO-K1) it does not make sense to use CDW or  $OD_{600}$  as reference because it is rarely used for growth monitoring. In the case of *A. niger* calibration against OD or CC does not make sense.



**Table 3.** Calibration validation results in comparison of two ranges. CDW in  $\text{g L}^{-1}$ , cell concentration (CC) in  $10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , CHO-K1  $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

Species	RMSEP			Error [%] Full Range			Error $\text{OD}_{600} > a^{1,2,3,4}$ [%]		
	$\text{OD}_{600}$	CDW	CC	$\text{OD}_{600}$	CDW	CC	$\text{OD}_{600}$	CDW	CC
<i>L. zeae</i> <sup>1</sup>	0.18	0.15	0.39	5.54	11.12	9.33	3.33	11.12	3.75
<i>K. pastoris</i> <sup>2</sup>	0.39	0.12	0.10	9.39	12.58	7.11	5.35	7.32	4.29
<i>A. niger</i> <sup>3</sup>	–	0.37	–	–	7.23	–	–	6.65	–
CHO-K1 <sup>4</sup>	–	–	0.76	–	–	13.05	–	–	7.91

<sup>1,2</sup> a =  $\text{OD}_{600} > 2$ , <sup>3</sup> a =  $\text{CDW} > 4.1 \text{ g L}^{-1}$ , <sup>4</sup> a =  $\text{CC} > 7 \cdot 10^5$  cells  $\text{mL}^{-1}$

**Table 4.** Standard deviation of the offline measurement results. CDW in  $\text{g L}^{-1}$ , cell concentration (CC) in  $10^9$  cells  $\text{mL}^{-1}$ , CHO-K1  $10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ .

Species	Standard Deviation			Deviation / Measurement [%] Full Range		
	$\text{OD}_{600}$	CDW	CC	$\text{OD}_{600}$	CDW	CC
<i>L. zeae</i>	0.06	–	–	1.5	–	–
<i>K. pastoris</i>	0.13	0.18 <sup>1</sup>	0.18	1.3	3.2 <sup>1</sup>	12.0

<sup>1</sup> due to critical culture volume limitation no double determination could be carried out during cultivation, *S. cerevisiae* NCYC 1024 served as model for manual yeast CDW-determination, 10-fold determination with a mean biomass concentration of  $5.5 \text{ g L}^{-1}$  was performed for error estimation.

#### 4. Conclusions/Outlook

The investigated scattered light sensor proved to be applicable for a wide range of different microorganisms and cell lines commonly used in biotechnology. The biomass sensor signal depends on the morphology of cells and the media composition used, what makes individual calibration necessary. Calibrations against CDW or cell concentration are more universal than against other optical measurement methods. Assuming that a maximum measurement error of <10% is acceptable, the sensor is valid for all examined organisms. By introduction of a simple light shade into the shake flask it was possible to measure at low optical densities in exemplary the lag-phase of microbial culture and CHO-K1 culture overall. The dependency on the cell morphology is no disadvantage; it rather provides additional information about sudden aberrations in terms of culture conditions. The advance of combining two sensors (scattered light and dissolved oxygen sensor) proved to be very effective for the observation of short-term metabolic changes which affect growth and oxygen demand as well. These features pioneer real-time pH and substrate process control in shake flasks. Thus, scattered light measurement for shake flask cultivation does not simply represent an “online” replacement for  $\text{OD}_{600}$ , cell concentration or CDW determination. It delivers detailed, advanced information about the growth conditions and expands the knowledge of limitations or crucial changes.

#### Acknowledgments

We would like to thank Ursula Rinas and all members of our research groups for providing feedback and suggestions. This project was supported by the BMWi via AiF project within the ZIM-initiative.

## Author Contributions

Christian Ude carried out the presented experiments and made their data analysis. He wrote the manuscript and takes responsibility for the interpretation of all data. Jörg Schmidt-Hager was the primary adviser during the presented works. He gave support in the course of the practical experiments in the lab. Michael Findeis and Gernot Thomas John provided the sensor platform and gave additional support concerning the hardware. Sascha Beutel and Thomas Scheper were leading the planning of experimental designs.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

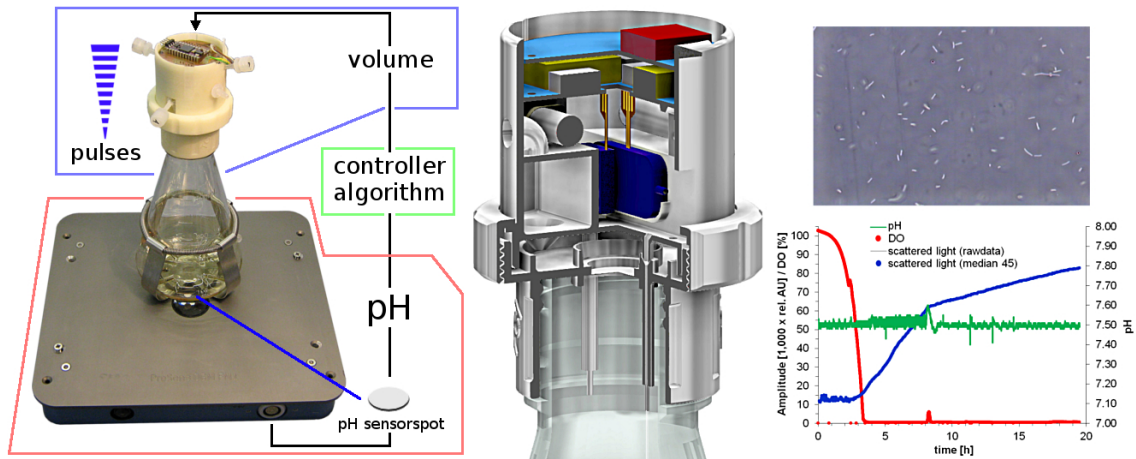
## References

1. Schmidt-Hager, J.; Ude C.; Findeis, M.; John, G.T.; Scheper, T.; Beutel, S. Non-invasive online biomass detector system for cultivation in shake flasks. *Eng. Life Sci.* **2014**, doi: 10.1002/elsc.201400026.
2. Madrid, R.; Felice, C. Microbial Biomass Estimation. *Crit. Rev. Biotech.* **2005**, *25*, 97–112.
3. Kiviharju, K.; Salonen, K.; Moilanen, U. Biomass measurement online: the performance of *in situ* measurements and software sensors. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **2008**, *35*, 657–665.
4. Kiviharju, K.; Salonen, K.; Moilanen, U.; Meskanen, E.; Leisola, M.; Eerikaeinen, T. On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: Comparison study of two on-line probes. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **2007**, *34*, 561–566.
5. Kerker, M. Elastic and inelastic light scattering in flow cytometry. *Cytometry* **1983**, *4*, 1–10.
6. Dunn, A.; Richards-Kortum, R. Three-dimensional computation of light scattering from cells. *Sel. Top. Quantum Electron.* **1996**, *2*, 898–905.
7. Watson, D.; Hagen, N.; Diver, J.; Marchand, P.; Chachisvilis, M. Elastic Light Scattering from Single Cells: Orientational Dynamics in Optical Trap. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1298–1306.
8. Konstantinov, K.; Chuppa, S.; Sajan, E.; Tsai, Y.; Yoon, S.; Golini, F. Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures. *Trends Biotech.* **1994**, *12*, 324–333.
9. Vojinovic, V.; Cabral, J.M.S.; Fonseca, L.P. Real-time bioprocess monitoring: Part I: *In situ* sensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *114*, 1083–1091.
10. Sonnleitner, B.; Locher, G.; Fiechter, A. Biomass determination. *J. Biotech.* **1992**, *25*, 5–22.
11. Bluma, A.; Buziol, S.; Chowdhury, M.H.; Fu Y.; Henriques, J.G.; Hitzmann B. *Optical Sensor Systems in Biotechnology*; Rao, G., Scheper T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 9–10, 101–105.
12. Peng, H. Apparatus and Method for Monitoring Biological Cell Culture. U.S. Patent No. 7,339,671, 4 March 2008.
13. Debreczeny, M.P. Optical Sensor for Rapid Determination of Particulate Concentration. U.S. Patent No. 8,405,033, 29 July 2011.
14. Bleasdale, J.; Nelder, J. Plant population and crop yield. *Nature* **1960**, *188*, 342.

15. Ge, Z.; Cavinato, A.G.; Callis, J.B. Noninvasive Spectroscopy for Monitoring Cell Density in a Fermentation Process. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1354–1362.
16. Flynn, R.A.; Birkbeck, A.L.; Gross, M.; Ozkan, M.; Shao, B.; Wang, M.M.; Esener S.C. Parallel transport of biological cells using individually addressable VCSEL arrays as optical tweezers. *Sens. Actuators B Chem.* **2002**, *87*, 239–243.
17. Liu, Y.; Chin, L.; Ser, W.; Ayi, T.C.; Ho, W.M.; Yap, P.H.; Leprince-Wang, Y.; Bourouina, T. A Single Living Bacterium's Refractive Index Measurement by Using Optofluidic Immersion Refractometry, October 2013. Available online: [http://rsc.u-cergy.org/images/loc/2013/PDFs/Papers/089\\_0522.pdf](http://rsc.u-cergy.org/images/loc/2013/PDFs/Papers/089_0522.pdf) (accessed on 24 June 2014).
18. Wu, P.; Ozturk, S.S.; Blackie, J.D.; Thrift, J.C.; Figueroa, C.; Naveh, D. Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors. *Biotech. Bioeng.* **1995**, *45*, 495–502.
19. Farhat, G.; Mariampillai, A.; Yang, V.X.D.; Czarnota, G.J.; Kolios, M.C. Detecting apoptosis using dynamic light scattering with optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16*, 1–3.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

## 3.2 Online-pH-Regelung in Schüttelkolben



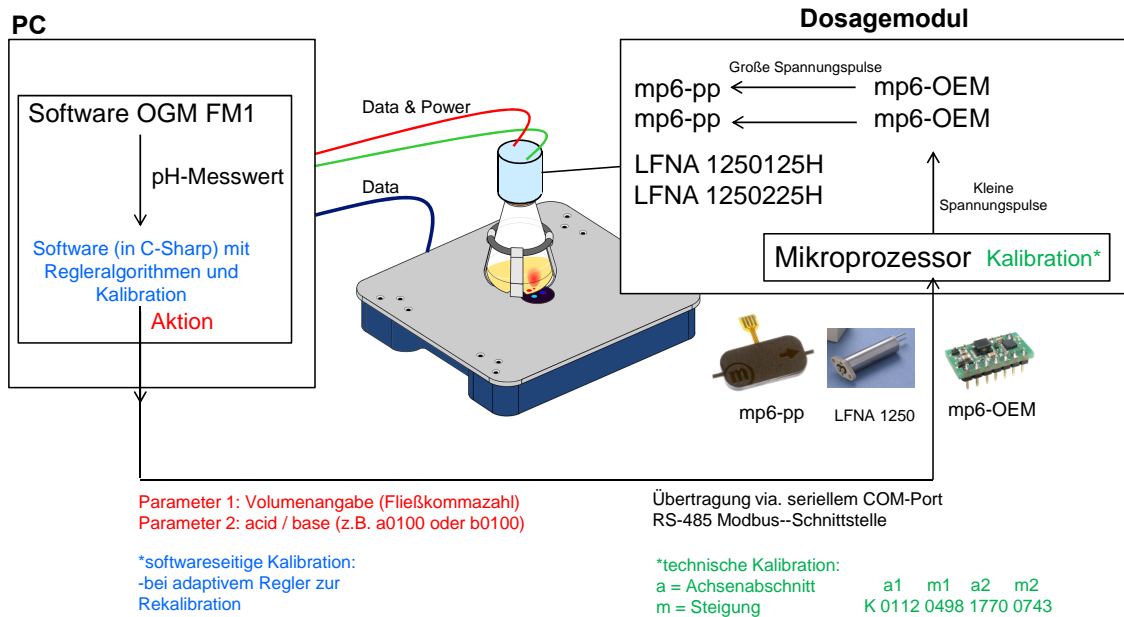
Im vorherigen Kapitel zu optischen Biomassensensoren in der Bioprozessüberwachung wurde verdeutlicht, dass es mit einfachen und kostengünstigen Bauteilen möglich ist ein spektroskopisches Verfahren zur online-Messung der Zelldichte für mikrobielle sowie Säugerzellkulturen im Schüttelkolbenmaßstab aufzubauen. In diesem Kapitel wird dieses Prinzip auf die pH-Steuerung von Bioprocessen im Schüttelkolben in Form eines aktiven Dosagemoduls zur pH-Statierung übertragen. In Kombination mit optischen SU-pH-Sensoren wird damit eine hohe Parallelisierbarkeit der Prozesse angestrebt. Auf Grund der weitreichenden, zukunftsweisenden Vorteile des Rapid-Prototyping wurde zudem das SLS-Verfahren zur Herstellung der Prototypen eingesetzt.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Entwicklung und Evaluierung eines Dosagemoduls für Schüttelkolben konnte gezeigt werden, dass Piezopumpen innerhalb eines 3D-gedruckten Polyamid-12-Gehäuses eine sehr präzise pH-Statierung (0,14 pH-Einheiten) über den Mindestzeitraum von 24 h ermöglichen. Dies schließt die Kultivierungsdauer von vielen Hefen und Bakterien ein. Konstruktionstechnisch wurden wichtige Erkenntnis gewonnen, wie z. B., dass SLS-gedruckte, beliebig gebogene, flüssigkeitsführende Kanäle direkt innerhalb des

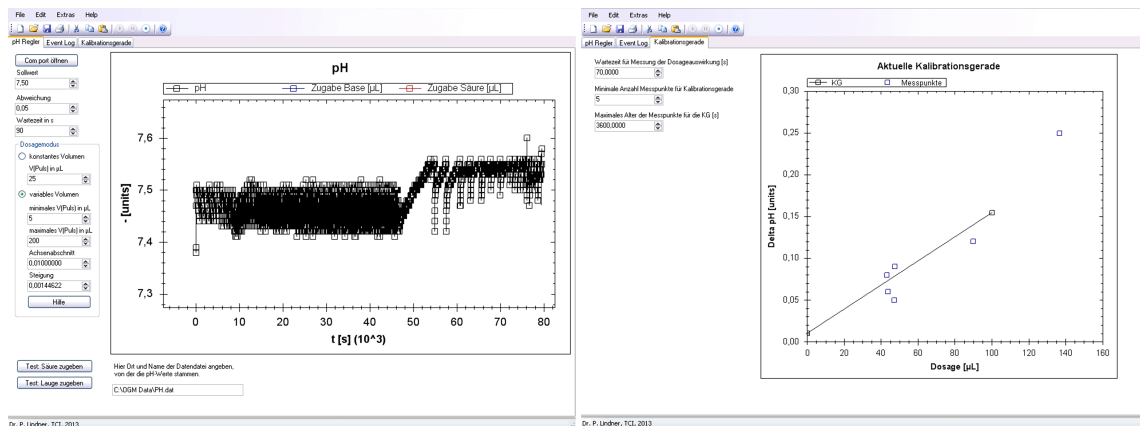
Materials integriert werden können. Vergleichbar ist dies mit FDM- oder SLA-gedruckten Kanalsystemen aus der Gruppe der Mikroreaktoren und –analysatoren („lab on a chip“) [5, 62]. Hierdurch konnte ein Teil der Schlauchverbindungen zwischen den Komponenten ersetzt werden, wodurch die Komplexität des Moduls verringert und die Herstellung vereinfacht wird. Dennoch müssen einige Bauteile wie Sterilmembranen, Düsen oder Druckausgleichmembranen separat gefertigt und angebracht werden. Die Zweiteilung des Dosagemodul gewährleistete das schadenfreie Sterilisieren beider Einheiten. Während die untere Einheit als Schüttelkolbenaufsatz im Rahmen der Evaluierung mindestens 50-mal ohne relevante Materialveränderungen autoklaviert wurde, konnte die obere Einheit erfolgreich über SIP sterilisiert werden. Die pH-Korrekturlösungen selber fungierten hierbei als Sterilisationsagenzien (Autosterilisation). Sterilitätstests wurden erfolgreich durch ein Standarddosageprogramm unter Verwendung von Medium unter optimalen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das für SLS-Verfahren verwendete PA 12 sowie alle verwendeten aktiven Komponenten (Pumpen, Ventile) innerhalb der Dauer der Entwicklung keine Zersetzung durch konzentrierte Salzsäure oder Natronlauge erlitten (bis zu 3 M). Dennoch zeigte sich bei dieser Konzentration, dass Gase (HCl) durch das Material diffundieren und so mit elektrischen Kontakten an Pumpen, Ventilen und Platinen reagieren können. Abgesehen von der möglichen Verkapselung elektrischer Komponenten bietet eine Überschichtung mit Harzen (Epoxidharze oder Kolophonium) Schutz, wobei nicht ausgasende Säuren wie Phosphorsäure auch eine Alternative darstellen könnten. Während die Biokompatibilität von PA 12 und ihrer gedruckten Variante bestätigt wurde, besteht bis heute eine große Herausforderung in der rauen Oberflächenstrukturierung SLS-gedruckter Polymere und ihrer Kompatibilität für S1-zertifizierte Bioprozesse. So können Organismen oder Medien von der Oberfläche persistierend aufgenommen werden. In Hinsicht auf die Entwicklung eines geeigneten Regleralgorithmus konnten PID, PI sowie ein adaptiver P-Regler erfolgreich angewendet werden. Der Regelkreis des Dosagemoduls ist

dazu in Abb. 3.2.1 (S. 44) dargestellt, sowie die verwendete Software zur Dosagevolumenberechnung in Abb. 3.2.2 (S. 44). Die erfolgreiche Verwendung eines PI-Reglers wurde ebenfalls für die Biolector<sup>®</sup> Pro Plattform bestätigt [18, 33]. Mit PID und PI-Reglern wurde vor allem während Kultivierungen ein sehr schmales pH-Intervall von 0,14 pH-Einheiten über die gesamte Kultivierungsdauer eingehalten, das mit einem pH-Intervall von 0,2 pH-Einheiten anderer auf Mikropumpen basierender Systeme vergleichbar ist [21, 33]. Das kleinste, technisch mögliche Dosagevolumen lag bei 2  $\mu$ l, was für die Prozesskontrolle im Schüttelkolben ausreichend war. Anhand von Tests zum Reaktionsverhalten der Regler durch gezielte pH-Wert-Störungen wurde ermittelt, dass empirisch parametrisierte adaptive Regler im Vergleich zu dem hier empirisch parametrisierten PID-Regler weniger Zeit zum Wiedereinstellen des Sollwertes benötigen (Faktor 0,4). Der implementierte adaptive Regler bietet den Vorteil, dass er sich durch kontinuierliche Rekalibrierung an die aktuelle Pufferkapazität des Mediums anpasst und so auftretendes Überschwingen stark reduziert wird [29, 36]. Die diffusionslimitierte pH-Messung via pH-Sensorspots wurde im Regleralgorithmus als Parameter zwecks kurzweiligen Pausierens der Dosage (30 s) berücksichtigt und hatte kaum Relevanz auf die kontinuierliche pH-Steuerung. Durch pH-Statierung während Kultivierungen des Stammes *E. coli* K12 konnte schließlich gezeigt werden, dass Wachstumsraten erhöht und auch die finale optische Dichte um 39 % gesteigert werden konnten. Damit besteht parallel zur Vergleichbarkeit von Kultivierungsdaten im Rahmen von Screenings auch ein erhebliches Argument pH-Controllereinheiten für die Kultivierung von Produktionsstämmen anzuwenden.

### 3. Experimenteller Teil



**Abb. 3.2.1** Funktionsschema zum Regelkreis der pH-Steuerung mittels Dosagemodul. Die technische Kalibration dient zur Dosage von z. B. 100  $\mu\text{l}$  Base beim Befehl „b0100“. Die softwareseitige Kalibration dient zur adaptiven Neuparametrisierung der Kalibrationen (Rekalibrierung) im Laufe der Kultivierung.



**Abb. 3.2.2** Software „pH-Regler“ in C-Sharp zur Berechnung von Dosagevolumina mittels adaptivem oder PID-Regler (© Dr. Patrick Lindner, Leibniz Universität Hannover).



# New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement



Christian Ude, Thorleif Hentrop, Patrick Lindner, Tim H. Lücking, Thomas Scheper, Sascha Beutel\*

Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 6 April 2015

Received in revised form 14 June 2015

Accepted 3 July 2015

Available online 18 July 2015

### Keywords:

3D-printing

pH-control

pH-monitoring

Piezo pump

Shake flask

## ABSTRACT

Online pH control during microbial shake flask cultivation has not been established due to the lack of a practical combination of an online sensor system and an appropriate control unit. The objective of this investigation was to develop a minimum scale dosage apparatus, namely shake flask controller (“SFC”), which can control the pH during a complete cultivation and serves as technical example for the application of small liquid dispensing lab devices. A well evaluated optical, chemosensor based, noninvasive, multi-sensory platform prototype for online DO (dissolved oxygen)-, pH- and biomass measurement served as sensor. The SFC was designed as cap-integrated, semi-autarkical control unit. Minimum scale working parts like the commercial mp6 piezoelectric micropumps and miniature solenoid valves were combined with a selective laser sintering (SLS) printed backbone. In general it is intended to extend its application range on the control of enzymatic assays, polymerization processes, cell disruption methods or the precise dispense of special chemicals like inducers or inhibitors. It could be proved that pH control within a range of 0.1 pH units could be maintained at different cultivation conditions. A proportional-integral-derivative- (PID) controller and an adaptive proportional controller were successfully applied to calculate the balancing solution volume. SLS based 3D printing using polyamide combined with state-of-the-art micro pumps proved to be perfectly adaptable for minimum size, autoclavable lab devices.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

### 1.1. pH control in shake flasks

Automated process control in shake flask was little considered in the design of bioprocesses so far. The reason for this status lies in the absence of available, appropriate pumping systems and in a sensor system which is suitable for shake flasks. The pH changes which often occur during shake flask cultivations are (despite the use of buffer systems) sometimes measured and documented by sampling, but rarely controlled until today. There is clearly a great need for a fully automatic pH control in shake flasks since they are still employed in screening processes and also used in pre-culture preparation for larger scale cultivations, e.g. in bioreactors. In batch processes a missing pH control can, depending on substrates and

cultivation temperature, result in a big deviation from the optimum condition by accumulation of metabolic by-products, which inhibit growth at acidic conditions [1,2]. Depending on the growth phase (exponential or stationary) of the pre-culture, the pH shift after transfer into fresh medium (inoculation) can be serious. Moreover pH dependent activation of certain genes which is related to a change in metabolism can negatively interfere with protein or compound production processes [3–5]. Another concern is the correct folding and stability of heterologously produced protein, especially if the protein is secreted into the medium [6]. Alternative solutions for the stabilization of pH in shake flasks are the application of more concentrated buffer solutions or buffer loaded polymer slices [7]. However, a higher buffer concentration may hinder cell growth, reduces cell viability in the early growth phase and influences metabolism [8,9]. Automatic pH control has been obligatory for stirred bioreactors since control units were available. In contrast, a passive pH control in shake flasks is only established in mammalian cell culture via diffusion of CO<sub>2</sub> through a membrane located in the cap. For microbial cultivations online pH measurement and control is not typically applied at this scale. Weuster-Botz et al. showed in 2001 that continuous feeding combined with pH control in shake flask can increase biomass yield of *Escherichia coli* BL21 by 104%

\* Corresponding author. Tel.: +49 511 762 2868; fax: +49 511 762 3004.

E-mail addresses: [ude@iftc.uni-hannover.de](mailto:ude@iftc.uni-hannover.de)

(C. Ude), [hentrop@iftc.uni-hannover.de](mailto:hentrop@iftc.uni-hannover.de) (T. Hentrop), [lindner@iftc.uni-hannover.de](mailto:lindner@iftc.uni-hannover.de)

(P. Lindner), [luecking@iftc.uni-hannover.de](mailto:luecking@iftc.uni-hannover.de) (T.H. Lücking),

[scheper@iftc.uni-hannover.de](mailto:scheper@iftc.uni-hannover.de) (T. Scheper), [beutel@iftc.uni-hannover.de](mailto:beutel@iftc.uni-hannover.de) (S. Beutel).



compared to an uncontrolled batch. The system was composed of a syringe pump as well as pinch valves, tubing and pH probes for each flask [2]. Unfortunately, large, complex atline pumping systems did not proved to be adequate for an easy and fast controller setup. There has been also concepts to control pH by passive release of sodium carbonate from silicone rubber disks in microbial systems [10] or hydrogel in mammalian systems [11]. It was possible to keep pH values within a range of  $\pm 0.3$  pH units around the pH optimum during growth of *E. coli* BL21 in glucose, glycerol rich synthetic medium; in this way the media buffer content could be reduced from 0.2 M to 0.1 M [10]. Concerning mammalian culture the pH could be kept  $\pm 0.2$  pH units around the optimum for 7 days. However buffer loaded solids cannot precisely maintain a specific pH or adjust user defined pH gradients. A complete omission of additional buffer substances is not achieved. Up to now there is no commercial available product to perform online pH control in shake flask. Cultivations using shake flask are still far away from serving as a template or scale-down model for bigger bioreactor in terms of transferability. Therefore an active controller is still required.

### 1.2. Micropump micro-actuators for small lab devices

The first idea to apply conventional pumping systems like benchtop peristaltic- or syringe pumps to several shake flasks connected by tubing and a multiport valve is complicated in different ways and has a considerable space demand. Also important to consider is the way the correction solutions (base and/or acid solutions) reach the culture. Drops usually tend to be centrifuged against the flask wall and reach the culture delayed in time. Excessive use of pipes towards the liquid is not an option in terms of weight reduction and miniaturization. So solutions have to be dispensed as a jet. Focusing on dosage or injection purpose for volumes  $< 20 \mu\text{L}$ , pumps are needed which can pump at relatively high flowrates at a fraction of the size in comparison to their bigger counterparts. Minimum size peristaltic pumps which are based on tubing do not achieve these high flowrates as required to perform a jet injection. Micropumps like piezoelectric actuation pumps (more precisely “reciprocating displacement” pumps) cover all these properties and represent promising candidates [12,13]. They comprise even more advantages like less metal parts and lower energy consumption. The most successful design by Van Lintel et al. in 1988 is based on an electrical deformable piezoelectric disk attached to a thin diaphragm which seals a pumping chamber [14]. Since 2003 micropumps are available as commercial standard with different manufacturers launching products on the market. Today coin size micropumps (profile  $< 2.5 \text{ cm}^2$ ) are available up to 40 mL/min [15] and provide a net flow up to a backpressure maximum of 45 kPa [16].

### 1.3. 3D printing technology for lab devices

3D printing has advanced to a common applied method in rapid prototyping in the last 10 years. Additive manufacturing exhibits major advantages compared to subtractive computerized numerical control (CNC) machining or injection molding. The main advantage is a very fast, tool free, implementation of complex components from a virtual model to the finished device. A fast reproduction and an easy modification of an existing device by reprinting accelerates the prototyping progress [17]. For the development of the SFC it was important to have the option to replace tubing by material integrated channels, because functional parts like valves cannot always be connected with tubing by standard, but have to be mounted. Another preference is the operators' safety. This implies that the tanks filled with acid or base have to be made as one piece (no gluing) which is possible with SLS in contrast to CNC machining [18,19]. Among different printing methods SLS

reveals to be most suitable due to the good thermal, mechanical and chemical stability of compatible polymers like polyamide 12 (PA12) [20–22]. So far there is only little use of 3D printing for “macroscale” labware and devices in chemical and biotechnological laboratories. In 2013 Abe et al. showed that PA12, printed via SLS, has an excellent biocompatibility on fibroblast cells [23]. In 2014 Scheper and Beutel et al. proved its biocompatibility and autoclavability for labware in use. Well plates and shake flask caps were printed and tested successfully with yeast cells and mammalian cells [24,25].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cultivation Methods and chemicals

The used microorganisms, cell lines, applied media and cultivation parameters are listed in Table 1. All media were prepared with deionized water produced by Arium® 661 Ultrapurap water system (Sartorius Stedim Biotech AG, Göttingen, Germany).

#### 2.1.1. Media preparation

Lysogeny broth (LB) unbuffered for *E. coli* K12: 5.0 g L<sup>-1</sup> yeast extract (AppliChem), 10.0 g L<sup>-1</sup> trypton/peptone from casein (Carl-Roth), 6.0 g L<sup>-1</sup> NaCl (Sigma-Aldrich), 10.0/20.0 g L<sup>-1</sup> glucose (Sigma-Aldrich). LB buffered for *E. coli* K12: 5.0 g L<sup>-1</sup> yeast extract (AppliChem), 10.0 g L<sup>-1</sup> trypton/peptone from casein (Carl-Roth), 5.0 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka), 3.0 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka), 1.0 g L<sup>-1</sup> NaCl (Sigma-Aldrich), 10.0/20.0 g L<sup>-1</sup> glucose (Sigma-Aldrich). ZYP-31 (F.W. Studier et al., modified) for *E. coli* K12: 6.8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka), 17.9 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12·H<sub>2</sub>O (Riedel de Haën), 3.3 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Carl-Roth), 2.0 g L<sup>-1</sup> yeast nitrogen base (YNB) salts with amino acids (Y1250 Sigma), 0.06 g L<sup>-1</sup> protocatechuic acid (Fluka), 10 g L<sup>-1</sup> Glycerol (Rotipuran®, Carl-Roth). De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) medium was prepared according to Ude et al. [26]. 200  $\mu\text{L L}^{-1}$  of TEGO® Antifoam KS 911 were added to each medium.

#### 2.1.2. Equipment and pH measurement

The multisensory platform hardware specifications are according to Ude, Schmidt-Hager et al. [26,27]. X-ray sterilized, disposable shake flask (Corning® Inc., Corning, USA) equipped with DO- and pH sensor spots (PreSens GmbH, Regensburg, Germany) were used. The flasks were baffled (WB) or non-baffled (NB). The batch numbers are as follows:

- (1) SFS-HP5-PSt3-500-WB-VEC-v3 ID 13-06-01 (cultivations).
- (2) SFS-HP5-PSt3-500-NB-VEC-v3 ID 12-22-01 (controller performance tests).

The default sensor spot calibrations were:

- (1) Phase 0% air sat [°] 57.42, Phase 100% air sat [°] 24.18, Temp 0 [°C] 36.9, Temp. 100 [°C] 36.9, *P* [mbar] 975.00, pH<sub>max</sub> 26.85, pH<sub>min</sub> 55.11, pH<sub>Temp</sub> 36.90, dpH 0.6, pH<sub>0</sub> 6.71.
- (2) Phase 0% air sat [°] 58.09, Phase 100% air sat [°] 24.65, Temp 0 [°C] 36.5, Temp. 100 [°C] 36.5, *P* [mbar] 967.00, pH<sub>max</sub> 21.43, pH<sub>min</sub> 55.69, pH<sub>Temp</sub> 36.5, dpH 0.59, pH<sub>0</sub> 6.93.

Shaking was performed on an orbital shaker with 25 mm shaking diameter (Certomat® SII, Sartorius Stedim Biotech AG, Göttingen, Germany).

#### 2.1.3. Correction solutions

Sodium hydroxide (Riedel de Haën) was dissolved in deionized water to produce 2 M or 3 M solutions. 37% hydrochloric acid (Merck) was diluted with deionized water to receive 2 M or 3 M solutions. 200  $\mu\text{L L}^{-1}$  TEGO® Antifoam KS 911 were added to each

**Table 1**  
Cultivation parameters used for the SFC evaluation.

Species	T [°C]	Agitation [rpm]	Flask type [mL]	Medium	Volume [mL]	Preculture [h]
<i>E. coli</i> K12	37	170	500 WB	LB, ZYP-31	100	15

**Table 2**  
Biomass sensor calibration parameters.

Species	LB $\alpha/\beta/c$	ZYP-31 $\alpha/\beta/c$
<i>E. coli</i> K12	-7.518/0.000398/-1.896	-4.241/0.000275/-1.693

solution. The solutions were filtered with 0.45  $\mu\text{m}$  sterile filters (Wicom GmbH, Heppenheim, Germany).

## 2.2. Cell density measurement

The  $\text{OD}_{600}$  was calculated corresponding to Eq. (1) [28]. A detailed description of the biomass sensor calibration process is given in a previous report [26]. The  $\text{OD}_{600}$  was measured in comparable cultivations beforehand with Libra S11 visible spectrophotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK). The growth rate of microorganisms was calculated with Eq. (2) and is described by a logarithmic gradient triangle [29]. The parameter  $t$  refers to the time span in which exponential growth takes place. The manual, offline  $\text{OD}_{600}$  measurement was replaced by the calculation of  $\text{OD}_{600}$  from the online biomass sensor amplitude since during application of the SFC no offline samples were taken. The parameters for different media are given in Table 2.

$$\text{OD}_{600}(\text{amplitude}, \alpha, \beta, c) = (\alpha + (\beta \times \text{amplitude}))^{1/c} \quad (1)$$

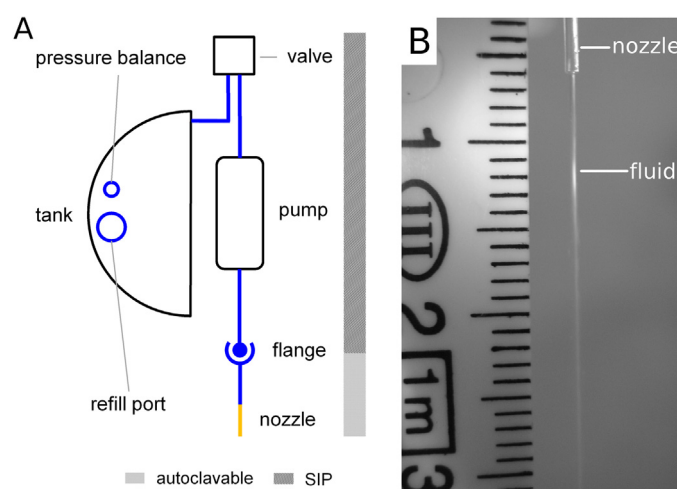
$$\mu_{t_1-t_2} = \frac{\ln(\text{amplitude}_{t_2}) - \ln(\text{amplitude}_{t_1})}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

## 2.3. 3D modeling and printing

The SFC was modeled as 4 different parts using the software “Autodesk Inventor Professional 2013” (Autodesk, Inc., San Rafael, USA). The prototype parts were printed by Blue Production GmbH (Friedrich-List-Straße 49, Paderborn, Germany). PA12 (Eosint PA2200) (EOS GmbH, München, Germany) was used as polymer for SLS. All parts were printed in one powder bed (same batch). More information on the printing parameters is given as follows: Grain size of the powder (MEAN: 60  $\mu\text{m}$ ), layer width (100  $\mu\text{m}$ ), powder bed temperature (173 °C), laser energy input (40  $\text{mJ mm}^{-2}$ ), printing speed (laser speed) (2000  $\text{mm s}^{-1}$ ). Channels inside printed parts were cleaned with pressurized air and smooth steel wire to remove all residual powder. The docking faces of the valve-mounts were abraded with 400 grit silicon carbide sandpaper to sustain a good sealing with the valves.

## 2.4. Controller algorithms

For the calculation of acid and base volumes 2 different types of controller were tested: (1) Adaptive proportional controller (Eq. (3)), (2) PID controller which is explained in Supplementary Section 1.3 and Eq. (S1). A specific software was written in C-sharp .NET 4.5 which made parameterization and online calculation of the dosage-volumes possible. For both controllers 2 basic parameters were defined: Set point [pH units] and waiting time [s]. The waiting time corresponds to the minimum time needed for the chemical equilibrium between pH sensor and the medium. Controller 1 is described by a linear correlation between the pH shift ( $\Delta\text{pH}$ ) after addition of pH correction solution and the added volume (Eq. (3)). Parameter  $a$  serves as gradient and parameter  $b$  as intercept. The



**Fig. 1.** Functional diagram of one dosage working unit (A). Two working units are integrated for acid and base, respectively. The nozzles are autoclavable while the rest was treated by sterilization in place (SIP). A jet of correction solution is dispensed by the SFC (B).

equation was integrated into an adaptive controller algorithm by continuous recalibration of the parameter  $a$  while  $b$  remains constant by definition. During process a decrease of  $a$  leads to a bigger dosage at the same  $\Delta\text{pH}$ . For further tuning 4 additional parameters were introduced: (1) Hysteresis [pH units], (2) Waiting time for the correlation between dosage and pH shift, (3) Minimum number of data points for the calibration, (4) Maximum “age” of the calibration points. Especially parameter 4 provides the controller with a kind of big or small memory. Nonsensical correlations (e.g. base dosage is followed by a pH decrease) can be excluded from the calibration. Optional minimum and maximum values can be assigned for  $a$ ,  $b$  and the dosage. A function for setting programmable pH gradients was integrated in the software.

$$\text{dosage volume}_i [\mu\text{L}] = \frac{\Delta\text{pH}_i - b}{a_i} \quad (3)$$

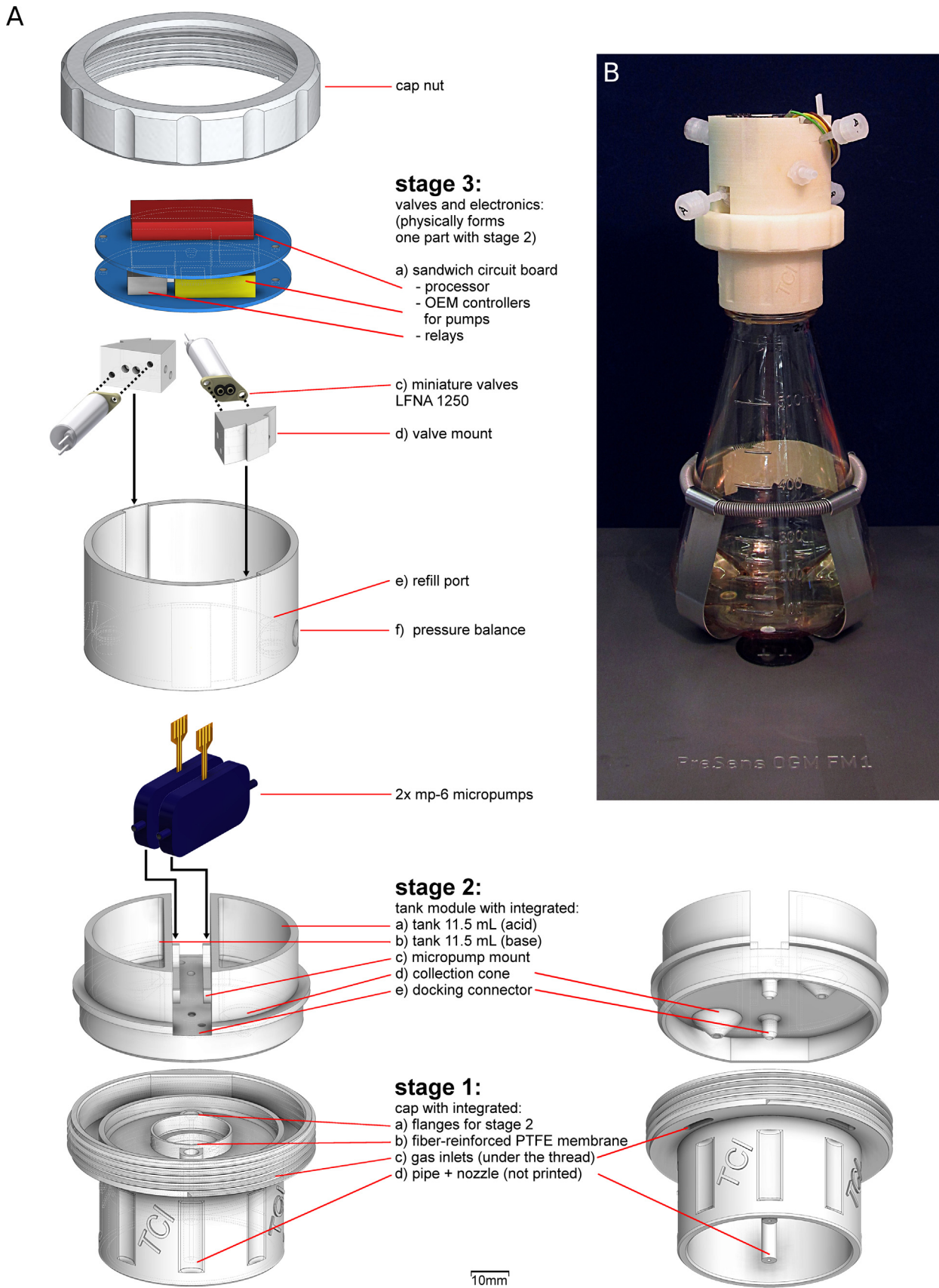
## 2.5. Controller design

### 2.5.1. Working principle

The SFC working principle is based on a tank (11.5 mL) connected to a valve and a piezoelectric micropump (mp6, Bartels Mikrotechnik GmbH, Dortmund, Germany), which is pumping the liquid through a nozzle into the shake flask (Fig. 1A). A 2-way normally closed solenoid valve (LFNA 1250, LEE Hydraulische Miniaturkomponenten GmbH, Sulzbach, Germany) connecting pump and tank prevents any leakage of the pump in standby mode. The unit is divided in an autoclavable and non-autoclavable part (electronics and actuators) which is sterilized by sterilization in place (SIP) (Section 2.7). They are separated by a flange/docking connection. In total the SFC comprises 2 working units (1  $\times$  acid, 1  $\times$  base) in which the valves have specific gaskets.

### 2.5.2. Hardware implementation

A detailed technical view of the SFC is illustrated in Fig. 2A. The SFC is composed of 3 stages. Stage 1 is a modified screwable cap with a 0.2  $\mu\text{m}$  fiber-reinforced polytetrafluoroethylene



**Fig. 2.** Exploded drawing of the SFC shown as CAD model. No capillaries, tubing or electrical connections are shown (A). The SFC is compatible with 500 mL standard corning shake flasks (B). Assembled SFC is mounted on a disposable 500 mL WB shake flask with sensor spots. The flask is placed on the multisensory platform.

(PTFE) gas permeable membrane (Sartorius Stedim Biotech AG, Göttingen, Germany). Gas inlets sustain a constant gas exchange. Next to the membrane, 2 concave flanged 1/8" PTFE capillaries (VWR International, Radnor, USA) are inserted into pipes and end with nozzles (not shown). Micro PTFE capillaries (0.82 mm outside, 0.35 mm inside, 6 mm long, Reichelt Chemie Technik, Heidelberg, Germany) served as nozzles to produce a thin jet, which enables a direct dosage into the culture (Fig. 1B). Stage 2 contains two pumps located between two reservoirs. The reservoirs are equipped with a collection cone connected to the pumps inlets by tygon® tubing (3.0 mm outside, 1.0 mm inside, Saint-Gobain S.A., Courbevoie, France). The pumps outlets lead to docking connectors equipped with convex flanged 1/8" PTFE capillaries. Stage 3 physically forms one part with stage 2 (Fig. 2B). It contains refill ports for the tanks, pressure balances featuring polyethylene frits (25 µm, Omnifit, Diba Industries, Cambridge, UK) and one valve for each correction solution. The valves are mounted to blocks with integrated channels connecting pumps and tanks. The top part is composed of two circuit boards. It contains a processor (Propeller P8X32A-M44, Parallax Inc., Rocklin, USA), two mp6-OEM controller units and relays. The SFC is connected via RS-485-USB converter to a PC by cable which also contains a 12V power supply. The different stages are kept together by a cap nut. Luer connectors were added to enable refill using disposable syringes and enabling manual pump flushing. The tare weight of the whole SFC is 111.33 g, while the loaded weight is about 132 g.

## 2.6. Controller calibration procedure

The controller was simply calibrated by precision scale with hydrochloric acid and NaOH solution. During service the controller is converting a volume command [µL] into the pulse count of the mp6 piezo elements. The calibration of the dosage volume against the pulse count was determined linear (Supplementary Section 1.5).

## 2.7. Controller sterilization procedure

Stage 1 was autoclaved at 121 °C and 200 kPa for 30 min mounted on the flask. The tubing of Stage 2 and 3 are self-sterilizing by filling the tanks and tubing with 2 or 3 M hydrochloric acid or sodium hydroxide solution. The underside of stage 2 (docking connectors) was sterilized in place using a UV-C station (Supplementary Section 1.6). The irradiation was carried out for 30 min. The sterility of the SFC was tested through a simple dosage routine with a LB medium filled 500 WB shake flask (Supplementary Section 1.7).

## 2.8. Controller performance tests

In order to test the performance of the SFC using an adaptive *P* controller or a PID controller algorithm, defined volumes of acid and base were dispensed into medium by the SFC (pulse perturbation). The time and the amount of correction solution required to balance the perturbation, hence readjusting the set-point, was investigated. Two different complex media were used: LB (pH 7.0, unbuffered), MRS (pH 6.2, moderate buffered). The LB dosage program was: 2 × 25 µL acid, 2 × 50 µL acid, 2 × 25 µL base, 2 × 50 µL base. The MRS dosage program was: 2 × 200 µL acid, 2 × 400 µL acid, 2 × 200 µL base, 2 × 400 µL base. 500 WB shake flasks with 100 mL vol. were shaken at 150 rpm during dosage. The start parameters are listed in Table 3. The start parameters *a*, *b* of the adaptive *P* controller depend on the used medium and could be easily determined by prior titration experiments in LB and MRS. For this purpose variable amounts of acid and base (25–70 µL,

**Table 3**

Adaptive *P* controller parameters implemented for the performance test in typical microbial media.

Parameter	LB medium	MRS medium
Set point pH	7.0	6.2
Hysteresis ±pH	0.05	0.05
Waiting time [s]	90	90
Actuation range [µL]	5–300	5–500
Calib. intercept <i>y</i> ( <i>b</i> )	0	0
Calib. gradient ( <i>a</i> )	0.0030	0.00040
Waiting time correlation [s]	85	85
Minimum data points	1	1
Maximum age [s]	3600	3600
Minimum gradient ( <i>a</i> )	0.000050	0.000010
Exclude nonsensical correlations	True	True

**Table 4**

PID controller parameters implemented for the performance test.

Parameter	LB medium	MRS medium
Set point pH	7.0	6.2
Hysteresis ±pH	0	0
Waiting time [s]	90	90
Actuation range [µL]	5–300	5–500
$K_R$	120	120
$T_N$	300	300
$T_V$	40	40

5 µL step) were added to 100 mL of medium and the pH shift was measured via pH sensor. The parameter *a* and *b* were determined by the linear regression of pH shift against volume.  $K_R$ ,  $T_N$ ,  $T_V$  of the PID controller were optimized empirically in LB medium step by step (Table 4).

## 2.9. pH control during microbial cultivation

The SFC was evaluated under realistic conditions by pH control during growth of *E. coli* K12 in LB medium with 10 g L<sup>-1</sup>/20 g L<sup>-1</sup> glucose as carbon source and ZYP-31 medium with 10 g L<sup>-1</sup> glycerol. The first type of cultivation (LB) is a typical scenario at which *E. coli* K12 is excessive acidifying the low buffered medium resulting in a pH decrease of 1 pH unit or more, depending on the glucose concentration. In the second scenario it was tested whether the control in highly buffered medium is effective enough. Cultivation parameters can be found in Section 2.1. The adaptive *P* controller start parameters are listed in Table 5. The PID controller parameters are listed in Supplementary Section 1.8, Table S1.

**Table 5**

Adaptive controller- and medium parameters implemented for the microbial cultivation.

Parameter	LB medium	ZYP-31 medium
Glucose [g L <sup>-1</sup> ]	10, 20	–
Glycerol [g L <sup>-1</sup> ]	–	10
Set point pH	7.5	7.5
Hysteresis ±pH	0.05	0.05
Waiting time [s]	90	90
Actuation range [µL]	10–300	5–300
Calib. intercept <i>y</i> ( <i>b</i> )	0.02	0
Calib. gradient ( <i>a</i> )	0.0020	0.00015
Waiting time correlation [s]	70	85
Minimum datapoints	5	5
Maximum age [s]	3600	3600
Minimum gradient ( <i>a</i> )	0	0.00005
Exclude nonsensical correlations	True	True

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Polymer material tests

SLS and stereolithography (SL) polymer materials intended to use for the SFC backbone were tested concerning their ability to withstand autoclaving process and exposure to strong mineral acid and base (Supplementary Section 1.2). PA12 (PA 2000i, PA 1800) proved to be appropriate for heat sterilization and inert towards 5 M NaOH solution as well as 10 M hydrochloric acid (Supplementary Figs. S1 and S2). The tested SL resins were not suitable in terms of both criteria. Regarding the mechanical integrity of the lower part of the SFC (Fig. 2A) no changes were observed after 30 autoclaving cycles.

#### 3.2. Construction and prototyping progress

Before the SLS printed prototype shown in this manuscript was used a CNC machined pre-prototype made of polyvinylchloride (PVC) and polyether ether ketone (PEEK) was used to evaluate the actuators. During the early experiments it was found out that the mp6 pumps were not completely sealing during standby. The leakage was approx.  $1 \text{ mL} \times 14 \text{ h}^{-1}$  using water. Different custom made passive valves were tested to enable flow in presence of a sufficient liquid pressure (pumping) and close at low liquid pressure (standby). The working principle of these valves is shown in Supplementary Fig. S11. Unfortunately the force of the micropumps was not sufficient to compress the spring just by the produced flow and provide sealing at the same time. In the next step active solenoid valves were tested successfully and integrated into the final system (Section 2.5). Since it was not possible to produce hose nozzles for small tubing (1 mm diameter inside) by SLS, 5 mm pieces of PEEK capillary were attached to these parts. Tygon® tubing stubs were put into the holes (1.5 mm deep) and the capillary stubs were plunged in. Other methods like gluing resulted in leakage after a certain time. This method was applied to the valve mounts and the tanks. The electrical parts on the circuit board showed to suffer from HCl fumes which were caused by the aforementioned leakage. The circuit board was preventively coated by a thin layer of solder lacquer. Concerning flow performance there was no loss observed after shifting from the CNC machined pre-prototype to the SLS printed prototype.

#### 3.3. Adaptive P controller performance test

In LB medium the adaptive *P* controller algorithm was able to restore the setpoint ( $7.00 \pm \text{pH } 0.02$ ) after a pulse perturbation (by manual dosage of the SFC) of 0.20 pH units within a short time span of approx. 360 s (Fig. 3). In total a release of 256  $\mu\text{L}$  3 M HCl and 290  $\mu\text{L}$  3 M NaOH solution was recorded by the software for balancing. The observed difference of 34  $\mu\text{L}$  could be caused by small amount of droplets which stuck to the nozzle after each dosage. In the case of MRS medium a higher buffer concentration led to a much higher dosage volume but not to a lower response time (200 s for a deviation of  $\Delta\text{pH } 0.2$  or 0.3).

#### 3.4. PID controller performance test

The PID controller showed a significant slower response behavior (900 s vs. 360 s for balancing) compared to the adaptive *P* controller (Fig. 4). One explanation could be given by a non-optimal parametrization of the PID controller. Another more obvious explanation lies in the algorithm structure; Different from *P* controllers the PID controller could not be equipped with a pH hysteresis, i.e. the PID must reach the exact setpoint. While the pH can be measured by electrodes within seconds a pH sensor spots needs approx.

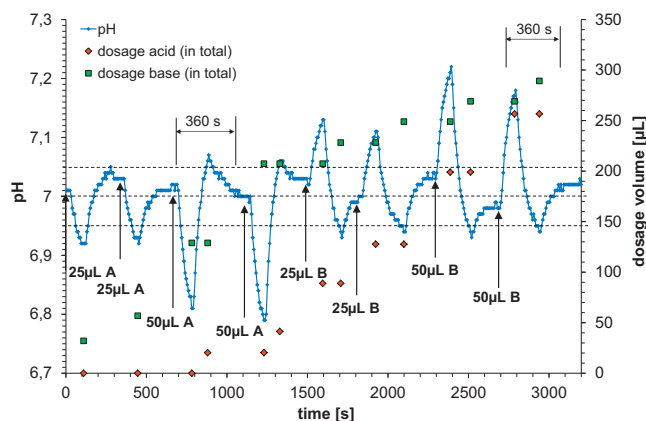


Fig. 3. Adaptive *P* controller performance in LB medium.

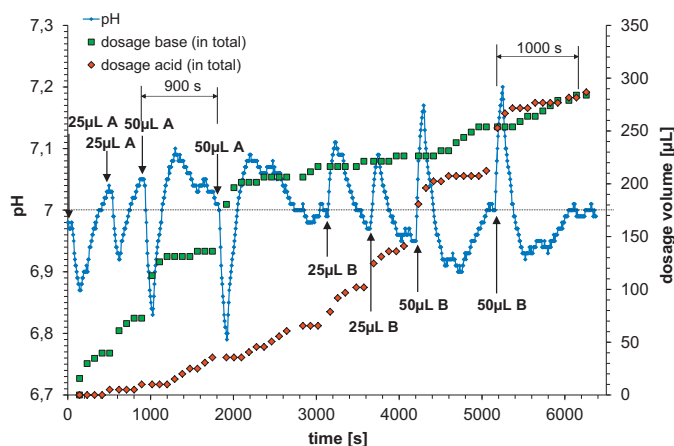


Fig. 4. PID controller performance in LB medium.

60 s for a stable value. Under these conditions a *P* controller is more advantageous due to its ambition to balance deviation with one actuation instead of approaching to the setpoint. By using the same controller parameters for MRS medium it was not possible to balance the perturbations in a realistic period of time. The biggest differences between both algorithms persisted in the approx. 2.5 times higher response time of the PID controller. It also tended to need more time for bigger deviations while the dosage time was independent from the dosage volume when using the adaptive *P* controller. It could also be confirmed that an adaptive controller is more robust against changes concerning the medium or the operation point as shown previously [30]. A disadvantage using *P* controller can exist in overshooting which might occur using poor start parameters for the calibration. Since hysteresis and adaptive recalibration was provided for the *P* controller this effect could be minimized.

#### 3.5. Controller algorithm implementation progress

Apart from the controller algorithms described in Section 2.4 a simple 3 point controller and a *P* controller without adaptive behavior was tested beforehand. The 3 point controller using a constant dosage showed to be able to control the pH during cultivation according to the given setpoint (Supplementary Fig. S9). However, the dosage had to be adjusted very specifically. High dosages (50  $\mu\text{L}$ ) led to overshooting at the beginning of the cultivation, while small dosages were not able to control the pH during the exponential growth phase. So the 3 point controller was replaced by a *P* controller. This controller was able to manage big and small

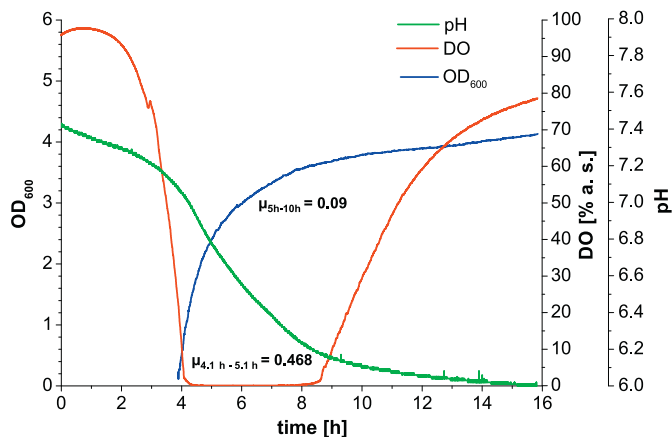


Fig. 5. Monitoring of pH, DO and OD<sub>600</sub> during growth of *E. coli* K12 in LB medium with 10 g L<sup>-1</sup> glucose.

deviations from the setpoint just as well but could not control the pH during the exponential growth phase (Supplementary Fig. S10), since the buffering properties of the liquid were changing over time. This led to the continuous recalibration of parameter  $a$  by the control software which will be described in Section 3.7. Using this adaptive  $P$  controller it was possible to manage the changing conditions during cultivation which is presented in the following section.

### 3.6. pH control during microbial cultivation

The SFC was evaluated with *E. coli* K12 which is the most frequently used microorganism among biotechnical cultivations. It was cultivated in buffered LB medium without active pH control (Fig. 5) and unbuffered LB Medium controlled by the SFC in combination with an adaptive  $P$  controller (Fig. 6). In low buffered LB medium with 10 g L<sup>-1</sup> glucose the pH decreased by 1.2 pH units within 8 h cultivation resulting in a pH 6.2. This behavior was reported before [7,31]. The monitoring of DO gives evidence when the exponential growth phase started and stopped. While the observed growth rate ( $\mu$ ) of 0.468 h<sup>-1</sup> within the first hour of oxygen limitation is common for shake flask cultivations, the continuous decrease towards 0.09 h<sup>-1</sup> and less indicates the crucial influence of pH for optimal growth. 8 h after inoculation at an OD<sub>600</sub> of 3.55 the increase of DO clearly marked the stationary phase of the cultivation. In contrast, the pH could be kept in a range of at least 0.15 pH units around the setpoint using the SFC

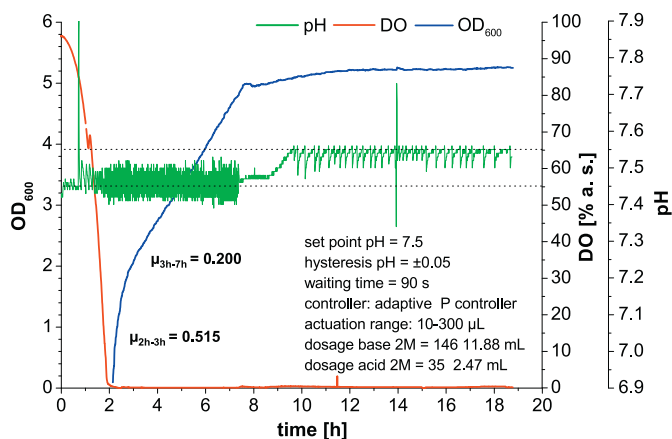


Fig. 6. Application of the SFC on cultivation of *E. coli* K12 in LB medium with 10 g L<sup>-1</sup> glucose using an adaptive  $P$  controller.

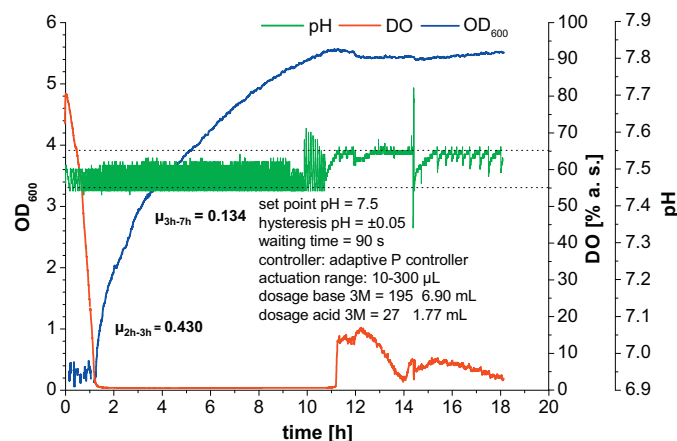


Fig. 7. Application of the SFC on cultivation of *E. coli* K12 in LB medium with 20 g L<sup>-1</sup> glucose using an adaptive  $P$  controller.

(Fig. 6) which is even more precise compared to 0.2 reported in the literatures [2] (stationary control system) and [32] (BioLector<sup>®</sup>, microtiterplate). A growth rate of at least 0.2 h<sup>-1</sup> was maintained over the whole cultivation time. A significant higher optical density of OD<sub>600</sub> 4.95 was reached 8 hours after inoculation (+39%) which was also reported in [7]. The end of the glucose based growth phase could be detected by the stop of the highly frequent base dispensing and a stopped increase of OD<sub>600</sub> signal. After an adaption phase the culture switched to basification of the medium due to amino acid degradation [33]. This could be prevented by the control as well. Nevertheless the usage of 2 M base in this experiment was predominant and all available NaOH solution was depleted. That gave a hint of the requirement of even more concentrated correction solution. In another experiment a glucose concentration of 20 g L<sup>-1</sup> was used in combination with 3 M correction solution. Substrate inhibition occurred which led to a lower growth rate. Though, a higher final OD<sub>600</sub> of 5.56 was reached. Like demonstrated before, the pH could be kept in a range of 0.1–0.15 pH units (Fig. 7) while the NaOH solution was depleted up to 40%(v/v) of the total filling. The real capacity of the control system strongly depends on the organism, medium, substrate, setpoint and the molarity of the correction solution (with can be set from 0 up to 3 M). Concentrations >3 M led to a significant performance loss of the micropumps and were not used subsequently. The experiments so far demonstrated that a tank capacity of 11.5 mL in combination with 3 M correction solutions and a culture volume of 100 mL is sufficient to control cultivations for at least 24 h. Nevertheless a refill during the process is possible. For the usage of bigger flask and culture volumes an upscaling of the tanks is possible as well. Concerning the mechanical stability no fluctuating of the flask with the SFC mounted on top was observed during shaking at 170 rpm.

A PID controller was applied in addition showing a very precise pH control in a range of at least 0.14 pH units (Supplementary Fig. S8) which is comparable to the  $P$  controller, as well as similar growth rates observed. The metabolic shift (glucose depletion) was determined after 8 h at an OD<sub>600</sub> of 4.34 which further increased up to 5.49 after 19 h. In general the controller could balance the pH at range of 0.05 pH units (5× maximal pH measurement resolution). The uncontrolled cultivation performed in strong buffered ZYP-31 medium using 10 g L<sup>-1</sup> glycerol as substrate generally results in a pH decrease from pH 7.5 to pH 6.6–6.5. In this case pH control within a range of 0.1 pH units could be achieved with a very low dosage count (8 times) during acidification (Fig. 8). In total only 2.29 mL base were used for acidification balance and 3.30 mL acid within 23 h showing that the SFC is also compatible for strong buffered defined media.

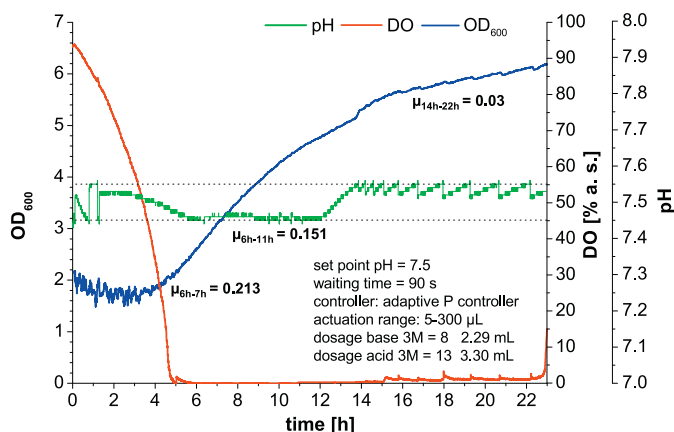


Fig. 8. Application of the SFC on cultivation of *E. coli* K12 in ZYP-31 medium with  $10 \text{ g L}^{-1}$  glycerol using an adaptive *P* controller.

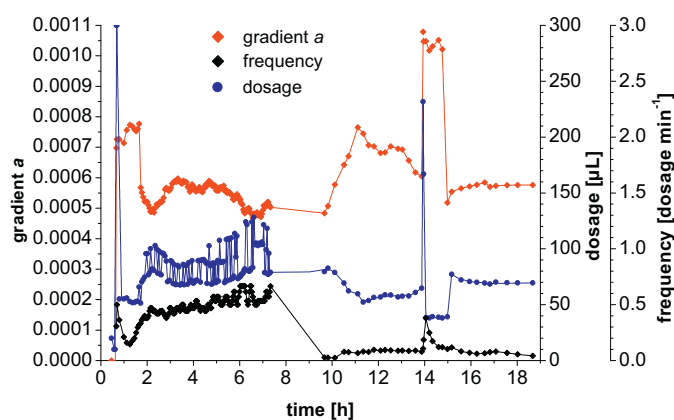


Fig. 9. Continuous recalibration of the adaptive *P* controller of an *E. coli* K12 cultivation in LB medium with  $20 \text{ g L}^{-1}$  glucose.

### 3.7. Controller behavior and controlling parameter trend during cultivation

During the cultivation shown in Fig. 6 the adaptive *P* controller dispensed 146 times  $2 \text{ M}$  base (MEAN  $82 \mu\text{L}$ ) at a concentration of  $10 \text{ g L}^{-1}$  glucose in LB medium within 8 h. The correlation between dosage volume and pH shift was assumed to be linear (Eq. (3), Section 2.4). The adaptive part is given by the gradient *a*, which adapted within the first 4 dosages to a value of 0.0007 during the lag phase (Fig. 9). In the following growth phases it could be observed that the parameter was adapting continuously, especially during the exponential growth phase (maximum glucose metabolism) between 1.5 and 7.5 h after inoculation. Dosages ranged between 50 and  $130 \mu\text{L}$  at which they were increasing towards the end of the exponential growth phase just as the dosage frequency. The explanation of the slight increase of dosage can be found in the increasing culture volume (caused by the addition of correction solutions) and the release of acetate into the medium. The higher gradient *a* in the stationary growth phase might be due to an asymmetric, direction depended pH shift caused by dosage, since the controller currently uses the same function and parameters for acid and base.

In comparison with a PID controller (Supplementary Section 1.8) it was found that both controller algorithms worked similar in view of pH control in a definable range around the setpoint. The main differences were found in the actuation frequency during process. In the case of the cultivation type shown in Fig. 6 the PID controller dispensed 266 times  $3 \text{ M}$  base (MEAN  $16 \mu\text{L}$ ) in within 8 h. Under consideration of the higher molarity the PID controller acted more

economical in terms of correction solution usage, but accepts a higher mechanical load. A less frequent actuation could be achieved by changing the actuation range from  $4\text{--}300 \mu\text{L}$  to  $10\text{--}300 \mu\text{L}$ . In the presented case this method was not applied to the PID in order to prevent strong oscillation effects as reported in [30].

## 4. Conclusions

In these investigations it was shown that precise, online pH control in shake flask by a cap integrated 3D printed control unit is possible avoiding the use of high buffer concentrations or buffer loaded polymers. Material tests showed a fully long term autoclavability of printed PA12 and compatibility against concentrated hydrochloric acid and NaOH solution. Also commercial available micropumps and valves proved to be resistant against these liquids. For fast response control an adaptive and simple adjustable *P* controller proved to be more adequate compared to a PID controller. During cultivation of *E. coli* K12 in 500 mL shake flasks the pH could be controlled in a very narrow range independent of the buffer capacity. Controlled cultivations exhibit a significant higher growth rate when the substrate dependent pH shift led to growth inhibition. The process using the PID controller was proved to work most economical in terms of correction solution usage. Some limitations of the used technologies are apparent in the rough material surface which may cause cleaning and biosafety issues.

As an outlook, the autoclavability of all fluidic actuators would simplify sterilization process. Another goal is to replace up to 100% of the tubing by material integrated channels. Regarding different applications the control unit enables the setup of individual pH gradients which are necessary for certain production processes or pH dependent induction of protein production [34]. The autoclavability of all fluidic actuators would also enable the dosage of non-self-sterilizing solutions (feeds, inducer, dyes, growth factors, inhibitors, trace elements etc.). The roughness of the SLS printed parts can be reduced to a certain degree by optimization of the printing parameters (laser power, scan spacing, hatch length, bed temperature, layer thickness) [35,36]. Especially the first two parameters are crucial. Optionally exterior surfaces could be completely sealed with coatings based on epoxy adhesives [37]. Material alternatives to be evaluated are given by new heat stable SLA polymers which are commercially available on the market (e.g. Accura® PEAK™, Visijet® SL HiTemp). Further non cell based applications consist in the regulation of enzymatic reactions by titration or dispensing inhibitors at a certain pH. Finally, the successful miniaturization supports the concept of light-weight, functional labware. It is very likely that intelligent, compact, portable, flexible and easy adaptable control units like the SFC will be established for bioprocess engineering encouraged by advances in rapid prototyping, MEMS and disposable sensor technology in this decade.

## Conflict of interest statement

The authors have declared no conflicts of interest.

## Acknowledgements

We would like to thank all members of our research groups for providing feedback and suggestions. This project was supported by the BMWi via AiF project within the ZIM-initiative (KF2407209FR2).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.017>

## References

- [1] A.J. Roe, C. O'Byrne, D. McLaggan, I.R. Booth, Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity, *Microbiology* 148 (2002) 2215–2222.
- [2] D. Weuster-Botz, J. Altenbach-Rehm, M. Arnold, Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks, *Biochem. Eng. J.* 7 (2001) 163–170.
- [3] L.M. Stancik, D.M. Stancik, B. Schmidt, D.M. Barnhart, Y.N. Yoncheva, J.L. Slonczewski, pH-Dependent expression of periplasmic proteins and amino acid catabolism in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 184 (2002) 4246–4258, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.15.4246-4258.2002>
- [4] S.H. Denison, pH Regulation of gene expression in fungi, *Fungal Genet. Biol.* 29 (2000) 61–71, <http://dx.doi.org/10.1006/fgbi.2000.1188>
- [5] E. Yohannes, D.M. Barnhart, J.L. Slonczewski, pH-Dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 192–199, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.1.192-199.2004>
- [6] H.A. Kang, E.-S. Choi, W.-K. Hong, J.-Y. Kim, S.-M. Ko, J.-H. Sohn, et al., Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 (2000) 575–582, <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051659>
- [7] R. Sanil, V. Maralingannavar, M. Gadgil, In situ pH management for microbial culture in shake flasks and its application to increase plasmid yield, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41 (2014) 647–655, <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1405-8>
- [8] N. Beales, Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3 (2004) 1–20, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- [9] G.J. Morris, L. Winters, G.E. Coulson, K.J. Clarke, Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986) 2023–2034, <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-132-7-2023>
- [10] M. Scheidle, B. Dittrich, J. Klinger, H. Ikeda, D. Klee, J. Büchs, Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with pre-determined release kinetics, *BMC Biotechnol.* 11 (2011) 25.
- [11] K. Pradhan, T. Pant, M. Gadgil, In situ pH maintenance for mammalian cell cultures in shake flasks and tissue culture flasks, *Biotechnol. Progr.* 28 (2012) 1605–1610, <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.1614>
- [12] F. Amirouche, Y. Zhou, T. Johnson, Current micropump technologies and their biomedical applications, *Microsyst. Technol.* 15 (2009) 647–666, <http://dx.doi.org/10.1007/s00542-009-0804-7>
- [13] B.D. Iverson, S.V. Garimella, Recent advances in microscale pumping technologies: a review and evaluation, *Microfluid. Nanofluid.* 5 (2008) 145–174, <http://dx.doi.org/10.1007/s10404-008-0266-8>
- [14] H.T.G. van Lintel, F.C.M. van De Pol, S. Bouwstra, A piezoelectric micropump based on micromachining of silicon, *Sens. Actuators* 15 (1988) 153–167, [http://dx.doi.org/10.1016/0250-6874\(88\)87005-7](http://dx.doi.org/10.1016/0250-6874(88)87005-7)
- [15] Microjet Technology Co., Ltd, Curiejet PS22L GS22L, 2015, ([http://downloads.microjet.com.tw/Curiejet/MicroPump\\_PS22L&GS22L\\_DataSheet%20Ver.131220.pdf](http://downloads.microjet.com.tw/Curiejet/MicroPump_PS22L&GS22L_DataSheet%20Ver.131220.pdf)) (accessed January 1, 2015).
- [16] Takasago Electric Inc, Piezoelectric Micro Pump, 2015, ([http://www.takasago-fluidics.com/products\\_pump/piezol/](http://www.takasago-fluidics.com/products_pump/piezol/)) (accessed January 1, 2015).
- [17] B. Berman, 3-D printing: the new industrial revolution, *Bus. Horiz.* 55 (2012) 155–162, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bushor.2011.11.003>
- [18] S. Junk, M. Tränkle, Design for additive manufacturing technologies: new applications of 3D-printing for rapid prototyping and rapid tooling, in: *Proc. 18th Int. Conf. Eng. Des. ICED 11*, Lyngby/Copenhagen, 2011.
- [19] V.A. Lifton, G. Lifton, S. Simon, Options for additive rapid prototyping methods (3D printing) in MEMS technology, *Rapid Prototyping J.* 20 (2014) 403–412.
- [20] M. Hofmann, 3D printing gets a boost and opportunities with polymer materials, *ACS Macro Lett.* 3 (2014) 382–386, <http://dx.doi.org/10.1021/mz4006556>
- [21] R.D. Goodridge, C.J. Tuck, R.J.M. Hague, Laser sintering of polyamides and other polymers, *Prog. Mater. Sci.* 57 (2012) 229–267, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.04.001>
- [22] Evonik Industries, VESTAMID® L–Polyamide 12, 2012, (<http://www.vestamid.com/product/vestamid/en/products-services/vestamid-l/pages/default.aspx>).
- [23] A. Abe, S. Kobayashi, H. Fuyamada, D. Yamaguchi, S. Matsumura, A. Ueno, et al., Biocompatibility of nylon resin discs fabricated by selective laser sintering, *J. Oral Tissue Eng.* 11 (2013) 42–50, <http://dx.doi.org/10.11223/jarde.11.42>
- [24] T.H. Lücking, F. Sambale, S. Beutel, T. Scheper, 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: a proof of principle, *Eng. Life Sci.* 15 (2015) 51–56, <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201400093>
- [25] T.H. Lücking, F. Sambale, B. Schnaars, D. Bulnes-Abundis, S. Beutel, T. Scheper, 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: in vitro incompatibility and applications for eukaryotic cell cultures, *Eng. Life Sci.* 15 (2015) 57–64, <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201400094>
- [26] C. Ude, J. Schmidt-Hager, M. Findeis, G.T. John, T. Scheper, S. Beutel, Application of an online-biomass sensor in an optical multisensory platform prototype for growth monitoring of biotechnical relevant microorganism and cell lines in single-use shake flasks, *Sensors* 14 (2014) 17390–17405, <http://dx.doi.org/10.3390/s140917390>
- [27] J. Schmidt-Hager, C. Ude, M. Findeis, G.T. John, T. Scheper, S. Beutel, Non-invasive online biomass detector system for cultivation in shake flasks, *Eng. Life Sci.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201400026>
- [28] J.K.A. Bleasdale, J.A. Nelder, Plant population and crop yield, *Nature* 188 (1960), <http://dx.doi.org/10.1038/188342a0>, 342–342.
- [29] F. Widdel, Theory and Measurement of Bacterial Growth, 2007, (<http://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary13037/Wachstumsversuch.pdf>) (accessed June 6, 2015).
- [30] M.A. Duarte-Mermoud, F.A. Rojo, R. Pérez, Experimental evaluation of combined model reference adaptive controller in a pH regulation process, *Int. J. Adapt. Control Signal Process* 16 (2002) 85–106, <http://dx.doi.org/10.1002/acs.674>
- [31] A. Buchenauer, M. Funke, J. Büchs, W. Mokwa, U. Schnakenberg, Microbioreactors with microfluidic control and a user-friendly connection to the actuator hardware, *J. Micromech. Microeng.* 19 (2009) 074012, <http://dx.doi.org/10.1088/0960-1317/19/7/074012>
- [32] M. Funke, A. Buchenauer, U. Schnakenberg, W. Mokwa, S. Diederichs, A. Mertens, et al., Microfluidic biolector-microfluidic bioprocess control in microtiter plates, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 497–505, <http://dx.doi.org/10.1002/bit.22825>
- [33] J.W. Robbins, K.B. Taylor, Optimization of *Escherichia coli* growth by controlled addition of glucose, *Biotechnol. Bioeng.* 34 (1989) 1289–1294, <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260341007>
- [34] G.J. Tolentino, S.-Y. Meng, G.N. Bennett, K.-Y. San, A pH-regulated promoter for the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* 14 (1992) 157–162, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01023351>
- [35] A. Sachdeva, S. Singh, V.S. Sharma, Investigating surface roughness of parts produced by SLS process, *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 64 (2013) 1505–1516, <http://dx.doi.org/10.1007/s00170-012-4118-z>
- [36] P.B. Bacchewar, S.K. Singhal, P.M. Pandey, Statistical modelling and optimization of surface roughness in the selective laser sintering process, *Proc. Inst. Mech. Eng. B: J. Eng. Manuf.* 221 (2007) 35–52, <http://dx.doi.org/10.1243/09544054JEM670>
- [37] Stratasys Ltd, Sealing FDM Parts, 2015, (<http://www.stratasys.com/solutions/finishing-processes/sealing-fdm-parts>).

## Biographies

**Christian Ude** studied Life Science at the Leibniz University of Hannover, Germany. He graduated with a Master of Science in the working group of Thomas Scheper in 2012. From 2012 to 2015, he continued working in that working group in the context of his PhD thesis. During his thesis he is working on the development of a multisensory platform and an online pH control unit for shake flask cultivations. Additionally, he developed an enzyme based, ceramic capillary reactor system to produce bioactive peptides from various protein sources.

**Thorleif Hentrop** is an electronic engineer and head of the electronic workshop at the Institute of Technical Chemistry at the Leibniz University of Hannover, Germany since 2000. He is a trained radio technician and graduated with a diploma degree in electronics at the University of Frankfurt am Main, Germany in 1995. In the last years he accompanied many PhD students and postdocs during their projects in the area of sensors and automation. He is also working on projects at his own engineering office.

**Patrick Lindner** is a member of the scientific staff at the Institute of Technical Chemistry, Leibniz University of Hannover since 2007. He graduated with a diploma degree in chemistry in 2003 and received his PhD in 2006. His main topics of research activities include Bioanalytics, Microscopy, Bioinformatics, Statistics, Multivariate Data Analysis, Artificial Neural Networks and Software Development.

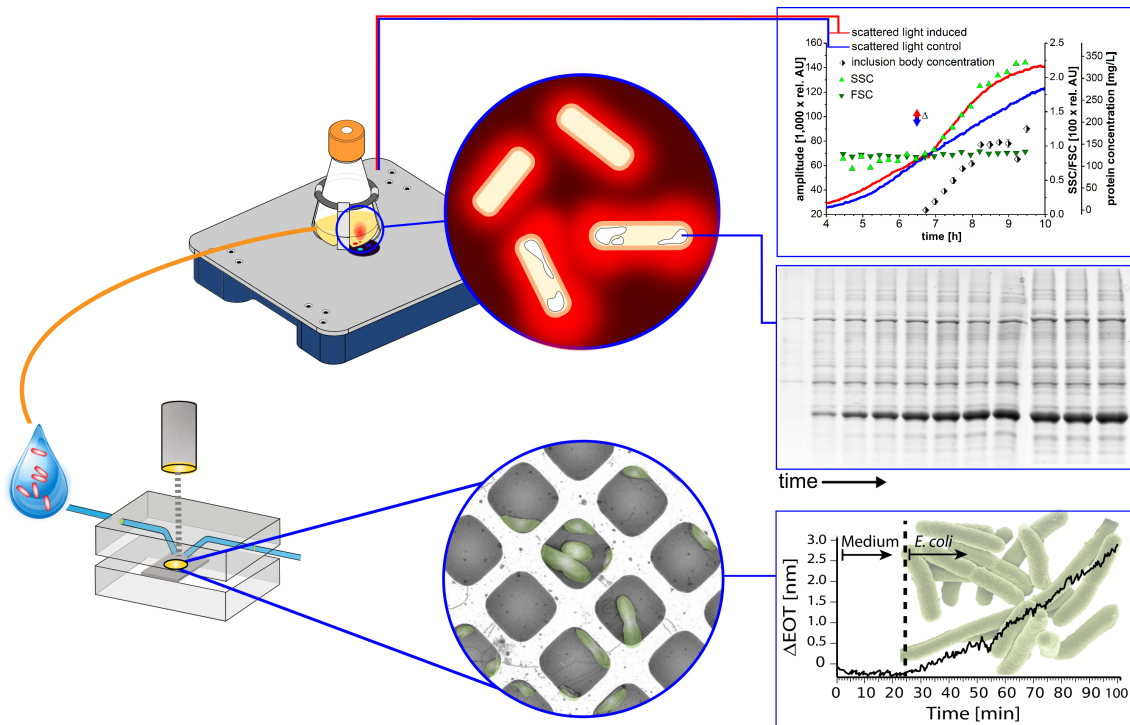
**Tim Lücking** studied Biotechnology at the University of Applied Science and University of Bielefeld, Germany. He did his master thesis at Bayer Technology Services, Leverkusen and graduated in 2011. From 2012 to 2015, during his PhD thesis, he worked in the group of Prof. Dr. T. Scheper at the Institute of Technical Chemistry in Hannover, Germany. During his thesis he developed an automation system and new PAT technologies for mammalian cell cultivations. Additionally, he worked on new 3D printing concepts for creating individual labware.

**Thomas Scheper** is a professor at the Institute of Technical Chemistry, Leibniz University of Hannover since 1995 and prior at the University of Münster since 1992. He graduated with the diploma degree in chemistry in 1981 in Hannover and received his PhD in 1985. After a postdoctoral stay at Caltech in 1986 he returned to the University of Hannover. His research activities are in the area of bio-process analysis, biosensors, fermentation process development and downstream processing.

**Sascha Beutel** is a senior scientist and project manager in the research group of Prof. Thomas Scheper at the Institute of Technical Chemistry, Leibniz University of Hannover since 2001. He graduated with the diploma degree in chemistry in 1997 in Hannover and received his PhD in 2000. He led the center of excellence “functional food” from 2002 to 2006. He is lecturer in bioprocess engineering at the chemical department and advanced technical college of Hannover and was scholarship coordinator of the degree program “Life Science” (BSc) from 2004 to 2008. Since 2008 he is also leading the hazardous waste management.



### 3.3 Online-Detektion von Inclusion Bodies während Schüttelkolbenkultivierungen



In den ersten beiden Kapiteln konnte erfolgreich gezeigt werden, wie es mit miniaturisierten Sensorsystemen und Aktoren auch im Schüttelkolbenmaßstab möglich ist Bioprozesse online zu überwachen und zu regeln. Von dieser Entwicklung profitieren in erster Linie Prozesse in denen die Erfassung von Kultivierungsbaugrößen wie z. B. pH,  $pO_2$  und Biomasse für eine BPE ausreichend ist. Weitere sekundäre Prozessparameter wie Proteinkonzentration oder Fluoreszenz durch biogene Fluorophore sind ohne zusätzlich Sensoren nicht erfassbar. Im folgenden abschließenden Kapitel wird untersucht, ob es mit dem in der ersten Veröffentlichung bereits vorgestellten Streulichtsensor des SFR OGM FM1 möglich ist die Konzentration von IB, die typischerweise bei der rekombinanten Proteinproduktion entstehen, zu messen.

Die Evaluierung des Streulichtensors zur spektroskopischen Analyse von intrazellulären Partikeln ergab einen reproduzierbaren Zusammenhang zwischen Induktionszeitpunkt und einem zusätzlichen Anstieg des Streulichtsignals im Vergleich zum linearen Wachstumsverlauf ohne Induktion. Dieser Effekt konnte auch als „Knick“ in der Wachstumskurve von *E. coli* BL21 unter Produktion zweier unterschiedlicher Proteine beobachtet werden, die als IB produziert werden. Dazu gehören das *glutathione-S-transferase-tagged green fluorescent protein* (GFP-GST) und der *human leukemia inhibitory factor* (hLIF). Der hLIF-produzierende Stamm wurde im definierten Medium ZYP-31 bei 37 °C kultiviert, da die Produktion hier zu 98 % in IB erfolgt. Mittels *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gelelectrophoresis* (SDS-PAGE) wurde eine hohe finale Konzentration im Vergleich zum löslichen Hostcellprotein (HCP) bestätigt, wobei intrazelluläres, lösliches hLIF auch mit kolloidalem Coomassie nicht nachgewiesen werden konnte. Die Differenz des Streulichtsignals aus induzierter und nicht induzierter Kultur („ΔAmp“) wurde weiterhin mit dem densitometrisch bestimmten IB-Konzentrationsverlauf korreliert. Dabei ließ sich ein linearer Zusammenhang von 10–150 mg·l<sup>-1</sup> für hLIF beobachten. Unterstützt wurden die Messdaten des Streulichtensors durch Messung des Seitwärtsstreulichtes (SSC) via Durchflusszytometrie. Der SSC stieg ab dem Induktionszeitpunkt stark an und ließ sich ebenfalls mit der IB-Konzentrationsentwicklung linear korrelieren. Der beobachtete Zusammenhang von SSC und intrazellulären Strukturen wurde bereits in verschiedenen Forschungsarbeiten beschrieben [74, 119]. Umfangreiche Kontrollexperimente bestätigten, dass der beobachtete Effekt nicht durch die Zunahme der Wachstumsrate, technische Einflussfaktoren (z. B. Induktionsvorgang, Autosampling) oder Zellagglomerationen verursacht wurde. Letzteres konnte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht und anhand eines konstanten FSC ausgeschlossen werden, da die Zunahme der Partikelgröße (z. B. Aggregate) im Zusammenhang mit einer messbaren Zunahme des Vorwärtsstreulichtes (FSC) einzelner Partikel steht [47, 87]. Zur weiteren Analyse von Zellmorphologieveränderungen als Einflussfaktor auf das Streulichtsignal wurden

induzierte bzw. nicht induzierte Zellen über hochauflösende Elektronenmikroskopie (HRSEM) untersucht. Es wurde deutlich, dass die auf Glasträgern fixierten Bakterienzellen nach Induktion ihre strukturelle Integrität verlieren und zentral kollabieren. Die Größe der Zellen änderte sich hingegen nur marginal. Die Zunahme des Zellvolumens bei *E. coli* wurde in Forschungsarbeiten auch mit dem Anstieg von FSC und SSC in Zusammenhang gebracht und korreliert [69, 113]. Deshalb könnten zusätzlich zur IB-Bildung auch Morphologieveränderungen zum Anstieg des SSC beigetragen haben. Durch Untersuchung einer kleineren Population an Zellen in einem porösen SiPA-Sensor mittels interferometrische Fourier-Transformations-Spektroskopie (RIFTS) wurde ebenfalls eine Veränderung der optischen Eigenschaften der Zellen nach Induktion festgestellt. Es konnte außerdem mittels HRSEM nachgewiesen werden, dass sich bei diesen Sensoren eine ausreichende Anzahl an einzelnen Zellen in den Einbuchtungen des Arrays selbstständig positioniert.

Kultivierungsexperimente bei verschiedenen Temperaturen ergaben, dass  $\Delta\text{Amp}$  bei 30 °C geringer ausfällt als bei 37 °C, wobei die ermittelten IB-Konzentrationen mit denen bei 37 °C vergleichbar waren. Da es sich bei dem Streulichtsignal um eine Überlagerung von Biomassenentwicklung und IB-Konzentration handelt, muss eine Temperaturabhängigkeit bei der Erstellung von Korrelation berücksichtigt werden. Die Ergebnisse der Experimente lassen weiterhin darauf schließen, dass das Auftreten des zusätzlichen Streulichtsignals von der molekularen Größe des Proteins unabhängig ist. GFP-GST ist mit ca. 54 kDa wesentlich größer als hLIF (34 kDa) [75, 109]. Es spielen vielmehr chemische Eigenschaften der Proteine eine Rolle, welche die Größe der IB und damit auch deren optische Eigenschaften bestimmen. Abschließend demonstrieren die Arbeiten, dass der Informationsgehalt von online-Messdaten LED-basierter Streulichtsensoren weit über dem der Absorptionsmessung zur OD-Bestimmung hinausgeht. Kleine, kompakte SiPA-Sensoren und Mikrozytometer stellen weiterhin eine leistungsfähige, kostengünstige und mobile Alternative zu stationären Zytometern dar.

# Online analysis of protein inclusion bodies produced in *E. coli* by monitoring alterations in scattered and reflected light

Christian Ude<sup>1</sup> · Nadav Ben-Dov<sup>2</sup> · André Jochums<sup>1</sup> · Zhaopeng Li<sup>1</sup> · Ester Segal<sup>2</sup> · Thomas Scheper<sup>1</sup> · Sascha Beutel<sup>1</sup>

Received: 4 December 2015 / Revised: 15 February 2016 / Accepted: 17 February 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** The online monitoring of recombinant protein aggregate inclusion bodies during microbial cultivation is an immense challenge. Measurement of scattered and reflected light offers a versatile and non-invasive measurement technique. Therefore, we investigated two methods to detect the formation of inclusion bodies and monitor their production: (1) online 180° scattered light measurement ( $\lambda = 625$  nm) using a sensor platform during cultivation in shake flask and (2) online measurement of the light reflective interference using a porous Si-based optical biosensor (SiPA). It could be shown that 180° scattered light measurement allows monitoring of alterations in the optical properties of *Escherichia coli* BL21 cells, associated with the formation of inclusion bodies during cultivation. A reproducible linear correlation between the inclusion body concentration of the non-fluorescent protein human leukemia inhibitory factor (hLIF) carrying a thioredoxin tag and the shift (“ $\Delta$ amp”) in scattered light signal intensity was observed. This was also observed for the glutathione-S-transferase-tagged green fluorescent protein (GFP-GST). Continuous online monitoring of

reflective interference spectra reveals a significant increase in the bacterium refractive index during hLIF production in comparison to a non-induced reference that coincide with the formation of inclusion bodies. These online monitoring techniques could be applied for fast and cost-effective screening of different protein expression systems.

**Keywords** Online scattered-light sensor · Inclusion bodies · Flow cytometry · Reflective interference Fourier transform spectra · Silicon photonic arrays · Optical biosensor

## Introduction

### Online detection of recombinant protein inclusion bodies

The monitoring of recombinant protein production is still a bottleneck for effective and sustainable process engineering. A large variety of techniques was developed to determine recombinant protein concentration and especially inclusion

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00253-016-7403-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Sascha Beutel  
beutel@iftc.uni-hannover.de

Christian Ude  
ude@iftc.uni-hannover.de

Nadav Ben-Dov  
nadavbe4@tx.technion.ac.il

André Jochums  
jochums@iftc.uni-hannover.de

Zhaopeng Li  
zhaopeng.li@iftc.uni-hannover.de

Ester Segal  
esegal@tx.technion.ac.il

Thomas Scheper  
scheper@iftc.uni-hannover.de

<sup>1</sup> Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Callinstr. 5, 30167, Hannover, Germany

<sup>2</sup> Department of Biotechnology and Food Engineering, Technion—Israel Institute of Technology, 32000 Haifa, Israel

bodies (IB) in vivo. An overview is given as follows: (1) fusion of the target protein with green fluorescent protein (GFP) (Hedhammar et al. 2005; Patkar et al. 2002), (2) thioflavin staining (Espargaró et al. 2012), (3) sequence motive specific staining using fluorescein arsenical hairpin (FIAsH) (Ignatova and Gierasch 2004), (4) unspecific DNA/protein staining (Lewis et al. 2004; Medwid et al. 2007), (5) activation of luciferase reporter genes (Kraft et al. 2007), (6) Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Ami et al. 2006), (7) flow cytometry stand-alone (Wittrup et al. 1988), and (8) impedance measurement (Upadhyay et al. 2001). Some of these techniques were used in combination with flow cytometry (1, 2, 4) while others used fluorescence spectrometers (3, 5). These current state-of-the-art techniques suffer from several drawbacks, e.g., low robustness, limited universality, expensive reagents, low cell wall permeability of the dye, decrease/loss in target protein yield, and cross-sensitivity. In terms of in vivo online measurement, there are only few examples of commercially available measurement systems which can be adapted to bioreactors, shake flasks, or well plates (Jones et al. 2004; Kensy et al. 2009; Nemecek et al. 2008; Schmidt-Hager et al. 2014; Ude et al. 2014). Especially for shake flasks, which are still widely used to evaluate various, newly constructed expression systems or screening protein production at different conditions, there is no adequate online monitoring system so far to directly measure protein production and IB formation, respectively. While our group has previously demonstrated the concept of monitoring cell growth by 180° scattered light, the challenge of monitoring IB production by optical sensing is still unmet. Light interacting with intracellular homogenous particles of a higher refractive index (RI), compared to the cytoplasm, bends and reflects; in particular, light scattered at angles >40° is sensitive to internal cell structures (Drezek et al. 1999). Thus, in addition to the investigation of intracellular particle size and concentration by the measurement of 180° scattered light (as illustrated in Fig. S2), we introduce a second method to evaluate the optical properties of cells. Herein, cells entrapment within silicon photonic arrays (SiPA) is employed for real-time monitoring of the cell state. SiPA are a class of photonic crystals, characterized by micron-scale periodic pores, that have been recently shown to be compatible for bacterial culture analysis by monitoring small changes in the RI and tracking bacterial cells that are entrapped in the pores (Mirsky et al. 2013; Massad-Ivanir et al. 2014). The term photonic crystal was first used to describe a material comprised of two different RI substances in a sub-wavelength grating structure, consisting of ordered periodic arrays of reflectivity (Yablonovitch 1987). Photonic arrays, or lamellar grating, differ by consisting of ordered periodic topographies larger than the visible wavelength (Fig. S3a). The interference term in photonic arrays is related to a phase delay between the two alternating reflective partners, i.e., light beams reflected from

the top and the bottom of the pores (Fig. S3b). When illuminated with a broadband light source, high-order diffraction light modes are coupled, destructively interfering with the zero-order transmitted light. For each particular resonant wavelength, a degree of interference occurs in the reflected light, resulting in an interference spectrum. Further analysis by Fourier transformation termed as interferometric Fourier transform spectroscopy (RIFTS) allows extracting the SiPA intrinsic effective optical thickness (EOT) which is the product of the pore refractive index ( $n$ ) and the pore depth ( $L$ ):  $EOT = 2Ln$  (Mirsky et al. 2013). Introduction of a biomaterial into the pores induces measurable changes in the EOT that can be monitored and quantified in real-time via RIFTS analysis (Fig. S3c). The advantages of optical monitoring for bacteria cell studies are numerous. Cells' properties are measured without the use of genetic transfections, dyes, or stains, so a population of cells can be measured repeatedly without disruptions. The detected output signal is highly quantitative, providing repeatable measurements without photobleaching and lacking fluorescence overflow and superior signal-to-noise ratio. Photonic array-based biosensors provide information that is fundamentally different than that obtained by microscopy, as the biosensor responds sensitively to small variations of the cells, within the porous volume. The focus of this study is to investigate whether online 180° scattered light of 625 nm wavelength and online RIFTS measurements could be an appropriate, cost-effective, and fully non-invasive technique to monitor IB formation in vivo.

## Materials and methods

### Media, buffers, reagents, chemicals, and SDS-PAGE gels

**Terrific Broth** 24 g L<sup>-1</sup> yeast extract (AppliChem, Germany (ApC)), 12 g L<sup>-1</sup> tryptone enzymatic digest of casein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (SA)), 5 g L<sup>-1</sup> glycerol (Rotipuran®, Carl-Roth, Germany (CR)), 200 μL L<sup>-1</sup> TEGO® Antifoam KS 911 (Evonik-Industries, Essen, Germany (EvI)).

**ZYP-31** (F.W. Studier et al., modified): 6.8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka, St. Louis, USA (FK)), 17.9 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O (Riedel de Haën, St. Louis, USA (RdH)), 3.3 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (CR), 2.0 g L<sup>-1</sup> yeast nitrogen base (YNB) salts with amino acids (Y1250 Sigma), 0.06 g L<sup>-1</sup> protocatechuic acid (FK), 10 g L<sup>-1</sup> glycerol (CR), 200 μL L<sup>-1</sup> TEGO® Antifoam KS 911 (EvI).

**Phosphate buffered saline** 137 mM NaCl, 30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 H<sub>2</sub>O (RdH), 2.7 mM KCl (Merck KGaA, Darmstadt, Germany (Mck)), pH 7.0.

**Lysis buffer** 50 % (v/v) buffer A, 50 % (v/v) buffer B. A: 50 mM Tris-HCl (ApC), 50 mM NaCl (SA), 0.2 % (w/v) Triton X100 (SA), 50 μL L<sup>-1</sup> TEGO® Antifoam KS911 (EvI), 4 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl-fluoride-hydrochloride (Pefabloc® SC, (SA)) pH = 7.0.

B: BugBuster® Protein Extraction Reagent (EMD Millipore Corp, Billerica, USA), 0.02083 mg/10 mL lysozyme from chicken egg white (SA, ~96,000 U mg<sup>-1</sup>).

**Washing buffer** 50 mM Tris-HCl (ApC), 10 mM 2-mercaptoethanol (CR), 2 mM EDTA (ApC), 5 % (v/v) glycerol, 0.2 % (w/v) Triton X100 (SA), pH 8.0.

**Laemmli buffer** 65 mM Tris-HCl (ApC), 2.5 % sodium dodecyl sulfate (SDS) (RdH), 0.005 % (w/v) bromophenol blue (CR), 10 % (v/v) 2-mercaptoethanol (CR), 8.6 % (v/v) glycerol, pH 6.8.

**TGS running buffer** Tris-base 25 mM (CR), 86 mM glycine (SA), 3.47 mM SDS (RdH), pH 8.3.

**15 % polyacrylamide separation gel** 37.45 % (v/v) 40 % Rotiphorese® Gel 40 (CR), 0.418 M Tris-base 8.8 (CR), 3.45 mM SDS (RdH), 24.3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub>, 0.2 % (v/v) TEMED (CR)/2.18 mM APS (CR).

**Stacking gel** 13.27 % (v/v) 40 % Rotiphorese® Gel 40 (CR), 0.167 M Tris 6.8 (ApC), 1.84 mM SDS (RdH), 66.7 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub>, 0.18 % (v/v) TEMED (CR)/2.0 mM APS (CR).

**BSA standard** Bovine albumin (Amresco Inc., Solon, USA), 20 mM Tris-base (CR), pH 8.0.

**Colloidal-Coomassie staining solution** 0.12 % (w/v) Coomassie G-250 (CR), 10 % (w/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (CR), 10 % (v/v) orthophosphoric acid (CR), 20 % methanol (v/v) (VWR International, Darmstadt, Germany (VWR)).

**Decolorization agent** 10 % (v/v) Ethanol 96 % (CR), 2 % (v/v) orthophosphoric acid (CR).

All solutions were prepared with deionized water produced by Arium® 661 Ultrapure water system (Sartorius Stedim Biotech AG, Göttingen, Germany (SaR)).

**SiPA functionalization** *N*-(3-Trimethoxysilylpropyl) diethylenetriamine (DETAS), wheat germ agglutinin (WGA), ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) (SA), *N*-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS) (SA), morpholinoethanesulfonic acid (MES), succinic

anhydride, dimethylsulfoxide (DMSO) (SA), acetonitrile, diisopropylethylamine (DIEA), Lugol's solution, and *N*-acetylglucosamine (NAG) were purchased from (SA, Israel). Acetic acid (BioLab Ltd., Israel). Phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 68 mM NaCl). MES buffer (6 mM MES, 4 mM MES sodium salt).

## Cultivation methods

### Media preparation, cultivation, and induction

The microorganisms, applied media, and cultivation parameters are listed in Table 1. The media were autoclaved at 121 °C for 20 min. Vitamins and tracers were filtered separately with 0.2 μm Luer sterile filters (Minisart®, SaR). Induction was performed with a 0.5 M stock solution of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (VWR) to give a final concentration of 2 mM, which was injected via the septum. In the case of antibiotic resistance, the medium was adjusted to the following concentrations: 0.086 mM kanamycin sulfate (CR), 0.14 mM disodium carbenicillin (ApC). Precultures were prepared from 15 % (w/v) glycerol stocks. The main culture was inoculated with a calculated start OD<sub>600</sub> of 0.2.

### Online shake flask sensor and cultivation equipment

For 180° scattered light measurements, a multisensory platform (SFR OGM FM1, PreSens Precision Sensing GmbH, Regenb, Germany) was used. This device is able to measure scattered light, dissolved oxygen (DO), and pH simultaneously. The scattered light sensor is basically a setup of a LED (625 nm) and a highly sensitive photodiode measuring at 160–180° angle through the wall of the shake flask. This sensor was observed to be sensitive to morphological, opacity, and color changes of cells. The hardware specification details are described in previous publications (Schmidt-Hager et al. 2014; Ude et al. 2014). Shaking was performed on an orbital shaker with a 25-mm shaking diameter (Certomat® SII, SaR) within an incubator (Certomat® H, B. Braun Biotech International, Berlin, Germany). X-ray sterilized, disposable, 4× baffled shake flasks (Corning® Inc., Corning, USA) equipped with DO- and pH sensor spots (PreSens GmbH, Regenb, Germany) were used. The batch numbers stated as follows: (1) SFS-HP5-PSt3-500-WB-VEC-v3 ID 13-06-01. (2) SFS-HP5-PSt3-1000-WB-VEC-v3 ID 14-15-02. The detailed calibration data is given in the Online Resource.

**Table 1** Overview of cultivation parameters and strains used for the experiments performed

Experiment ID	Strain/protein	Agitation [rpm]	Flask type/filling [mL]	Temperature [°C]	Medium	IPTG [mM]
140108	<i>E. coli</i> BL21 (NCBI Taxonomy ID: 469,008, Novagen 69,450)/GFP-GST (Li et al. 2011)	150	500/100	37	TB	0
140115	<i>E. coli</i> BL21(DE3)/GFP-GST	150	500/100	37	TB	2
141222	<i>E. coli</i> BL21(DE3) (NCBI Taxonomy ID: 469,008, Novagen 69,450)/hLIF (Tomala et al. 2010)	150	500/100	37	ZYP-31	2
141228	<i>E. coli</i> BL21	170	500/100	37	ZYP-31	0
150708	<i>E. coli</i> BL21/hLIF	170	1000/200	37	ZYP-31	2
150709	<i>E. coli</i> BL21/hLIF	170	1000/200	37	ZYP-31	2
150710	<i>E. coli</i> BL21/hLIF	170	1000/200	37	ZYP-31	2
150714	<i>E. coli</i> BL21/hLIF	170	1000/200	37	ZYP-31	0

## Silicon photonic array optical biosensors

### Surface functionalization

SiPA microstructures, characterized by a periodic pattern of 4  $\mu\text{m}^2$  pores, were fabricated by photolithography and reactive ion etching processes. Post fabrication, the SiPA chips were thermally oxidized in a tube furnace (Thermolyne, Thermo Scientific, Waltham, USA) at 800 °C for 1 h in ambient air resulting in an oxidized matrix ( $\text{SiO}_2$ ). Surface functionalization was constructed in a three-step process. First, the  $\text{SiO}_2$  was amine silanized with DETAS (2 % v/v) and acetic acid (0.6 % v/v) in 50 % v/v ethanol/distilled water (DW) for 1 h, rinsed three times with 70 % v/v ethanol/DW, and dried under a nitrogen stream. Second, the amine end-groups were reacted with succinic anhydride (1 % v/v) and DIEA (4 % v/v) in acetonitrile for 3 h to convert surface amines to carboxyls. Next, the crosslinking of amine-reactive NHS (1 % w/v) to surface carboxyls is mediated by carbodiimide chemistry using EDC (2 % w/v) and DMSO (10 % v/v) in MES buffer pH 6 for 1 h. Finally, WGA was dissolved in PBS (1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) and immobilized onto the SiPA by reacting with the NHS activated surface for 1 h.

### RIFTS monitoring

The SiPA biosensor was placed in a custom-made flow cell (Fig. 1), and the reflectance spectra of the samples were collected using a charge-coupled device (CCD) USB 4000 spectrometer fitted with a collimating lens coupled to a bifurcated fiber-optic cable. A tungsten light source was directed onto the center of the sample with a spot diameter of 2 mm. All optical parts were purchased from Ocean Optics Inc. (Dunedin, USA) unless mentioned otherwise. Optical data were recorded at a wavelength range of 400–900 nm, with a spectral acquisition time of 30 ms. Illumination of the surface and detection of the

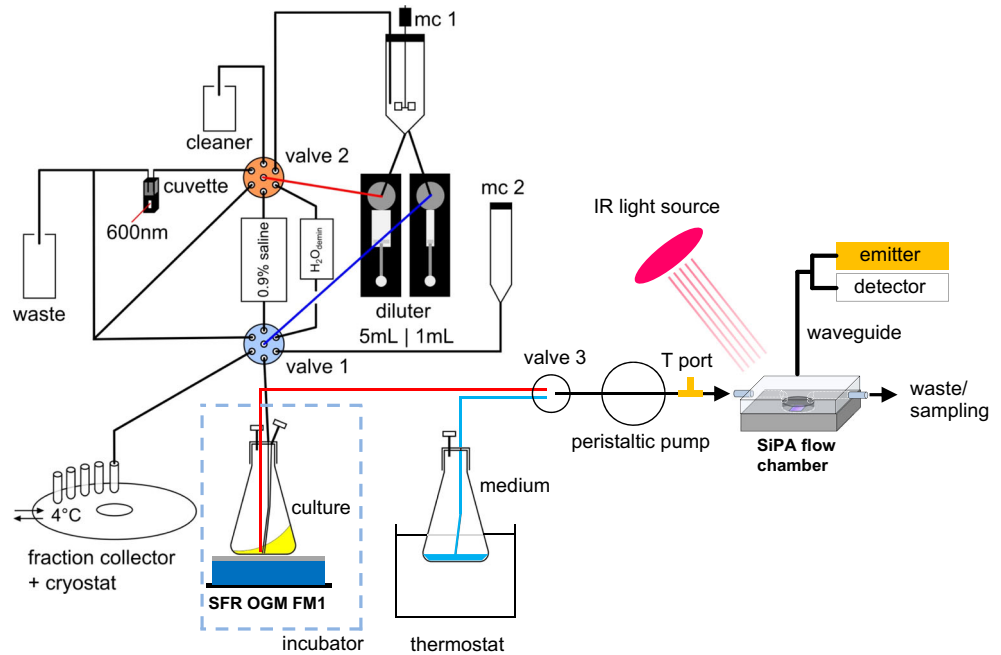
reflected light were both performed along an axis coincident with the surface normal. Data were recorded by SpectraSuite software and analyzed by Igor Pro software (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, USA) as RIFTS, as previously described (Massad-Ivanir et al. 2014), to retrieve EOT value. The flow cell was heated to 37 °C by infrared lamp Bosotherm 4000 (Boso GmbH & Co. KG, Jungingen, Germany), and temperature was monitored throughout the experiment using infrared thermometer 561 (Fluke corp., Everett, USA). The inlet was fed through a peristaltic pump, and the outlet was directly purged into a waste container. Initially, the flow cell was flushed with 70 % (v/v) ethanol (CR) for 10 min, followed by a constant flow of clean growth media for 30 min, until a stable EOT baseline was obtained. *Escherichia coli* suspension ( $10^8$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ) was introduced at a flow rate of 50  $\mu\text{L min}^{-1}$  for 20 min, followed by the introduction of a sterile growth medium. For induction experiments, IPTG was added to the growth medium. The SiPA biosensor was optically monitored for 3 h under constant flow conditions (50  $\mu\text{L min}^{-1}$ ).

### HRSEM (high resolution scanning electron microscopy) studies

For studying the morphology of bacterial cells, planar  $\text{SiO}_2$  wafers were functionalized with WGA, as described in section “Surface functionalization.” Cell samples from different suspensions were immediately placed onto the wafer for 30 min, followed by removal of excess media. The adsorbed cells were fixed by gentle flooding with 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in phosphate buffer and maintained in preservation solution for 3 days at 4 °C.

For HRSEM analysis of SiPA, 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in phosphate buffer was injected into the flow cell at the end of the optical experiment. After incubation of 15 min, the SiPA samples were collected into sealed vials and kept in their preservation solution, for 3 days, at 4 °C. Samples were prepared for HRSEM observation by serial dehydration with increasing

**Fig. 1** Technical drawing of the experimental setup. The *left* 1000 mL shake flask was connected to an at-line sampling and OD measuring system. Scattered light was measured online with the SFR OGM FM1 sensor, while the EOT was measured by the SiPA sensor



ethanol fraction up to 100 % ethanol and finally vacuum dried. The samples were carbon coated by graphite sputtering and studied by a high-resolution scanning electron microscope (Carl Zeiss Ultra Plus HRSEM).

### Optical density measurement and sampling

The  $OD_{600}$  was measured with an at-line sampling and dilution system connected to a 3–4 °C cooling tray and a VIS spectrometer (Libra S11, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) (Fig. 1, Fig. S1, Table S1). This device was used because manual sampling represents a significant disturbance to the process and a continuous measurement. For this purpose, customized multiport flask caps were used (Fig. S4). More information regarding this system is given in the Online Resource. Two-milliliter samples were collected, and  $OD_{600}$  was measured in a 15-min time interval. To flood the SiPA biosensor with growing cells and for IPTG induction, the measurement was stopped (i.e., data gaps). Samples were frozen at –20 °C.

### Online scattered light shift analysis

Prior to the analysis, the scattered light raw data were median filtered with a running window of  $n = 45$ . The window was aligned backwards since data prediction was not considered for regular online measurement so far. The difference between growth curves of an induced and non-induced culture (“ $\Delta amp$ ”) was defined as the difference of the median filtered scattered light raw data and a linear elongation of the growth phase before induction (Fig. S5). It was assumed that the trend of the growth after induction is also linear because this behavior was observed in the control cultivation without induction.

Since there are small variations of the growth rate between different cultivations, the specific linear elongation (linear function) was preferred to the usage of one control cultivation as methodology. The linear function was determined by two points; one point within the early growth phase (yellow dot), the second localized shortly before induction (yellow square). The linear function was shifted to run through the first point after induction (green diamond) due to the small disturbance caused by the stop of the shaking. This disturbance leads to a marginal lower signal which would cause a negative  $\Delta amp$  at the initial stage of the production phase.  $\Delta amp$  was subsequently calculated by subtraction of the filtered scattered light signal and the linear function.  $\Delta amp$  was correlated with the IB concentration (section “Protein quantification”).

### Flow cytometry

Samples of the culture were taken with their  $OD_{600}$  adjusted to approx. 0.02 with PBS to provide 200–1000 events per second. To distinguish cells from debris, cells were stained with 10  $\mu\text{L mL}^{-1}$  SYBR® Green I (10,000 $\times$ , Molecular Probes®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) solution for 20 min at 37 °C in a thermomixer at 600 rpm (Eppendorf AG, Hamburg, Germany (Epd)). The cells stained were washed and resuspended in PBS. Samples were analyzed by Epics® XL-MCL™ (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) using an air-cooled 488-nm argon ion laser. Cell population was discriminated by the SYBR Green signal, which was collected by a 525/40 band pass filter. A total of 20,000 events were analyzed per sample. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were calculated with the software WinMDI 2.9 (J. Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA).



Measurement parameters (signal, volts, gain, signal amplification): FS, 1000, 10, 40; SS, 1000, 100, 400; FL1, 767, 1. Discriminators FL1: 20.

## Protein quantification

### Cell disruption and quantitative SDS-PAGE

Cells were normalized to  $OD_{600} = 3$  according to Eq. 1. The calculated sample volume was transferred into a 1.5-mL reaction tube and centrifuged at  $21,000 \times g$  for 5 min. The pellet was washed once with PBS, and 500  $\mu$ L of lysis buffer was added to the pellet which was resuspended subsequently. The samples were treated by an ultrasonic probe (Labsonic® M, SaR) performing 3 cycles (100 % at 0.6 Hz) for 1.5 min undergoing a 20-min pause between the cycles. The samples were liquid cooled to 4 °C. Afterwards, the samples were incubated in a thermomixer (Epd) at 27 °C for 30 min while shaking at 1000 rpm. The samples were cooled on ice for 20 min and centrifuged at  $21,000 \times g$  for 7 min. The supernatant was used for analysis of the soluble protein fraction. The pellet was washed once with 1 mL washing buffer. All working steps were performed at 4 °C. The pellet was resuspended in 200  $\mu$ L of Laemmli buffer and incubated in a thermomixer (1000 rpm) at 95 °C for 10 min. Supernatants were diluted (1:2) with Laemmli buffer and incubated at 95 °C just as the samples. Different concentrations of bovine serum albumin (BSA) were used for calibration (stated on the gels). The BSA standards were treated like the supernatants. Detailed information concerning loading and scanning are given in the Online Resource.

$$V_{\text{sample}}^*(t_i) = V_{\text{disruption}} \cdot \frac{OD_{\text{normalized}}}{OD_{t_i, \text{measured}}}$$

\*V = volume

### Densitometry and protein concentration

Densitometry was performed with ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) as shown in Figure S6. For a reproducible area determination, a constant rectangular size was used rigorously (200 × 105 px). Calibration and samples were analyzed in a separate lane sequence. For preparative error estimation (Eq. 6), the calibration was loaded on each gel and selected time points (every 2nd sample after induction) of the samples to be analyzed were loaded again on a second gel. The second gel corresponded technically to the same PAGE run. In addition, densitometrical area determination was carried out twice for software error estimation (Eq. 7) delivering a data set as follows:  $area1_{\text{gel1}}$ ,  $area2_{\text{gel1}}$ ,  $area1_{\text{gel2}}$ ,  $area2_{\text{gel2}}$ . BSA calibrations were fitted using second grade

polynomial or Bleasdale-Nelder (BN) function (Eq. 2) (Bleasdale and Nelder 1960) within the software Origin® 8.5.1 (OriginLab Corp., Northampton, UK). Mean values of BSA band areas on two different gels were used for calibration data fitting. Mean values of each sample data set (see above) were used for sample concentration calculation. Sample concentrations were calculated according to Eq. 3 (for polynomial) and Eq. 4 (for BN), respectively. Normalization, lysis volume, and dilution with Laemmli buffer were considered in the calculation of the protein concentration per volume culture broth (Eq. 5). The received concentrations were subsequently correlated with  $\Delta$ amp values. Error bars in IB concentration plots were determined by calculating the standard deviation of  $area1_{\text{gel1}}$ ,  $area2_{\text{gel1}}$ ,  $area1_{\text{gel2}}$ ,  $area2_{\text{gel2}}$  including preparative (Eq. 6) and software error (Eq. 7). With this value, a protein concentration was calculated the same way as with the samples. Error calculation results are given in Tab. S2.

$$\text{Area}(c_{\text{BSA}}^*, \alpha, \beta, \gamma) = (\alpha + \beta \cdot c_{\text{BSA}})^{\frac{1}{\gamma}} \quad (2)$$

$$c_{\text{protein}}(\text{Area}, \alpha_2, \beta_2, \gamma_2) = -\left(\left(\frac{\text{Area} - \gamma_2}{\alpha_2}\right) + \left(\frac{\beta_2}{2\alpha_2}\right)^2 - \left(\frac{\beta_2}{2\alpha_2}\right)\right)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

$$c_{\text{protein}}(\text{Area}, \alpha_3, \beta_3, \gamma_3) = \frac{(e^{-\ln(\text{Area}) \cdot \gamma_3} - \alpha_3)}{\beta_3} \quad (4)$$

$$c_{\text{protein broth}}(c_{\text{protein}}, \alpha_3, \beta_3, \gamma_3, t_i) = \frac{c_{\text{protein}} \cdot OD_{t_i, \text{measured}}}{\left(2 \cdot \frac{V_{\text{disruption}}}{V_{\text{Laemmli}}}\right) \cdot OD_{\text{normalized}}} \quad (5)$$

Error (SDS-PAGE) [%]

$$= \frac{\text{Stdev.S}(\text{Mean}(area1_{\text{gel1}}; area2_{\text{gel1}}); \text{Mean}(area1_{\text{gel2}}; area2_{\text{gel2}}))}{\text{Mean}(area1_{\text{gel1}}; area2_{\text{gel1}}; area1_{\text{gel2}}; area2_{\text{gel2}})} \cdot 100 \quad (6)$$

$$\text{Error1}(\text{ImageJ}) = \frac{\text{Stdev.S}(area1_{\text{gel1}}; area2_{\text{gel1}})}{\text{Mean}(area1_{\text{gel1}}; area2_{\text{gel1}})} \cdot 100 \quad (7)$$

$$\text{Error2}(\text{ImageJ}) = \frac{\text{Stdev.S}(area2_{\text{gel2}}; area2_{\text{gel2}})}{\text{Mean}(area2_{\text{gel2}}; area2_{\text{gel2}})} \cdot 100$$

\*c = concentration.

## Results

### Online 180° scattered light analysis and flow cytometry analysis for inclusion body detection

Two different strains of *E. coli* BL21 (DE3) producing GFP-GST and human leukemia inhibitory factor (hLIF), respectively, were tested regarding online scattered light during inclusion body formation. The latter was investigated in more detail by additional methods, i.e., offline FSC/SCC, HRSEM, and EOT measurement in defined medium. The online scattered light measurement during cultivation of *E. coli*

BL21 (DE3) producing GFP-GST in TB medium exhibited a characteristic bend approx. 10 min after induction with IPTG. In comparison with a non-induced control, it was apparent that an additional scattered light signal ( $\Delta$ amp) was caused in consequence of the induction (Fig. 2). The accumulation of inclusion bodies could be proved by growth normalized SDS-PAGE of the insoluble fraction (Fig. S7), while the plot of  $\Delta$ amp and IB concentration showed a linear correlation up to  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. S8). A temporary bend which also occurred in the control cultivation 6.75 h after inoculation could be referred to a stop in medium acidification and was not associated to the induction (Fig. S13). The same effect was observed during production of hLIF in ZYP-31, which was successfully reproduced in three *E. coli* BL21 cultivations (ID 150708–150710). Cultivation 150708 and a control (ID 150714) were presented by relevant measurements in Fig. 3 a, b. The course of the scattered light bend showed to be linear within the first 1.5 h of protein production while heading towards saturation after 2 h. The maximum  $\Delta$ amp values of all three cultivations were comparable and ranged between 27, 500 and 30,000 rel. AU. Towards the end of the protein production phase,  $\Delta$ amp was observed to decrease 8.8 h after inoculation. Very close to that event, an increase of DO from 0 to 43 % (ID 150708–150709) and 0 % to 25 % (ID 150710) was measured online (Fig. S9). The measurement of  $\Delta$ amp was verified with an established measurement method, i.e., SSC and FSC measurement. While SSC was increasing up to two-folds, FSC did not change significantly in the context of induction (Fig. 3 a, b). SDS-PAGE gels confirmed that a majority of the insoluble protein fraction was composed of IB, while no detectable concentration of soluble hLIF was found in the supernatant during cultivation at  $37^\circ\text{C}$  (Fig. 4). A total of  $160\text{--}170 \text{ mg L}^{-1}$  of insoluble hLIF was reached in the cultivation broth 2.5 h after induction (Fig. 3 a). A linear

correlation between the increases of  $\Delta$ amp and IB concentration could be revealed up to  $160 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 5 a), whereas the correlation of SSC and IB was observed to be less significant in terms of a linearity within the investigated calibration range (Fig. 5 b). Regarding lower IB concentrations, a coefficient of determination of  $r = 0.99$  was determined for the cultivation 150710 in the range of  $0\text{--}125 \text{ mg L}^{-1}$  hLIF.

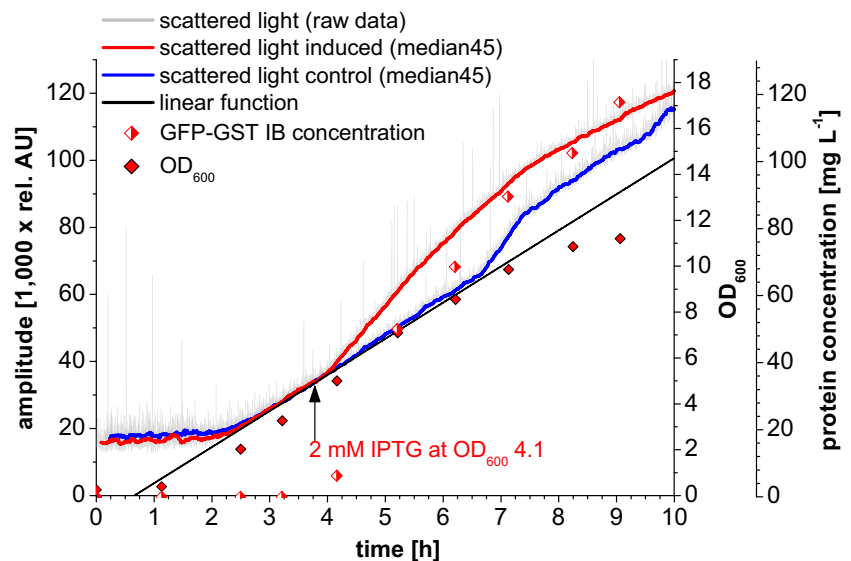
### Online $180^\circ$ scattered light analysis controls

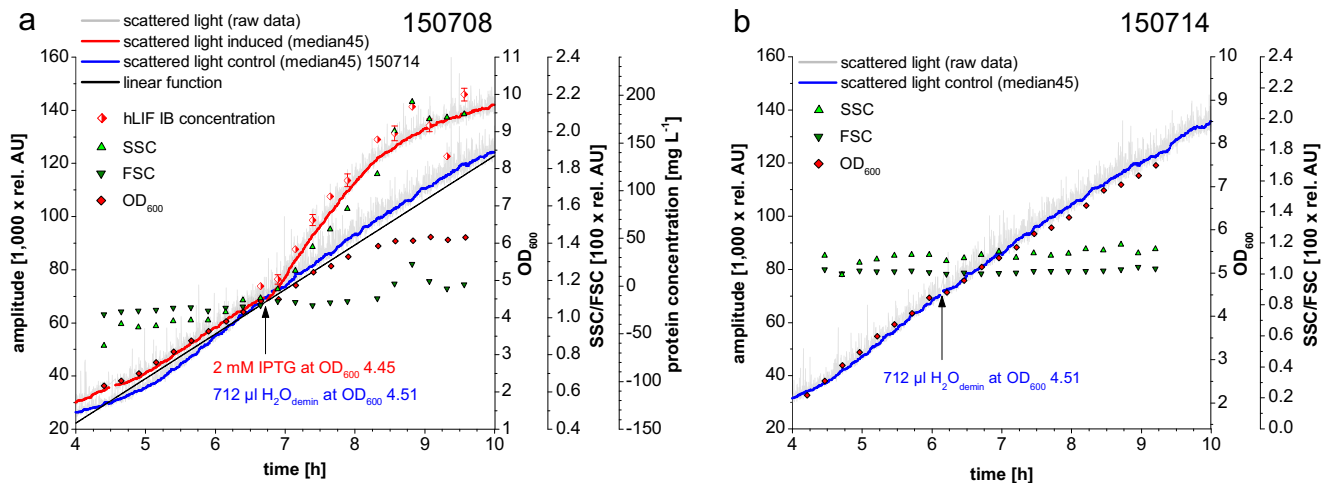
Different controls were performed to examine effects which could have influenced the online scattered light measurement. (1) The same fraction volume of demineralized water ( $300\text{--}800 \mu\text{L}$ , depending on the present culture volume) was injected instead of IPTG (Fig. 3b). No bend of the signal was observed. (2)  $\text{OD}_{600}$  was measured in a 15-min interval before and after induction while no increase in growth rate could be stated after the induction (Fig. 2, Fig. 3a, b). Additionally, it could be noticed that 2 h after induction,  $\text{OD}_{600}$  was constant while scattered light was still slightly increasing (Fig. 3a, b). (3) Automatic addition of IPTG (final conc. =  $2 \text{ mM}$ , via syringe pump and capillary inlet) without automatic sampling was applied to a non-recombinant *E. coli* BL21 culture. No bend in scattered light signal occurred after IPTG addition (Fig. S14). (4) Automatic addition of IPTG without automatic sampling was applied to the strain *E. coli* BL21(DE3) producing hLIF. This led to the already described bend as well (Fig. S15).

### Analysis of morphological changes during protein overexpression using HRSEM

Populations of induced and non-induced *E. coli* cells of the cultivation ID 150710 were immobilized onto  $\text{SiO}_2$  wafers for

**Fig. 2** Scattered light bend occurring after induction with IPTG during a cultivation of *E. coli* BL21(DE3) producing GFP-GST in TB-medium at  $37^\circ\text{C}$  (ID 140115). The control (ID 140108) was time shifted  $+0.15 \text{ h}$  specifically to enable a direct comparison





**Fig. 3** Scattered light bend occurring after induction with IPTG during a cultivation of *E. coli* BL21(DE3) producing hLIF (a) in defined medium ZYP-31 at 37 °C. Control without induction (b). SSC, FSC, OD<sub>600</sub> measurement, and IB concentration for the induced cultivations is shown

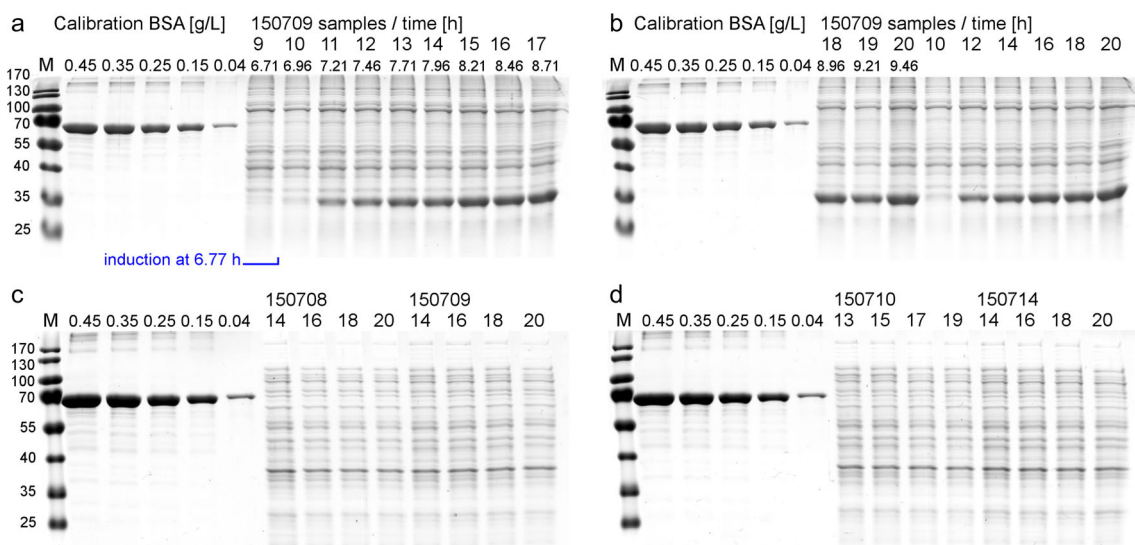
in the plot a. The first three parameters are shown for the control separately (b). The control 150714 was time shifted specifically to enable a direct comparison as follows: ID 150708 + 0.65 h

studying possible alterations in cell morphology. HRSEM images presented in Fig. 6 reveal significant alterations in the morphology of the cells in comparison to the control. The surface of the induced cells appears dented with some swelling at the poles. It should be noted that only a small portion (<3 %,  $n = 72$ ) of these cells retained their original morphology. In contrast, the non-induced cells maintained their typical rod shape, while few irregular cells were observed among the non-induced cells (~4 %,  $n = 123$ ). The measurement of cell dimensions, based on analyzing HRSEM images, shows that the induced cells were significantly wider compared to non-induced cells (Table 2). In contrast, the mean cell length of septated cells did not change significantly. Elongated non-septated cells were found in both control (non-induced)

and induced cultures (Fig. S10). Samples taken during cultivation and visualized by light microscopy also confirmed the presence of abnormal elongated cells before induction (Fig. S11).

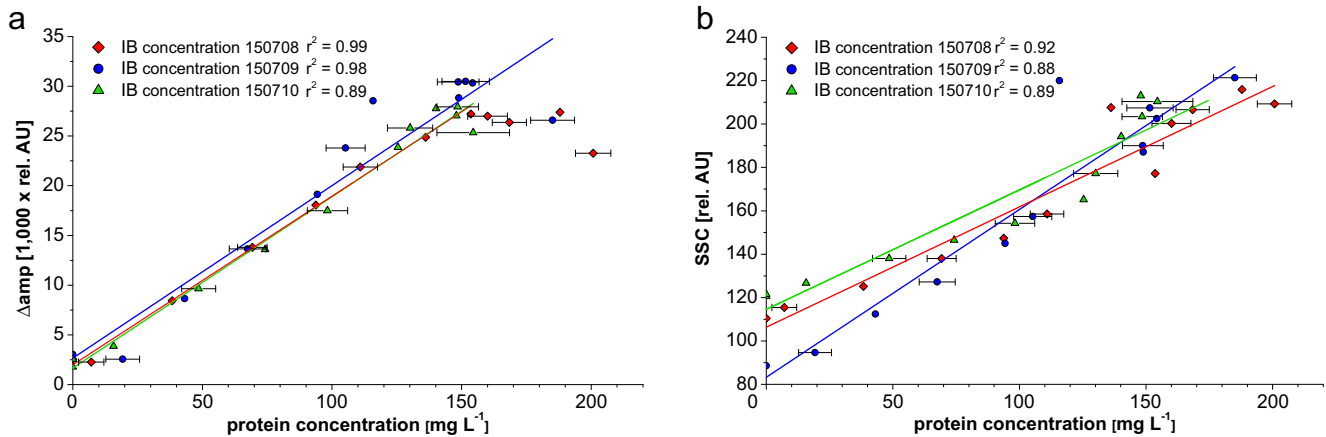
#### RIFTS analysis of porous SiPA optical biosensors

The EOT data is presented starting from the introduction time point of bacterial suspension onto the SiPA. Figure 7a depicts the change of the EOT as function of time in a representative experiment. Figure 7b shows a section of the SiPA with *E. coli* cells residing inside the pores. Thirty minutes after the IPTG induction point, the rate of EOT change is observed to up-swing and deflect from the trend line associated with



**Fig. 4** hLIF (34 kDa) production in *E. coli* BL21(DE3). An example of a SDS-PAGE gel of the insoluble protein fraction belonging to the cultivation 150709 samples  $t_9$ - $t_{17}$  (a), samples  $t_{18}$ - $t_{20}$  (b), and a second

loading of selected samples. Soluble protein fraction of selected samples belonging to the cultivations ID 150709-150714 (c, d)



**Fig. 5** Correlation of  $\Delta\text{amp}$  and IB concentration (a), along with SSC and IB concentration (b) during hLIF production in *E. coli* BL21(DE3) grown in defined medium ZYP-31 at 37 °C

non-induced control culture. After 3 h cultivation, the extent of difference between  $\Delta\text{EOT}$  of induced and control cultures reached  $\sim 10$  nm, representing a major alteration in the optical properties of the bacterial cells (Fig. 7a).

## Discussion

### Online 180° scattered light analysis, flow cytometry analysis for inclusion body detection

One key goal of this investigation was to find a simple optical method to monitor the formation of IB online for shake flask cultivations. During the performed experiments, a significant scattered light signal shift ( $\Delta\text{amp}$ ) was observed in consequence of induction under conditions in which IB are preferentially produced. The temporal match in the course of  $\Delta\text{amp}$  and SSC indicates that  $\Delta\text{amp}$  is very likely to be correlated to a change in cell optical properties. More considerable technical factors which could have led to a signal shift were excluded by the controls. The increase of IB concentration based on densitometric determination is also supporting the results of online scattered light and SSC. The possibility of the formation of cell clusters which could have caused the increase in  $\Delta\text{amp}$  is not consistent with the observed constant FSC since it is known to increase in the case of cell cluster formation (Neumeyer et al. 2013). Flow cytometric analyses to detect IB *in vivo* were applied by different authors in combination with unspecific DNA and protein staining (Lewis et al. 2004; Medwid et al. 2007). The use of unspecific DNA and/or protein staining in order to discriminate cells from background and cell debris was also required in this study using flow cytometers of the same manufacturer. While Wittrup et al. (1988) also reported the IB associated increase of right angle light scattering (RALS) without using fluorescent dyes,

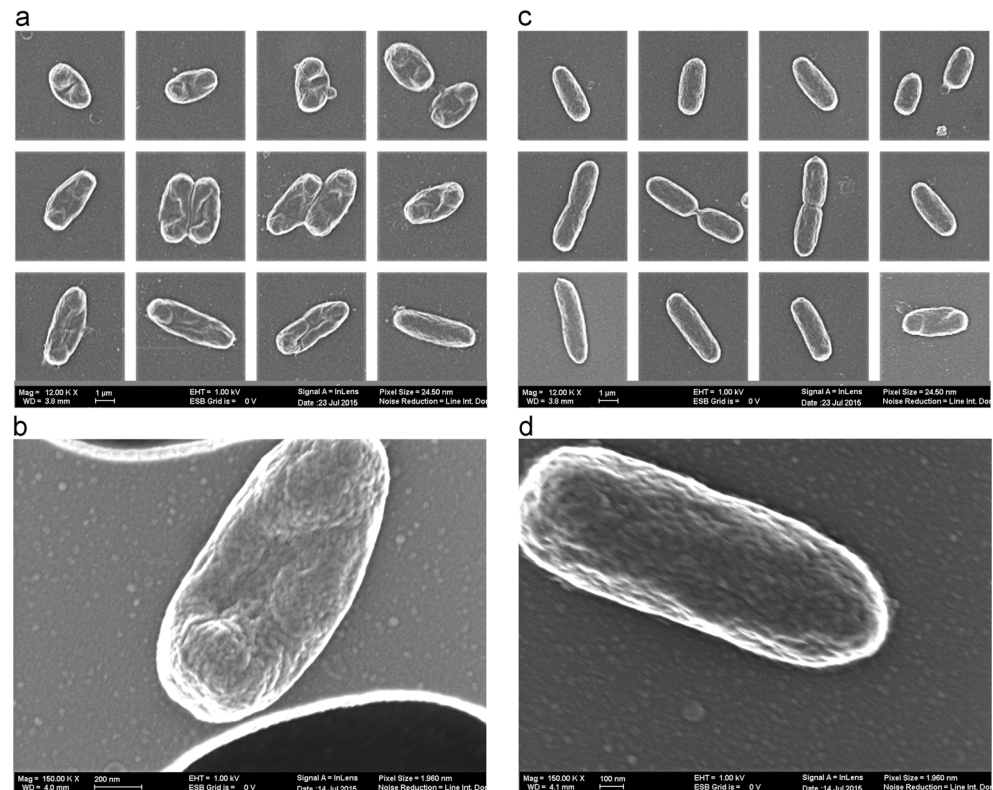
other authors negated this possibility (Medwid et al. 2007; Wällberg et al. 2005).

The aforementioned decrease of  $\Delta\text{amp}$  8.8 h after inoculation is very likely due to a slowdown in growth proved by  $\text{OD}_{600}$  measurement (“metabolic burden”) (Hoffmann and Rinas 2004). The growth saturation was also monitored indirectly by online DO measurement which showed an increase in the moment of signal saturation. This slowdown is relevant for data interpretation because the sensor does not discriminate between increasing scattered light caused by proliferation and changes in the optical properties of cells. Therefore, an appropriate reference for  $\Delta\text{amp}$  determination would not be a linear function but a “saturating” function in this case. So far, it was not possible to predict the growth behavior online with only one scattered light channel during IB formation. Nevertheless, the point of DO increase could be used as hint whether the estimation of IB concentration is still valid or not. In the context of online monitoring, it would be possible to automatize the described process presented in the section “Online scattered light shift analysis.” In this, a predefined function type (e.g., linear, polynomial) would be adapted continuously to the growth curve using an online algorithm (Nadungodage et al. 2011). The obligatory optimization algorithm to minimize least squares could be a simplex- or PSO (particle swarm optimization)-algorithm (Gálvez and Iglesias 2011). The type of function should be selected according to the growth curve determined in a previous control cultivation.

### Online 180° scattered light analysis controls

(1) The addition of demineralized water instead of IPTG disproved the assumption that, e.g., the intake of additional oxygen (by the liquid) during an oxygen-limited phase of the cultivation may have caused an increase in growth rate. Furthermore, it was shown that neither a short stop of the shaker (approx. 2 min) nor the sampling process was causing a signal bend. (2) At-line measurement of  $\text{OD}_{600}$  proved that

**Fig. 6** SEM analysis of induced (3 h after induction) and non-induced *E. coli* BL21(DE3) cells producing hLIF. Example of 13 induced (a–b) and non-induced (c–d) cells immobilized on the top section of the silicon wafer



no increase of the growth rate took place after the induction. (3) 2 mM IPTG did not directly influence the growth behavior of the strain *E. coli* BL21. The non-toxic properties of IPTG at low concentrations were also reported by Lewis et al. (2004). (4) The bend of scattered light shortly after induction which was measured in the absence of sampling showed that this effect was not caused by the sampling process itself.

#### Analysis of morphological changes during protein overexpression using HRSEM

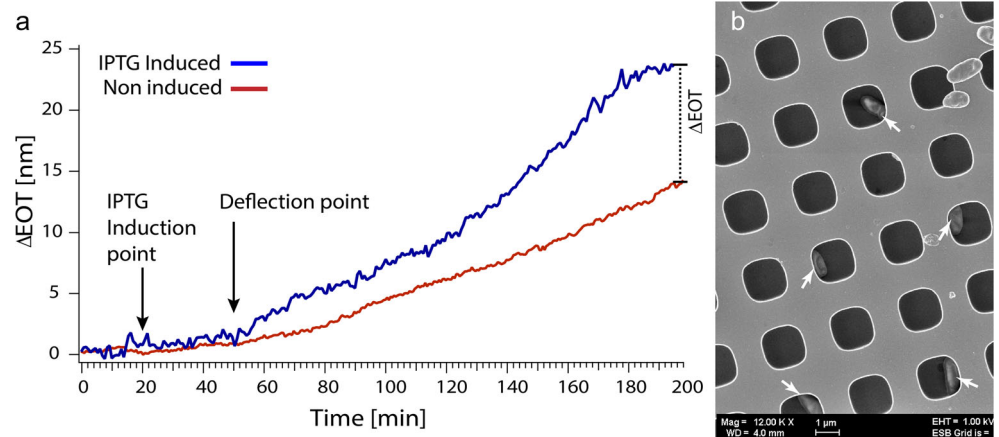
The observed morphological changes can be considered to relate with the increase of  $\Delta_{amp}$  and SSC alongside with the increase of intracellular IB concentration. Alterations of cell morphology during overexpression of proteins were little investigated in the literature regarding *E. coli*. Nevertheless, different authors reported changes during the production of specific proteins. These changes comprise a slight increase in cell size (Castellanos-Mendoza et al. 2014), a larger fraction of non-dividing cells (Kyle et al. 2012), spherical cell formation (Fioroni et al. 2014), and elongated non-septated cells (Gubellini et al. 2011; Kyle et al. 2012). Apart from

SDS-PAGE gels, the existence of intracellular IB could be supported by solid chunks arising from cells in which the turgor was completely collapsed, primarily found at the cell poles (Fig. S12). The same effect was already illustrated in HRSEM pictures of *E. coli* housing IB of HCcp3 which forms aggregates with the genomic DNA (Sun et al. 2013). The observed rubber boat-like cell shapes also correspond to the localization of IB found in literature, like the A $\beta$ 40 peptide determined via thioflavin-S staining (Espargaró et al. 2012). The deformation of the cells following their induction is suspected to be associated with physiological stress caused by the IB overexpression (Hoffmann and Rinas 2004; Gubellini et al. 2011). This stress may compromise the integrity of the cell wall, as several cells exhibit cytoplasm leakage while some completely collapsed (Fig. S12). Similar visual consequences were reported after intentional damage of *E. coli*'s cell wall using oil terpenes (Zengin and Baysal 2014). Regarding the interpretation of the determined cell dimensions, these collapsed cells could simulate the increase in cell width because of the flattening of the cell body on the surface of the SiPA biosensor. Some evidence for a constant cell size is given by a steady FSC signal (Hewitt and

**Table 2** Apparent cell sizes of non-induced and induced hLIF producing cells of *E. coli* BL21 (DE3), as determined by SEM

	Non-induced bacteria ( $n = 100$ )	Induced bacteria ( $n = 70$ )
Mean length (nm)	$1327.8 \pm 261.4$	$1371.6 \pm 233.5$
Mean width (nm)	$481.1 \pm 43.7$	$671.3 \pm 56.2$

**Fig. 7**  $\Delta$ EOT plotted as function of time, for control culture and for IPTG induced culture (a). Representative SEM image of SiPA after 3 h experiment (b). White arrows indicate *E. coli* cells trapped inside the porous array



Nebe-Von-Caron 2004) and a constant FSC coefficient of variation (CV) during the complete cultivation (data not shown). This statement is based on the effect of the FSC CV to decrease when cells become more spheroidal (e.g., due to protein accumulation). The observed cell elongation is typically caused by mutants lacking in certain penicillin-binding proteins (PBP) in the presence of  $\beta$ -lactam antibiotics (Laubacher et al. 2013; Nelson and Young 2000; Rolinson 1980). Due to the existence of elongated non-septated cells before induction, there is no evidence to associate cell elongation with the formation of IB after induction. In summary, we suggest that IB concentration and cell shape are potential parameters responsible for causing the increase in  $\Delta$ amp and SSC. The increase of SSC or rather right angle light scatter (RALS) in consequence of an increasing intracellular concentration of IB was observed before by Wittrup et al. (1988). In this study, RALS was also given as explanation using the proteins VGH1 and VGH2 in opposition to a cell size increase. A more profound analysis of the cell size or bio-volume course during process could be realized by impedance measurement in addition to scattered light measurement (Kubitschek and Friske 1986; Wu et al. 2012).

#### RIFTS analysis of porous SiPA optical biosensors

Data in Fig. 7a suggest that bacteria induced for producing IB have a higher cellular RI compared to non-induced cells (control). Furthermore, if we consider that the proliferation rate of IB-producing cells is somewhat compromised relative to the control cells then the actual contribution of the IB to the cells' RI may be higher. The increase in bacterium cellular RI is attributed to the formation of IB, as the latter consist of tightly packed protein molecules forming a dense matter. The RI of condensed proteins was reported to increase by the ratio  $dn = 0.19 dC$  where  $n$  is the RI and  $C$  is protein concentration ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) (Margreiter et al. 2008; Crisman and Randolph 2009). Hence, we suggest that in control cultures, the gradual rise in EOT is exclusively caused by bacteria proliferation,

while for bacteria producing IB, the more profound EOT increase is ascribed to the formation of highly dense protein aggregates within the cells.

In this work, we demonstrate that online measurement of  $180^\circ$  scattered light in shake flasks allows monitoring of changes in the optical properties of *E. coli* cells, associated with the formation of inclusion bodies (IB) of GFP-GST and hLIF. A reproducible linear correlation between the IB concentration and a shift ( $\Delta$ amp) in scattered light signal intensity was observed during protein production. These findings were supported by a significant increase in SSC starting shortly after induction using flow cytometry. Changes in cell shape going along with physiological stress caused by protein overexpression were also observed in this context. This parameter could be jointly responsible for the increasing shift in scattered light. Thus, further investigations should focus on the ability of the sensor to discriminate between interior structures and cell shape. A further advance in the development of this specific multisensor platform for shake flask cultivations is present in the integration of additional optical channels like near infrared (NIR) and UV-A. As NIR reflectance measurement is less sensitive to absorption of light by medium compounds and cytoplasm, changes in cell wall topology or intracellular complexity could be identified more effectively comparing the signal of different channels. We also present an additional novel approach for rapid screening and characterizing technique of sampled cell population for IB formation. Bacteria cells residing within SiPA are monitored in real time via RIFTS and upon IB induction. These studies reveal that the measured EOT is highly sensitive to the induction of IB; within 30 min post-induction, a significant increase in the EOT is observed in comparison to control cells (non-induced). This behavior is ascribed to the increase of the cellular RI during the formation of the highly packed protein domains within the cells. The advantages of photonic arrays for bacteria cell studies offer access to a rarely used but insightful cellular property, i.e., the RI, thus introducing a fundamental contribution to the study of intracellular bacterial processes. Optical methods for

online monitoring of IB production are presented that can speed up process development and parameter optimization for recombinant protein production industry, therefore facilitating many screening processes.

**Acknowledgments** We would like to thank all members of our research groups for providing feedback and suggestions. This work was partially supported by the Russell Berrie Nanotechnology Institute (RBNI) and the Lorry I. Lokey Interdisciplinary Center for Life Sciences and Engineering (LS&E). SiPA samples were prepared at the Micro-Nano Fabrication Unit (MNFU), Technion.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Human and animal rights** No research involving human participants and/or animals was carried out.

**Funding** This study was supported by the Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie via Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen “Otto von Guericke” e. V. within the Zentrale Innovationsoffensive Mittelstand-initiative. Additional funding for this study was provided by the Deutsche Technion-Gesellschaft.

**Consent to submit** The authors declare that they agree each with submission of this manuscript. The authors declare that the manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

## References

- Ami D, Natalello A, Taylor G, Tonon G, Maria Doglia S (2006) Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta BBA—Proteins Proteomics* 1764:793–799. doi:10.1016/j.bbapap.2005.12.005
- Bleasdale JKA, Nelder JA (1960) Plant population and crop yield. *Nature* 188:342–342. doi:10.1038/188342a0
- Castellanos-Mendoza A, Castro-Acosta RM, Olvera A, Zavala G, Mendoza-Vera M, Garcia-Hernández E, Alagón A, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA (2014) Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories* 13:137. doi:10.1186/s12934-014-0137-9
- Crisman RL, Randolph TW (2009) Refolding of proteins from inclusion bodies is favored by a diminished hydrophobic effect at elevated pressures. *Biotechnol Bioeng* 102:483–492. doi:10.1002/bit.22082
- Drezek R, Dunn A, Richards-Kortum R (1999) Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements. *Appl Opt* 38:3651. doi:10.1364/AO.38.003651
- Espargaró A, Sabate R, Ventura S (2012) Thioflavin-S staining coupled to flow cytometry. A screening tool to detect *in vivo* protein aggregation. *Mol Biosyst* 8:2839. doi:10.1039/c2mb25214g
- Fioroni M, Dworeck T, Rodriguez-Ropero F (2014)  $\beta$ -barrel channel proteins as tools in nanotechnology. Springer Netherlands, Dordrecht
- Gálvez A, Iglesias A (2011) Efficient particle swarm optimization approach for data fitting with free knot-splines. *Comput Aided Des* 43:1683–1692. doi:10.1016/j.cad.2011.07.010
- Gubellini F, Verdon G, Karpowich NK, Luff JD, Boel G, Gauthier N, Handelman SK, Ades SE, Hunt JF (2011) Physiological response to membrane protein overexpression in *E. coli*. *Mol Cell Proteomics* 10:M111.007930–M111.007930. doi:10.1074/mcp.M111.007930
- Hedhammar M, Stenvall M, Lönneborg R, Nord O, Sjölin O, Brismar H, Uhlén M, Ottosson J, Hober S (2005) A novel flow cytometry-based method for analysis of expression levels in *Escherichia coli*, giving information about precipitated and soluble protein. *J Biotechnol* 119:133–146. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.03.024
- Hewitt CJ, Nebe-Von-Caron G (2004) The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. In: *Physiological stress responses in bioprocesses*. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 197–223
- Hoffmann F, Rinas U (2004) Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. In: *Physiological stress responses in bioprocesses*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 73–92
- Ignatova Z, Gierasch LM (2004) Monitoring protein stability and aggregation *in vivo* by real-time fluorescent labeling. *Proc Natl Acad Sci* 101:523–528. doi:10.1073/pnas.0304533101
- Jones JJ, Bridges AM, Fosberry AP, Gardner S, Lowers RR, Newby RR, James PJ, Hall RM, Jenkins O (2004) Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. *J Biotechnol* 109:201–211. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.039
- Kensy F, Zang E, Faulhammer C, Tan R-K, Büchs J (2009) Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microb Cell Factories* 8:31. doi:10.1186/1475-2859-8-31
- Kraft M, Knüpfer U, Wenderoth R, Pietschmann P, Hock B, Horn U (2007) An online monitoring system based on a synthetic sigma32-dependent tandem promoter for visualization of insoluble proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:397–406. doi:10.1007/s00253-006-0815-6
- Kubitschek HE, Friske JA (1986) Determination of bacterial cell volume with the Coulter Counter. *J Bacteriol* 168:1466–1467
- Kyle S, James KAR, McPherson MJ (2012) Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microb Cell Factories* 11:28. doi:10.1186/1475-2859-11-28
- Laubacher ME, Melquist AL, Chandramohan L, Young KD (2013) Cell sorting enriches *Escherichia coli* mutants that rely on peptidoglycan endopeptidases to suppress highly aberrant morphologies. *J Bacteriol* 195:855–866. doi:10.1128/JB.01450-12
- Lewis G, Taylor IW, Nienow AW, Hewitt CJ (2004) The application of multi-parameter flow cytometry to the study of recombinant *Escherichia coli* batch fermentation processes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31:311–322. doi:10.1007/s10295-004-0151-8
- Li Z, Kessler W, van den Heuvel J, Rinas U (2011) Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:1203–1213. doi:10.1007/s00253-011-3407-z
- Margreiter G, Messner P, Caldwell KD, Bayer K (2008) Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *J Biotechnol* 138:67–73. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.07.1995
- Massad-Ivanir N, Mirsky Y, Nahor A, Edrei E, Bonanno-Young LM, Ben Dov N, Sa'ar A, Segal E (2014) Trap and track: designing self-reporting porous Si photonic crystals for rapid bacteria detection. *Analyst* 139:3885. doi:10.1039/C4AN00364K
- Medwid R, Krebs L, Welch S (2007) Evaluation of *Escherichia coli* cell disruption and inclusion body release using nucleic acid binding fluorochromes and flow cytometry. *Biotechniques* 43:777–782. doi:10.2144/000112621
- Mirsky Y, Nahor A, Edrei E, Massad-Ivanir N, Bonanno LM, Segal E, Sa'ar A (2013) Optical biosensing of bacteria and cells using porous silicon based, photonic lamellar gratings. *Appl Phys Lett* 103:033702. doi:10.1063/1.4813740

- Nadungodage CH, Xia Y, Li F, Lee JJ, Ge J (2011) StreamFitter: a real time linear regression analysis system for continuous data streams. In: Yu JX, Kim MH, Unland R (eds) Database Systems for advanced applications. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 458–461
- Nelson DE, Young KD (2000) Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*. J Bacteriol 182:1714–1721. doi:10.1128/JB.182.6.1714-1721.2000
- Nemecek S, Marisch K, Juric R, Bayer K (2008) Design of transcriptional fusions of stress sensitive promoters and GFP to monitor the overburden of *Escherichia coli* hosts during recombinant protein production. Bioprocess Biosyst Eng 31:47–53. doi:10.1007/s00449-007-0143-y
- Neumeyer A, Hübschmann T, Müller S, Frunzke J (2013) Monitoring of population dynamics of *Corynebacterium glutamicum* by multiparameter flow cytometry: population dynamics of *Corynebacterium glutamicum*. Microb Biotechnol 6:157–167. doi:10.1111/1751-7915.12018
- Patkar A, Vijayasankaran N, Urry DW, Srienc F (2002) Flow cytometry as a useful tool for process development: rapid evaluation of expression systems. J Biotechnol 93:217–229
- Rolinson GN (1980) Effect of beta-lactam antibiotics on bacterial cell growth rate. J Gen Microbiol 120:317–323
- Schmidt-Hager J, Ude C, Findeis M, John GT, Scheper T, Beutel S (2014) Non-invasive online biomass detector system for cultivation in shake flasks. Eng Life Sci. doi:10.1002/elsc.201400026
- Sun S, Liu M, Dong F, Fan S, Yao Y (2013) A histone-like protein induces plasmid DNA to form liquid crystals in vitro and gene compaction in vivo. Int J Mol Sci 14:23842–23857. doi:10.3390/ijms141223842
- Tomala M, Lavrentieva A, Moretti P, Rinas U, Kasper C, Stahl F, Schambach A, Warlich E, Martin U, Cantz T, Scheper T (2010) Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner. Protein Expr Purif 73:51–57. doi:10.1016/j.pep.2010.04.002
- Ude C, Schmidt-Hager J, Findeis M, John GT, Scheper T, Beutel S (2014) Application of an online-biomass sensor in an optical multisensory platform prototype for growth monitoring of biotechnical relevant microorganism and cell lines in single-use shake flasks. Sensors 14: 17390–17405. doi:10.3390/s140917390
- Upadhyay P, Patra A, Mukhopadhyay R, Panda A (2001) Real time detection and quantification of inclusion bodies expressed in *Escherichia coli* by impedance measurements. Biotechnol Lett 23: 839–843. doi:10.1023/A:1010550015147
- Wällberg F, Sundström H, Ledung E, Hewitt CJ, Enfors S-O (2005) Monitoring and quantification of inclusion body formation in *Escherichia coli* by multi-parameter flow cytometry. Biotechnol Lett 27:919–926. doi:10.1007/s10529-005-7184-6
- Wittrup KD, Mann MB, Fenton DM, Tsai LB, Bailey JE (1988) Single-cell light scatter as a probe of refractile body formation in recombinant *Escherichia coli*. Nat Biotechnol 6:423–426. doi:10.1038/nbt0488-423
- Wu Y, Benson JD, Almasri M (2012) Micromachined Coulter counter for dynamic impedance study of time sensitive cells. Biomed Microdevices 14:739–750. doi:10.1007/s10544-012-9655-6
- Yablonovitch E (1987) Inhibited spontaneous emission in solid-state physics and electronics. Phys Rev Lett 58:2059–2062. doi:10.1103/PhysRevLett.58.2059
- Zengin H, Baysal A (2014) Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. Molecules 19:17773–17798. doi:10.3390/molecules191117773



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Sensoren bilden das Rückgrat der aktuellen und vierten Industriellen Revolution (Industrie 4.0). Diese Entwicklung zeichnet sich durch einen hohen Informationsbedarf und eine hohe Messdatendichte von chemischen Prozessen und Bioprozessen aus. Die Fähigkeiten des Menschen diverse Prozessgrößen vom Screening im Laboratorium bis hin zum Produktionsmaßstab manuell zu überwachen sind begrenzt. Multisensoren füllen diese Lücke, weil sie in der BPE schon früh viele der notwendigen Prozessgrößen aufzeichnen, offline-Probenahmen teilweise ersetzen und sich die Informationen der Messdaten gegenseitig ergänzen. Die Wahl geeigneter Organismen, Parameter oder Substrate wird so erheblich vereinfacht, während O<sub>2</sub>-Limitierungen, pH-Drifts und Wachstumsstopps von Mikroorganismen schnell erkannt werden. Weiterhin kann der Informationsgehalt eines einzelnen Sensors größer sein als seine eigentliche Bestimmung spezifiziert. So geben Streulichtsensoren auch Veränderungen der Zellmorphologie und der optischen Eigenschaften von Zellen wieder, welche dabei helfen osmotischen Stress oder die Bildung von Protein-/Zellaggregaten online zu überwachen. Aktuelle und zukünftige Entwicklungen zeigen auch, dass das Potential des Menschen komplexe Datensätze simultan zu verarbeiten und ohne zeitlichen Verzug korrekt einzuschätzen heute weitgehend ausgereizt ist. Beispielsweise müssen während eines Prozesses anhand der Masse an gesammelten Messdaten konkrete Aktionen für die Prozesssteuerung abgeleitet werden. Menschliches Versagen wird dadurch statistisch wahrscheinlicher. Bei komplexen Prozessen mit entsprechend vielen voneinander abhängigen Prozessgrößen wird eine adäquate Prozessteuerung nur noch anhand einer kontinuierlichen multivariaten Datenanalyse möglich sein. Sensornetzwerke bestehend aus Sensoren und Aktoren werden dabei stetig kompakter und intelligenter. In der Prototypenentwicklung wird sich auch in den kommenden Jahren der Trend von CNC-gesteuerter Werkzeugmaschinen zu Gunsten additiver Druckverfahren verschieben. 3D-Druck gehört bereits heute zu den führenden Verfah-

ren im Rapid-Prototyping. Im biotechnologischen Laboratorium müssen Materialien sehr speziellen Anforderungen wie Autoklavierbarkeit und S1-Kompatibilität erfüllen. Dabei helfen aktuelle Fortschritte in der Optimierung bereits etablierter Druckprozesse. Insbesondere beim SLS-Verfahren lassen die Parameter (Laserleistung, Strahldurchmesser, Scangeschwindigkeit, Spurabstand, Temperatur des Pulverbetts und Pulverschichtdicke) große Spielräume für einen an spezifische Anforderungen angepassten Druckprozess zu. Bei neuen Druckverfahren ist es weiterhin eine Herausforderung mit dem Druckprozess kompatible Materialien zu finden, die hohe chemische Beständigkeit, hohe Druckauflösung und hervorragende mechanischen Eigenschaften in sich vereinen. Hier werden aktuell verschiedene Harze für das SLA-Verfahren entwickelt, die bis 130 °C beständig sind (Accura<sup>®</sup>PEAK TM, VisiJet<sup>®</sup>SL HiTemp). Abgesehen vom stützenden Gehäuse müssen auch alle aktiven Bauteile den Anforderungen entsprechen. Konkret bedeutet dies, die Autoklavierbarkeit aller flüssigkeitsführender Bauteile zu gewährleisten, wodurch auch die Förderung beliebiger Flüssigkeiten ermöglicht wird. Eine große Herausforderung bestand in dieser Arbeit im fehlenden Schließen der Piezopumpen vor und nach Pumpvorgängen (fluidisch offen), wodurch zusätzliche Magnetventile notwendig wurden. Durch Weiterentwicklung der Pumpen mit synchronisierten, aktiven Piezoventilen sind schwerere Magnetventile mit hohem Energiebedarf nicht mehr notwendig. Um genug Tankvolumen für verschiedene Kolbengrößen zu gewährleisten, können fest eingebaute Tanks durch von außen wechselbare, wiederbefüllbare Kartuschen ersetzt werden. Bei bestimmten Lösungen könnten auch vorsterilisierte Disposables zum Einsatz kommen. Mit kompakten Dosagemodulen ist es auch denkbar die große Herausforderung der  $pO_2$ -Limitierung im Schüttelkolben zu überwinden. Durch gezieltes Dosieren  $O_2$ -speichernder Flüssigkeiten könnte die Sauerstofflimitierung verhindert oder die Anhebung des  $pO_2$  gezielt für spezielle Experimente genutzt werden. Perfluorcarbone wurden bereits zur Erhöhung der Sauerstofftransferrate eingesetzt [24, 118]. Indem  $O_2$ - und  $CO_2$ -Sensorspots in die Innenseite des Verschlusses integriert werden, könnte analog

zu Rührkesselreaktoren der Kopfraum um eine Abgasanalyse erweitert werden. Auf steuerungstechnischer Seite bieten derartige Module weiterhin die Option programmierbare pH-Gradienten und fed-batch-Protokolle auszuführen, sowie eine gezielte Zugabe von speziellen Substraten, Spurenelementen, Wachstumsfaktoren, Induktoren oder Fluoreszenzfarbstoffen in Abhängigkeit der aktuellen Sensordaten (pH, pO<sub>2</sub>, Biomasse) zu programmieren. Stark miniaturisierte Rechner wie Raspberry Pi, Arduino oder Propeller-Parallax haben gezeigt, wie auch einfache Geräte mit Datenverarbeitungsprogrammen und selbstlernenden, adaptiven Steuerungsalgorithmen ausgestattet werden können. Die Dosageeinheit würde dadurch einen autarken Rechner darstellen und könnte unabhängig von einer Basiseinheit Stellglieder ansteuern bzw. Dosagevolumina selbst berechnen („Internet of Things“ [15]). Durch kabellose, plattformunabhängige Funksysteme würde die direkte Kommunikation der einzelnen Einheiten untereinander und mit mobilen Endnutzengeräten wie Laptops, Smartphones oder Pads ermöglicht. Diese Entwicklungen ebnen den Weg in ein zukünftig stärker vernetztes, barrierefreies, interkompatibles Laborumfeld in dem sich kompakte (Multi)-Sensoren, wie Aktoren flexibel an verschiedenste Bioreaktorvarianten anpassen können.

## Literatur

- [1] A. Abe *et al.* (2013). Biocompatibility of nylon resin discs fabricated by selective laser sintering. *Journal of Oral Tissue Engineering*, **11**(1), 42–50.
- [2] K. Allmer Hydrophilization of hydrophobic polymers. Pat., US Patent 5,773,488, eingetragen am 13.04.1995.
- [3] K. B. Anderson *et al.* (2013). A 3D–printed fluidic device that enables integrated features. *Analytical Chemistry*, **85**(12), 5622–5626.
- [4] A. K. Au; W. Lee; A. Folch (2014). Mail-order microfluidics: Evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices. *Lab on a Chip*, **14**(7), 1294–1301.
- [5] A. K. Au *et al.* (2016). 3D-printed microfluidics. *Angewandte Chemie International Edition*, **55**(12), 3862–3881.
- [6] T. Bachinger; P. Mårtensson; C. Mandenius (1998). Estimation of biomass and specific growth rate in a recombinant *Escherichia coli* batch cultivation process using a chemical multisensor array. *Journal of Biotechnology*, **60**(1–2), 55–66.
- [7] R. Bareither; D. Pollard (2010). A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: Current state and future need. *Biotechnology Progress*, **27**(1), 2–14.
- [8] R. Bareither *et al.* (2015). Automated disposable small-scale bioreactor for high-throughput process development: Implementation of the 24 bioreactor array. *Pharmaceutical Bioprocessing*, **3**(3), 185–197.
- [9] I. Bauer *et al.* (2012). Novel single-use sensors for online measurement of glucose. *Bioprocess International*, **10**(8), 56–60.
- [10] J. Büchs (2001). Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, **7**(2), 91–98.
- [11] J. Büchs; F. Kensy; M. Samorski Verfahren und Vorrichtung zur Erfassung von Prozessparametern von Reaktionsflüssigkeiten in mehreren geschüttelten Mikroreaktoren. Pat., EP Patent 1,730,494, eingetragen am 18.03.2005.

- [12] J. Büchs; S. Lotter; C. Milbradt (2001). Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, **7**(2), 135–141.
- [13] J. Büchs *et al.* (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(6), 589–593.
- [14] J. I. Betts; F. Baganz (2006). Miniature bioreactors: Current practices and future opportunities. *Microbial Cell Factories*, **5**(1), 21.
- [15] S. Beutel; P. Lindner; C. Endres (2016). Flexibel, funktionell und digital. *Nachrichten aus der Chemie*, **64**(4), 428–430.
- [16] S. Bhadra *et al.* In *2013 IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference (I2MTC)*, hrsg. von M. Cortner; R. Zoughi, Institute of Electrical & Electronics Engineers (IEEE), Minneapolis, USA, 2013, S. 276–279.
- [17] C. Bähr *et al.* (2012). Dialysis shake flask for effective screening in fed-batch mode. *Biochemical Engineering Journal*, **69**, 182–195.
- [18] C. Blesken *et al.* (2016). The microfluidic bioreactor for a new era of bioprocess development. *Engineering in Life Sciences*, **16**(2), 190–193.
- [19] A. Bonyár *et al.* (2010). 3D Rapid Prototyping Technology (RPT) as a powerful tool in microfluidic development. *Eurosensor XXIV Conference*, **5**(0), 291–294.
- [20] A. Brognaux *et al.* (2012). Direct and indirect use of GFP whole cell biosensors for the assessment of bioprocess performances: Design of milliliter scale-down bioreactors. *American Institute of Chemical Engineers*, **29**(1), 48–59.
- [21] A. Buchenauer *et al.* (2009). Micro-bioreactors for fed-batch fermentations with integrated online monitoring and microfluidic devices. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**(5), 1411–1416.
- [22] J. Chen *et al.* (2015). Microfluidic impedance flow cytometry enabling high-throughput single-cell electrical property characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(5), 9804–9830.

- [23] F. Clementschitsch *et al.* (2005). Sensor combination and chemometric modelling for improved process monitoring in recombinant *E. coli* fed-batch cultivations. *Journal of Biotechnology*, **120**(2), 183–196.
- [24] D. Damiano; S. S. Wang (1985). Novel use of a perfluorocarbon for supplying oxygen to aerobic submerged cultures. *Biotechnology Letters*, **7**(2), 81–86.
- [25] M. Debreczeny Optical sensor for rapid determination of particulate concentration. Pat., US Patent 8,405,033, eingetragen am 29.07.2011.
- [26] C. Demuth (2013). Chemische Sensoren in der Bioprozessanalytik. *Chemie in unserer Zeit*, **48**(1), 60–67.
- [27] A. H. Diercks *et al.* (2009). A microfluidic device for multiplexed protein detection in nano-liter volumes. *Analytical Biochemistry*, **386**(1), 30–35.
- [28] M. Doble (2006). Avoid the pitfalls of bioprocess development. *CEP Magazine*, **102**, 34–41.
- [29] M. A. Duarte-Mermoud; F. A. Rojo; R. Pérez (2002). Experimental evaluation of combined model reference adaptive controller in a pH regulation process. *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*, **16**(2), 85–106.
- [30] W. A. Duetz *et al.* (2000). Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(6), 2641–2646.
- [31] R. Eibl *et al.* (2010). Disposable bioreactors: The current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**(1), 41–49.
- [32] M. Funke *et al.* (2009). The baffled microtiter plate: Increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, **103**(6), 1118–1128.
- [33] M. Funke *et al.* (2010). Microfluidic biolector-microfluidic bioprocess control in microtiter plates. *Biotechnology and Bioengineering*, **107**(3), 497–505.
- [34] F. Garcia-Ochoa; E. Gomez (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, **27**(2), 153–176.

- [35] A. Glindkamp *et al.* In, R. Eibl; D. Eibl, Hrsg.; Springer Berlin Heidelberg, 2010; Kapitel Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends, S. 145–169.
- [36] S. Gnoth *et al.* (2009). Simple adaptive pH control in bioreactors using gain-scheduling methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**(4), 955–964.
- [37] R. Goodridge; C. Tuck; R. Hague (2012). Laser sintering of polyamides and other polymers. *Progress in Materials Science*, **57**(2), 229–267.
- [38] V. Gossain; R. Mirro (2010). Linear scale-up of cell cultures – the next level in disposable bioreactor design. *BioProcess International*, **56**.
- [39] P. Gronemeyer; R. Ditz; J. Strube (2014). Trends in upstream and downstream process development for antibody manufacturing. *Bioengineering*, **1**(4), 188–212.
- [40] S. M. Hamed; G. Klöck (2014). Improvement of medium composition and utilization of mixotrophic cultivation for green and blue green microalgae towards biodiesel production. *Advances in Microbiology*, **4**(3), 167–174.
- [41] S. Hansen *et al.* (2011). Potential errors in conventional DOT measurement techniques in shake flasks and verification using a rotating flexitube optical sensor. *BMC Biotechnology*, **11**(1), 49.
- [42] D. Hebel (2014). Making glass bioreactors CIP and SIP capable. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, **34**(16), 34–35.
- [43] J. Hemmerich *et al.* (2011). Fed-batch cultivation in baffled shake flasks : Option enables the assessment of bioprocesses in early development. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, **31**(14), 52–54.
- [44] C. Herwig; A. Posch (2013). Herausforderungen und Trends für zukünftige Bioprozesse. *Pharmind*, **75**(10), 1688–1694.
- [45] K. Herzog; D. Frank Verfahren, Vorrichtung und System zur automatisierten Bestimmung optischer Dichten oder der Veränderung optischer Dichten von Reaktionsgemischen in geschüttelten Reaktoren. Pat., DE Patent 102,014,001,284, eingetragen am 01.02.2014.
- [46] S. Heux *et al.* (2014). A novel platform for automated high-throughput fluxome profiling of metabolic variants. *Metabolic Engineering*, **25**, 8–19.

- [47] C. J. Hewitt; G. Nebe-Von-Caron: The Application of Multi-Parameter Flow Cytometry to Monitor Individual Microbial Cell Physiological State. in *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*; Springer Science, Business Media, Apr. 2004, S. 197–223.
- [48] M. Hofmann (2014). 3D printing gets a boost and opportunities with polymer materials. *ACS Macro Letters*, **3**(4), 382–386.
- [49] D. Holmes *et al.* (2009). Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry. *Lab Chip*, **9**(20), 2881–2889.
- [50] R. Hortsch (2011). Miniaturisierte Rührreaktoren zur Kultivierung morphologisch veränderlicher Mikroorganismen. Dissertation, Technische Universität München.
- [51] J. Huang *et al.* (2009). Quality by design case study: An integrated multivariate approach to drug product and process development. *International Journal of Pharmaceutics*, **382**(1-2), 23–32.
- [52] K. Iketani *et al.* In *2015 IEEE International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai (IMFEDK)*, hrsg. von Y. Omura, Institute of Electrical & Electronics Engineers (IEEE), Kyoto, Japan, 2015, S. 40–41.
- [53] E. Jamalzadeh *et al.* (2011). pH-dependent uptake of fumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(3), 705–716.
- [54] V. Janakiraman *et al.* (2015). Application of high-throughput mini-bioreactor system for systematic scale-down modeling, process characterization, and control strategy development. *Biotechnology Progress*, **31**(6), 1623–1632.
- [55] N. H. Janzen (2014). Mikrodosiertchnik und Mikrosensoren zur pH-Kontrolle in Parallelbioreaktoren. Dissertation, Technischen Universität München.
- [56] M. Jeude *et al.* (2006). Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotechnology and Bioengineering*, **95**(3), 433–445.
- [57] H. Jiang *et al.* (2015). Recent advances in electronic nose techniques for monitoring of fermentation process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**(12), 1845–1852.



- [58] G. T. John *et al.* (2003). Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: A novel tool for microbial cultivation. *Biotechnology and Bioengineering*, **81**(7), 829–836.
- [59] M. Johnson (1952). Recent advances in penicillin fermentation. *Bulletin of the World Health Organization*, **6**(1-2), 99–121.
- [60] S. Junk; M. Tränkle in *Proceedings of the 18th International Conference on Engineering Design (ICED 11)*, hrsg. von S. Culley. *et al.* Lyngby/Copenhagen, Denmark, 2011; Bd. 5, S. 12–18.
- [61] F. Kensy *et al.* (2009). Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microbial Cell Factories*, **8**(1), 31.
- [62] P. J. Kitson *et al.* (2012). Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic ‘lab on a chip’ reactionware devices. *Lab on a Chip*, **12**(18), 3267.
- [63] I. Klimant *et al.* Dual lifetime referencing (DLR) - A new scheme for converting fluorescence intensity into a frequency-domain or time-domain information. in *New trends in fluorescence spectroscopy*, B. Valeur; J.-C. Brochon, Hrsg.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2001; Bd. 1, S. 257–274.
- [64] I. Klimant; O. S. Wolfbeis (1995). Oxygen-sensitive luminescent materials based on silicone-soluble ruthenium diimine complexes. *Analytical Chemistry*, **67**(18), 3160–3166.
- [65] S. Klutz *et al.* (2015). Developing the biofacility of the future based on continuous processing and single-use technology. *Journal of Biotechnology*, **213**, 120–130.
- [66] A. Kluyver; L. H. C. Perquin (1933). Zur Methodik der Schimmelstoffwechseluntersuchung. *Biochemische Zeitschrift*, **266**(68).
- [67] O Kohls; T. Scheper (2000). Setup of a fiber optical oxygen multisensor-system and its applications in biotechnology. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **70**(1–3), 121–130.

- [68] S. Lamping *et al.* (2003). Design of a prototype miniature bioreactor for high throughput automated bioprocessing. *Chemical Engineering Science*, **58**(3–6), 747–758.
- [69] F. Lavergne-Mazeau *et al.* (1996). Linear correlation between bacterial overexpression of recombinant peptides and cell light scatter., eng *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(8), 3042–3046.
- [70] W. G. Lawrence *et al.* In *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues VI*, 2008; Bd. 6859, S. 68590M–68590M–11.
- [71] T. H. Lücking *et al.* (2015). 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: A proof of principle. *Engineering in Life Sciences*, **15**(1), 51–56.
- [72] T. H. Lücking *et al.* (2015). 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures. *Engineering in Life Sciences*, **15**(1), 57–64.
- [73] C.-S. Lee; S. K. Kim; M. Kim (2009). Ion-sensitive field-effect transistor for biological sensing. *Sensors*, **9**(9), 7111–7131.
- [74] G. Lewis *et al.* (2004). The application of multi-parameter flow cytometry to the study of recombinant *Escherichia coli* batch fermentation processes., en *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **31**(7), 311–322.
- [75] Z. Li *et al.* (2011). Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems., en *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**(4), 1203–1213.
- [76] G. Liebsch *et al.* (2001). Fluorescent imaging of pH with optical sensors using time domain dual lifetime referencing. *Analytical Chemistry*, **73**(17), 4354–4363.
- [77] V. A. Lifton; G. Lifton; S. Simon (2014). Options for additive rapid prototyping methods (3D printing) in MEMS technology. *Rapid Prototyping Journal*, **20**(5), 403–412.
- [78] D. Logan; J. Carvell (2011). A biomass monitor for disposable bioreactors. *BioProcess International*, **9**, 48–54.

- [79] Q. Long *et al.* (2014). The development and application of high throughput cultivation technology in bioprocess development. *Journal of Biotechnology*, **192**(Part B), 323–338.
- [80] L. G. Longworth; D. A. Macinnes (1935). Bacterial growth with automatic pH control: (a) An apparatus. (b) Some tests on the acid production of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*, **29**(6), 595–607.
- [81] M. Maciejewska; A. Szczurek; Z. Kerényi (2006). Utilisation of first principal component extracted from gas sensor measurements as a process control variable in wine fermentation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **115**(1), 170–177.
- [82] C.-F. Mandenius; A. Brundin (2008). Review: Biocatalysts and bioreactor design. *Biotechnology Progress*, **24**(6), 1191–1203.
- [83] S. Marose *et al.* (1999). Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Trends in Biotechnology*, **17**(1), 30–34.
- [84] S. Moses *et al.* (2012). Assessment of AMBRTM as a model for high-throughput cell culture process development strategy. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **3**(7), 918–927.
- [85] S. Mross *et al.* (2015). Integrated multi-sensor system for parallel in-situ monitoring of cell nutrients, metabolites and cell mass in biotechnological processes. *Procedia Engineering*, **120**, 372–375.
- [86] K.-O. Mutz (2008). Neue Anwendungsgebiete für optische Sensoren in der Biotechnologie. Masterarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie.
- [87] A. Neumeyer *et al.* (2012). Monitoring of population dynamics of *Corynebacterium glutamicum* by multiparameter flow cytometry. *Microbial Biotechnology*, **6**(2), 157–167.
- [88] P. F. O'Neill *et al.* (2014). Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications. *Biomicrofluidics*, **8**(5), 052112.

- [89] J. Paul Smelko *et al.* (2011). Performance of high intensity fed-batch mammalian cell cultures in disposable bioreactor systems. *Biotechnology Progress*, **27**(5), 1358–1364.
- [90] R. A. Potyrailo *et al.* (2011). Passive multivariable temperature and conductivity RFID sensors for single-use biopharmaceutical manufacturing components. *Biotechnology Progress*, **27**(3), 875–884.
- [91] K. A. Presser; D. A. Ratkowsky; T. Ross (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(6), 2355–2360.
- [92] R. Puskeiler (2004). Miniaturisierte Parallelreaktoren zur Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung. Dissertation, Technische Universität München.
- [93] S. Sachse *et al.* (2015). On the use of electrochemical multi-sensors in biologically charged media. *Journal of Sensors and Sensor Systems*, **4**(2), 295–303.
- [94] M. Samorski; G. Müller-Newen; J. Büchs (2005). Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurements: A novel measurement technique for shaken microtiter plates. *Biotechnology and Bioengineering*, **92**(1), 61–68.
- [95] K. Schügerl (2005). Process development in biotechnology - a re-evaluation. *Engineering in Life Sciences*, **5**(1), 15–28.
- [96] K. Schmale (2008). SuperSpinner D1000: A disposable bioreactor for efficient lab-scale cultivation of animal cells. *Nature Methods*, **5**.
- [97] J. Schmidt-Hager (2009). Online-Monitoring der optischen Dichte an Schüttelkolbenkulturen. Diplomarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie.
- [98] J. Schmidt-Hager *et al.* (2014). Non-invasive online biomass detector system for cultivation in shake flasks. *Engineering in Life Sciences*, **14**(5), 467–476.
- [99] J. Schmidt-Hager *et al.* (2015). Real-time monitoring in shake flask culture. *Genengnews*, **35**(14).

- [100] M. Schmidt; D. Weuster-Botz (2012). Reaction engineering studies of acetone-butanol-ethanol fermentation with *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology Journal*, **7**(5), 656–661.
- [101] K. Schneider *et al.* (2009). Optical device for parallel online measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **33**(5), 541–547.
- [102] O. Schweder (2006). Untersuchung zum extrazellulären und intrazellulären Sauerstofftransfer. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie.
- [103] J. M. Seletzky *et al.* (2006). An experimental comparison of respiration measuring techniques in fermenters and shake flasks: Exhaust gas analyzer vs. RAMOS device vs. respirometer. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **34**(2), 123–130.
- [104] R. T. Sheen (1947). Automatic pH control in water and industrial waste treatment. *Industrial & Engineering Chemistry*, **39**(11), 1433–1439.
- [105] M. Shivhare; G. McCreath (2010). Practical considerations for DoE implementation in quality by design. *BioProcess International*, **8**(6), 22–30.
- [106] A. A. Shukla; U. Gottschalk (2013). Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing. *Trends in Biotechnology*, **31**(3), 147–154.
- [107] D. Spencer; G. Elliott; H. Morgan (2014). A sheath-less combined optical and impedance micro-cytometer. *Lab Chip*, **14**(16), 3064–3073.
- [108] T. Sun; H. Morgan (2010). Single-cell microfluidic impedance cytometry: A review. *Microfluidics and Nanofluidics*, **8**(4), 423–443.
- [109] M. Tomala *et al.* (2010). Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner. *Protein Expression and Purification*, **73**(1), 51–57.
- [110] C. Ude (2012). Evaluation einer optischen Multisensorplattform zur online-Überwachung relevanter Kultivierungs-Basisgrößen. Masterarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie.

- [111] C. Ude *et al.* (2014). Application of an online-biomass sensor in an optical multi-sensory platform prototype for growth monitoring of biotechnical relevant micro-organism and cell lines in single-use shake flasks. *Sensors*, **14**(9), 17390–17405.
- [112] C. Ude *et al.* (2015). New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **221**, 1035–1043.
- [113] B. Volkmer; M. Heinemann (2011). Condition-dependent cell volume and concentration of *Escherichia coli* to facilitate data conversion for systems biology modeling. *Public Library of Science ONE*, **6**(7), e23126.
- [114] J. Wallace *et al.* (2014). Validating continuous digital light processing (cDLP) additive manufacturing accuracy and tissue engineering utility of a dye-initiator package. *Biofabrication*, **6**(1), 015003.
- [115] P. Wenk *et al.* (2012). Hochparallele Bioprozessentwicklung in geschüttelten Mikrobioreaktoren. *Chemie Ingenieur Technik*, **84**(5), 704–714.
- [116] D. Weuster-Botz (2005). Parallel reactor systems for bioprocess development. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **92**, 125–143.
- [117] D. Weuster-Botz; J. Altenbach-Rehm; M. Arnold (2001). Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks. *Biochemical Engineering Journal*, **7**(2), 163–170.
- [118] J. C. White *et al.* (2012). Addition of perfluorocarbons to alginate hydrogels significantly impacts molecular transport and fracture stress. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **101**(2), 438–446.
- [119] K. D. Wittrup *et al.* (1988). Single-cell light scatter as a probe of refractile body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, **6**(4), 423–426.
- [120] Z. Yang *et al.* (2011). Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *Public Library of Science ONE*, **6**(7), 22981.
- [121] E. Yohannes; D. M. Barnhart; J. L. Slonczewski (2004). pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K12. *Journal of Bacteriology*, **186**(1), 192–199.

- [122] A. Zanzotto *et al.* (2004). Membrane-aerated microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnology and Bioengineering*, **87**(2), 243–254.
- [123] R Zimmermann *et al.* (2013). Measuring lagrangian accelerations using an instrumented particle. *Physica Scripta*, **T155**, 014063.

## Online Quellen

- [124] (2008). ASD19-N 1-Kanal-NIR-Absorptionssonde. Optek-Danulat GmbH. <http://www.optek.com/de/asd12-asd19-stabsonden.asp>, 29.09.2012.
- [125] (2007). Automatic pump unit APU-01. Taitec Corp. [http://e-taitec.com/products/products-detail-en.php?machine\\_name=APU-01](http://e-taitec.com/products/products-detail-en.php?machine_name=APU-01), 26.01.16.
- [126] (2004). Bench-scale fermentation laboratory. National Renewable Energy Laboratory. <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/51986.pdf>, 01.01.2016.
- [127] Cell growth and biomass sensor OUSBT66. Endress+Hauser Messtechnik GmbH und Co. KG. <http://www.in.endress.com/en/Tailor-made-field-instrumentation/liquid-analysis-product-overview/cell-growth-biomass-sensor-ousbt66>, 24.01.2016.
- [128] R. Combs; B. Bisho (1993). Performance of a Commercially Available Biomass Sensor for On-line Monitoring of High Density *Escherichia coli*. Monsanto Company. [http://www.cerexinc.com/Cerex\\_Performance\\_-\\_Biomass\\_Sensor.pdf](http://www.cerexinc.com/Cerex_Performance_-_Biomass_Sensor.pdf), 29.09.2012.
- [129] Customized wireless sensor. smartINST. <http://www.smartinst.fr/#!services/q1ih8>, 02.06.2016.
- [130] DASGIP® Bioblock. Eppendorf AG. <https://online-shop.eppendorf.de/DE-de/Bioproszesstechnik-44559/Module-77460/DASGIP-Bioblock-PF-25356.html>, 31.12.2015.
- [131] M. P. Debreczeny; E. T. Davies. Non-invasive biomass monitor with wide linear range. BugLab LLC, University of Georgia (Bioexpression und Fermentation Facility). <http://www.buglab.com/onlineodmeasurement.pdf>, 26.01.2016.

- [132] (2009). GSI10530 Series of Hybrid Detectors. General Semiconductor Industries Ltd. <http://www.gsi.uk.com/files/200.doc>, 28.07.2012.
- [133] S. Henkel *et al.* (2011). Multisensoradapter for Disposable Bioreactors. Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. [https://www.tci.uni-hannover.de/uploads/tx\\_tkpublikationen/02.pdf](https://www.tci.uni-hannover.de/uploads/tx_tkpublikationen/02.pdf).
- [134] T. Lücking *et al.* (2013). Neue apparative Konzepte in der Biotechnologie mit Hilfe des Rapid Prototyping. Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. [http://www.tci.uni-hannover.de/uploads/tx\\_tkpublikationen/Plakat-DECHEM\\_Luecking.pdf](http://www.tci.uni-hannover.de/uploads/tx_tkpublikationen/Plakat-DECHEM_Luecking.pdf).
- [135] (2015). Micro-24 MicroReactor System. Pall Corp. <http://www.pall.com/main/biopharmaceuticals/product.page?id=52961>.
- [136] (2015). Micro bioreactor system with microfluidic chip for individual pH and feeding control. m2p GmbH. <http://www.m2p-labs.com/from-micro-bioreactor-to-bioreactor-pro>, 12.01.2016.
- [137] Mikropumpe mp6. Bartels Mikrotechnik GmbH. <http://www.bartels-mikrotechnik.de/content/view/16/22/lang,englisch/>, 15.01.2015.
- [138] Multi-Union fermenters (Stainless Steel) BLBIO-50SJ-5. bailun Bio-Technology Co., Ltd. <http://www.blbio.com/en/product.asp?id=48>, 30.12.2015.
- [139] My-Control – BioBundles. Applikon Biotechnology B.V. <http://www.applikonbio.com/images/download/mycontrol/myControl%20BioBundle.pdf>, 04.01.2015.
- [140] (2007). Non-invasive turbidity meter for culturing by rotary shaker. OD-Monitor control unit ODBox-B. Taitec Corp. [http://e-taitec.com/products/products-detail-en.php?machine\\_name=ODBox-B](http://e-taitec.com/products/products-detail-en.php?machine_name=ODBox-B), 26.01.16.
- [141] (2015). OD scanner model BEH100 hand held noninvasive biomass sensor. BugLab LLC. <http://www.buglab.com/od-scanner-manual-2013-07-08.pdf>, 26.01.2016.
- [142] M. Pertoldi (2011). AF 46 S/R Trübungsmesssonde. Aquasant Messtechnik AG. <http://www.aquasant-mt.com/Sonde-AF-46-S-R.171.0.html?&L=0>, 29.09.2012.
- [143] STS Series. Ocean Optics Inc. <http://oceanoptics.com/product-category/sts-series/>, 02.07.2016.



- [144] J. Schmidt-Hager *et al.* (2015). New Device for Biomass Monitoring in Shake Flask Culture – Development of an analytical unit based on the SFR Shake Flask Reader. PreSens GmbH. [http://www.presens.de/uploads/tx\\_presensapplicationnotes/150311\\_APP\\_New\\_Device\\_for\\_Biomass\\_Monitoring\\_w\\_02.pdf](http://www.presens.de/uploads/tx_presensapplicationnotes/150311_APP_New_Device_for_Biomass_Monitoring_w_02.pdf), 03.01.2016.
- [145] Selective Laser Sintering. Custompartnet Inc. <http://www.custompartnet.com/wu/selective-laser-sintering>, 05.01.2016.
- [146] Stereolithography. Custompartnet Inc. <http://www.custompartnet.com/wu/stereolithography>, 05.01.2016.
- [147] System Duetz. Kuhner Shaker AG. [http://www.enzyscreen.com/videos\\_96\\_square\\_deepwell\\_mtp.htm](http://www.enzyscreen.com/videos_96_square_deepwell_mtp.htm), 22.05.2016.
- [148] (2009). TruCell2 Probe. Finesse Solutions. <http://www.lsf.ch/fileadmin/media/pdf/TruCell2TM.pdf>, 29.09.2012.
- [149] (2013). Univessel<sup>®</sup>SU single-use bioreactor proven design, ready for the future. Sartorius AG. [http://www.sartorius-lab.net/uploads/1/0/6/2/10629561/frt\\_univessel\\_su\\_sbi1515-e%5B1%5D.pdf](http://www.sartorius-lab.net/uploads/1/0/6/2/10629561/frt_univessel_su_sbi1515-e%5B1%5D.pdf), 04.01.2016.
- [150] Xbee Wifi. Digi International. <http://www.digi.com/products/xbee-rf-solutions/modules/xbee-wi-fi>, 09.04.2016.
- [151] ambr<sup>®</sup>15 cell culture transient transfection. Sartorius AG. [https://www.sartorius.de/fileadmin/fm-dam/DDM/Bioprocess-Solutions/Fermentation-Technologies/Benchtop-Bioreactors/ambr15/Application-Notes/App\\_Note\\_ambr\\_15\\_Transient\\_Transfection\\_SBI1107-e.pdf](https://www.sartorius.de/fileadmin/fm-dam/DDM/Bioprocess-Solutions/Fermentation-Technologies/Benchtop-Bioreactors/ambr15/Application-Notes/App_Note_ambr_15_Transient_Transfection_SBI1107-e.pdf), 31.12.2015.
- [152] ambr<sup>®</sup>15. Sartorius AG. [https://www.sartorius.com/fileadmin/fm-dam/DDM/Photos/Bioprocess-Solutions/Fermentation-Technologies/Benchtop-Bioreactors/ambr15/FeT\\_ambr15---\\_6315.jpg](https://www.sartorius.com/fileadmin/fm-dam/DDM/Photos/Bioprocess-Solutions/Fermentation-Technologies/Benchtop-Bioreactors/ambr15/FeT_ambr15---_6315.jpg), 31.12.2015.
- [153] ambr<sup>®</sup>15. Sartorius AG. [https://www.sartorius.co.uk/fileadmin/fm-dam/DDM/Photos/Bioprocess-Solutions/Fermentation-Technologies/Benchtop-Bioreactors/ambr15/FeT\\_ambr15---\\_6319.jpg](https://www.sartorius.co.uk/fileadmin/fm-dam/DDM/Photos/Bioprocess-Solutions/Fermentation-Technologies/Benchtop-Bioreactors/ambr15/FeT_ambr15---_6319.jpg), 31.12.2015.

- [154] (2013). bioREACTOR - Hochdurchsatz-Bioprozessentwicklung im Millilitermaßstab.  
2mag GmbH. <http://www.2mag.de/de/produkte/bioreactor/bioreactor-48.html>,  
04.01.2015.

# Abbildungsverzeichnis

2.1.1	Strategien der Bioprozessentwicklung im Überblick. Dargestellt ist der klas- . . . . .	5
2.2.1	Multisensorchip zur Messung der Bioprozessparameter pH und Biomasse via . . . . .	9
2.2.2	Systeme zur Prozessanalytik und Prozesskontrolle in Schüttelkolben: A) OD . . . . .	12
2.3.1	Etablierte 3D-Druckverfahren als Teil des Rapid-Prototyping zur Herstellung . . . . .	16
2.4.1	A) Aufbau eines Mikrozytometer als „Lab-on-a-chip“-Gerät. Optische Kom- . . . . .	19
3.2.1	Funktionsschema zum Regelkreis der pH-Steuerung mittels Dosagemodul. . . . .	44
3.2.2	Software „pH-Regler“ in C-Sharp zur Berechnung von Dosagevolumina . . . . .	44
A. 1	Kommerzielle Parallelrührkesselbioreaktoren: A) V2A-Stahl [138], B) Multi- . . . . .	94
A. 2	Mikrotiterplates mit integrierten Sensoren und Elementen zur Prozesskon- . . . . .	99
B. 1	A) CHO-Streulichtsensor für Schüttelkolbenkultivierungen, B) Konstrukti- . . . . .	104

# Tabellenverzeichnis

3.1.1	Einflussfaktoren auf das Messsignal. Ursachen für Messrauschen und Fehl- . . . . .	23
A. 1	Prozesstechnische CPPs des QbD-Verfahrens für die BPE in Bioreaktoren . . . . .	90
A. 2	Biologisch/Biochemische CPPs des QbD-Verfahrens für die BPE in Bioreaktoren . . .	91
A. 3	Vergleich und Kenndaten verschiedener Parallelbioreaktorsysteme . . . . .	92
C. 1	Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt . . . . .	105
C. 2	Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt . . . . .	105

## A Anhang: Theoretischer Teil

### A.1 Grundlegende Paradigmen der Bioprozessentwicklung

**Tab. A. 1** Prozesstechnische CPPs des QbD-Verfahrens für die BPE in Bioreaktoren.

Technische Kriterien	Relevanz / Fall-Beispiele
Agitation/Rühren	Beeinflusst Mischzeiten, Sauerstoffeintrag und Scherstress erheblich. Eine konstante Rührer-Schnelllaufzahl hat sich als gutes Scale-up-Kriterium erwiesen [14, 34]
Begasungsmethode, pO <sub>2</sub> -Regelbarkeit	Ein konstanter k <sub>1,a</sub> -Wert hat sich als gutes Scale-up-Kriterium erwiesen [14, 34]. Oberflächenbegasung bei geschüttelten Systemen ist schwer kontrollierbar und ein konstanter pO <sub>2</sub> ist schwer erreichbar → schlechte Reproduzierbarkeit [14]. Koaleszenz und Implosion von Bläschen führt zu erheblichen Scherstress [28]
Biofilme und Biofouling	An Oberflächen, Bauteilen und Sensoren. Schwer berechenbares Kulturwachstum, Einschränkung des online-Monitoring [28]
Energieeintrag	Energiekosten der Agitation kann beim Rühren bis zu 20% der Gesamtkosten ausmachen, insbesondere bei Mycelkulturen durch höheren mechanischen Widerstand [95]
Hydrostatischer Druck	Mit steigendem Reaktorvolumen steigt bei konstantem Seitenverhältnis des Reaktors der Druck → Stress für sensitiven Zelllinien [14]
Induktionsmethode	Einsatz von Induktoren wie IPTG ab bestimmter Reaktorgröße im Scale-up zu teuer, stattdessen Temperaturmethode oder Bulk-Chemikalie wie Lactose [95]
Instandsetzungszeiten	Reinigung, Sterilisierung und Vorbereitung bei Mehrwegreaktoren kann bis zu 50% der Produktionszeit ausmachen [95]
Kühlzeiten	Effektive Reaktorkühlung ist im industriellen Großmaßstab nötig um biochemisch labile Produkte möglichst quantitativ aus dem Prozess zu isolieren [28]
Kulturvolumen-Verfügbarkeit	Mindestvolumen nötig für Probennahmen zur offline/atline-Analytik. Die dadurch verursachten Störungen müssen bei allen Reaktoren identisch sein [28]
Medium-Eigenschaften	z. B. Schaumbildung schränkt die Sauerstofftransferrate (OTR) bei gerührten und geschüttelten Reaktoren stark ein [95]
Mischzeiten und Totzonen	Mischzeit muss kürzer sein als Assimilationszeit von Substrat oder Sauerstoff, da durch lokale Stoffgradienten Subpopulationen überversorgt/unterversorgt bzw. inhibiert werden. Lokale hohe pH-Gradienten durch Ausgleichslösungen führen zu Wachstumsinhibierung [14, 28]

**Tab. A.2** Biologisch/Biochemische CPPs des QbD-Verfahrens für die BPE in Bioreaktoren.

<b>Biologisch Kriterien</b>	<b>Relevanz / Fall-Beispiele</b>
Cytotoxizität des Produktes	Führt zu Wachstumsinhibition und hohen Prozesskosten pro Einheit des Produktes. Im Falle der Sekretion, kann es während des Prozesses durch Adsorber abgereichert werden [95]
Diauxien, Metabolismus	Unter anaeroben Bedingungen werden in einigen Organismen organische Säuren aus Glucose produziert und wirken wiederum als C-Quelle und beeinflussen den Prozessverlauf [28]
Dynamische Veränderung der Sauerstoffaufnahme (OUR)	OUR erhöht sich während der Genexpression bzw. Produktbildungsphase. Starke Abhängigkeit des Produkttiters von der Sauerstoffversorgung [95]
Dynamische Veränderungen der Zellmorphologie	Scherstress beeinflusst Morphologie von Zellen und führt z. B. zur Pelletbildung von Mycelbildnern. Dies kann zu Variationen in der Produktausbeute führen abhängig von der Größe der Pellets, da es im Kern zur Apoptose kommt [95]
Genetische-Stabilität	Bei zeitlich lang dauernden Seed-trains reichern sich Mutanten an. Kontinuierliche Kultivierungsverfahren selten etablierbar [95]
Katabolitrepression	Durch C-Quelle oder andere Medienbestandteile verursacht, welche die Genexpression hemmen [95]. Hohe Biomassezunahme und Produktbildung können nicht parallel durchgeführt werden → evtl. fed-batch anwenden
Substratinhibition	Bei Zugabe von Konzentraten (fed-batch) müssen Mischzeiten berücksichtigt werden. Ein Scale-up um den Faktor 10.000 führt zu ca. 8-fach höheren Mischzeit abhängig von der Viskosität des Mediums [28, 95]

## A.2 Bioprozessentwicklung in Bioreaktoren

### A.2.1 Parallel-Rührkesselbioreaktoren

#### 1. Generation: Stationäre Stahlreaktoren

Parallele Rührkesselbioreaktoren stellen in der Mehrheit industrieller Bioprozesse, die in Flüssigphasen stattfinden, eine direkte Miniaturisierung der im Produkti-

**Tab. A.3** Vergleich und Kenndaten verschiedener Parallelbioreaktorsysteme.

	<b>Parallel-STR</b>	<b>96-WP*</b>	<b>24-WP</b>	<b>Schüttelkolben</b>	<b>Mikrobioreaktoren</b>
online-Sensorik	pH, pO <sub>2</sub> , T, Biomasse, Abgas, Fluoreszenz, Substrat	pH, pO <sub>2</sub>	pH, pO <sub>2</sub> , T, Biomasse, Fluoreszenz	pH, pO <sub>2</sub> , Biomasse	pH, pO <sub>2</sub> , T
online-Prozesskontrolle	pH, pO <sub>2</sub> , T, Substrat	T	pH, pO <sub>2</sub> , T, Substrat	T	T, pO <sub>2</sub>
Volumenbereich	8–1000 ml	50–150 µl	1–4 ml	10–5000 ml	5 µl max.
Scale-up	einfach	schwierig	schwierig	moderat	schwierig
Know-how	hoch	gering	gering	gering	hoch
Kapitalbedarf	hoch	gering	gering	gering	moderat
Single-use	ja	ja	ja	ja	ja
k <sub>L</sub> a [s <sup>-1</sup> ]	0,06–0,44 [7, 92]	0,038–0,23 [7, 92]	0,056 [147]	0,025 –0,875 [92]	0,0167 [122]

\*WP=Wellplate

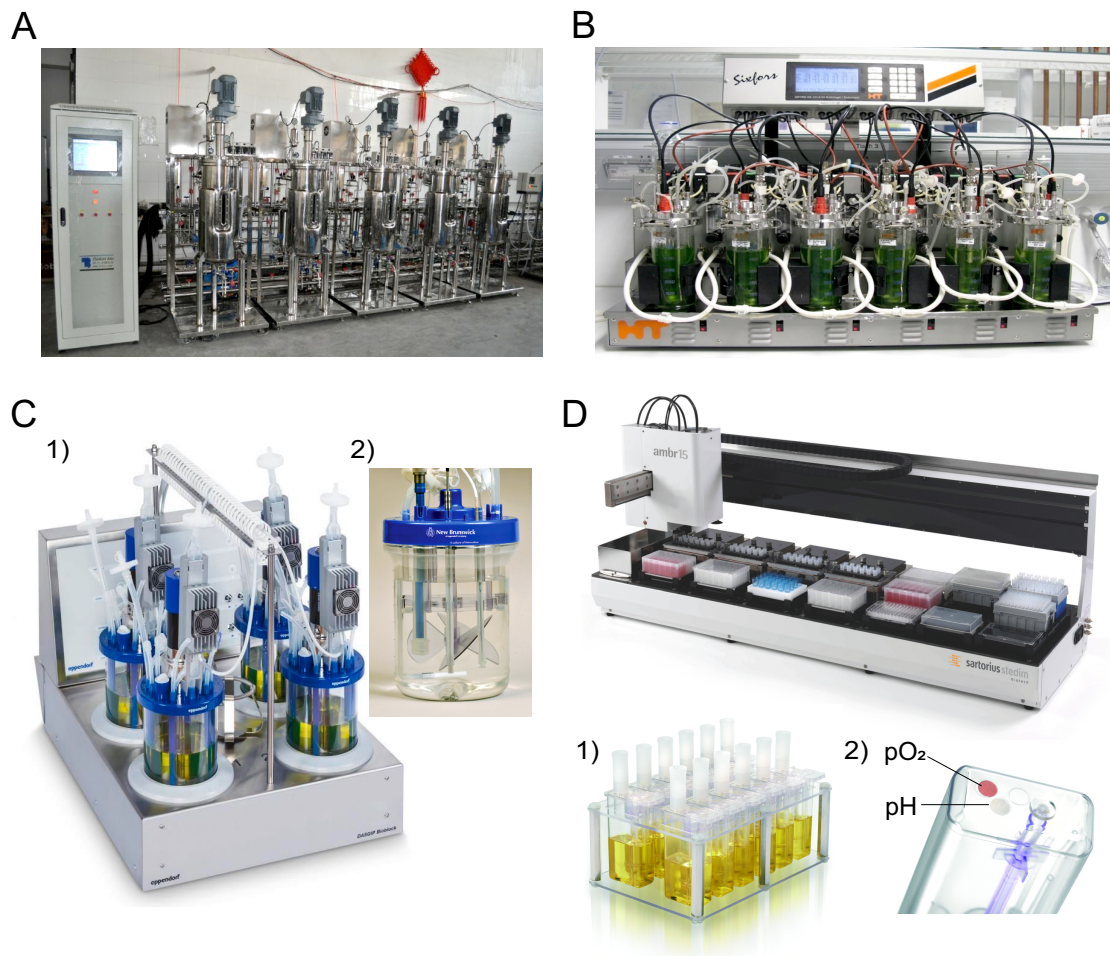
onsmaßstab eingesetzten Großfermenter dar. Die erhaltenen empirischen Daten lassen sich i.d.R einfach auf größere Systeme übertragen [7]. Bei den ersten Parallelreaktorsystemen handelte es sich um eine Kombination mehrerer zylindrischer Reaktoreinheiten aus Edelstahl an einer gemeinsamen Versorgungs- und Controlereinheit (DCU) (Abb. A.1 A, S.94) (Dimensionierung: 3-6 Einheiten, 2–10 l). Diese Systeme zeichnen sich vor allem durch eine maximale Ausstattung mit Prozessanalytik und Möglichkeiten zur Prozesskontrolle aus (pH, pO<sub>2</sub>/pN<sub>2</sub>, Substrat-Feed, Energieeintrag durch Rührer, Temperierung, Abgasanalytik, Schaumkontrolle, atline-Probenahme, optische/elektrische Biomasse-Messung, Spezialsonden, atline-Produktgewinnung und Downstreaming). Derartige Reaktoren sind durch hohe Robustheit, hohe Leistungsmerkmale (O<sub>2</sub>-Eintrag, Homogenisierung) und

eine hohe Prozessreproduzierbarkeit gekennzeichnet. Auf der Gegenseite stehen; hoher Personalaufwand, hohe Qualifizierung des Personals, hoher Zeitaufwand für Vorbereitung, Sterilisation, Betrieb und Reinigung, hoher initialer Kapitalaufwand, kontinuierliche Wartungskosten und kontinuierliche Kosten für GMP-Rezertifizierungen der betriebenen Anlage. Außerdem ist der Miniaturisierungsgrad dieser Systeme technisch limitiert [7]. Zum einen ist die Miniaturisierung mechanischer Einheiten, die für hohe Energieeinträge ausgelegt werden, begrenzt (z. B. Rührer), zum anderen muss ggf. auf den Einsatz spezieller Sonden zur Prozessanalytik verzichtet werden, da sie sich nicht integrieren lassen. Schließlich muss eine sehr leistungsfähige Begasungsbefeuchtung und Abgaskühlung vorhanden sein, da es sonst bei geringen Volumina zu quantitativen Verlust an Kulturvolumen kommt.

## **2. Generation: Mobile Reaktorstationen**

Neuere Parallelreaktorsysteme, die sich mit ihrem Beginn vor 20 Jahren, kommerziell etabliert haben, verzichten auf einen Edelstahlkorpus sowie eine Doppelmantelkonstruktion (Abb. A. 1 B, S. 94). Stattdessen werden einfache, halboffene Glasbehälter zu Gunsten eines einfacheren Handlings und einer höheren Mobilität der Reaktoren verwendet (z. B. „Sixfors“, „Biostat Q“) (Dimensionierung: 3–12 Einheiten, 100–2000 ml) [126, 40]. Eine Dampfsterilisation ist bei Glasgefäßen nicht zugelassen wodurch eine Dampfsterilisationsinfrastruktur wegfällt. Neben den geringeren Anschaffungskosten und der kompakteren Bauweise des Gesamtsystems sind diese Reaktoren auch für die Kultivierung photoautotropher Organismen besser geeignet, da keine Lichtquelle direkt in den Reaktor eingebracht werden muss. Die pH-Kontrolle erfolgt elektronisch als auch mechanisch zentralisiert von der DCU aus mittels Peristaltikpumpen. Auf diese Weise können Schlauchlängen und Totvolumina signifikant reduziert werden. Ein Nachteil der nicht-stationären Mehrwegreaktoren besteht in einem vergleichsweise komplizierteren Setup der Reaktoren. Das Autoklavieren muss separat zur Steuerungsinfrastruktur erfolgen, wobei Anschlüsse für Kühlung und pH-Kontrolle getrennt und wieder verbunden werden müssen. Chemische *sterilization in place* (SIP)–





**Abb. A. 1** Kommerzielle Parallelrührkesselbioreaktoren: A) V2A-Stahl [138], B) Multifermenter „Sixfors“ Infors GmbH [40], C) DASGIP<sup>®</sup> Bioblock [130, 38] D) ambr<sup>®</sup> 15 Mini-Bioreaktoren inkl. Pipettiersystem [151–153] .

Sterilisationsverfahren können in bestimmten Fällen eine Alternative bieten, kommen aber im kleinen Labormaßstab selten zur Anwendung [42]. Edelstahl/Glas-Reaktorkombinationen werden insbesondere für mikrobielle Prozesse im Scale-up bis heute verwendet, während sich im Bereich der Säugerzellkultivierung, mit ihrer Einführung im Jahr 2004, ein Wechsel zu SU-Systemen vollzogen hat [106]. Diese Entwicklung wurde nicht nur durch höhere Gewinnmargen der mit Hilfe von Zellkulturen hergestellten pharmazeutischen Produkten vorangetrieben, was gleichzeitig den höheren Kapitaleinsatz von Disposables rechtfertigt. Es ergeben

sich vor allem technisch-logistische Vorteile; schnelle Verfügbarkeit von „Ready-to-use“  $\gamma$ -sterilisierten Reaktoren, hohe Flexibilität in der Laborbestückung („Ballroom-concept“) [65], hohe Mobilität der Reaktoren (schnelle, einfache Installation und Reaktorwechsel), sehr geringes Kreuzkontaminationsrisiko, günstige Herstellung individueller Bauteile [38] und der Wegfall einer gesonderten GMP-Zertifizierung der Anlage [31, 89]. Herausforderungen bestehen bis dato im Bereich der direkt anfallenden Beschaffungs- und Recyclingkosten, der Verfügbarkeit von SU-Sensoren und die Freisetzung von chemischen Störstoffen in die Kulturflüssigkeit bzw. der Verlust von Substanzen durch die Adsorption an Polymerbauteile („leachables & extractables“) [31, 39, 106].

### 3. Generation: Single-use Reaktorsysteme

Die Entwicklung der letzten 10 Jahre folgte noch stärker den Konzepten Miniaturisierung, Baukastenprinzip und der SU-Technologie („DASBox<sup>®</sup>“, „DASGIP<sup>®</sup> Bioblock“) (Abb. A. 1 C, S. 94) (Dimensionierung: 4–32 Einheiten, 50–300 ml). Speziell die Miniaturisierung des Gesamtsystems und einzelner Bauteile bzw. Funktionalitäten wie z. B. Rührern und neuer Dosiertechniken war dabei Gegenstand diverser Forschungsarbeiten [50, 55, 68, 92]. Neben dem üblichen Aufsatz eines Elektromotors mit direkter Übertragung der Energie über eine Achse kommen bei SU- Rührkesselbioreaktoren häufig indirekte Verfahren zum Einsatz, um eine Quelle für Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Dabei wird die Rührachse induktiv mit Hilfe eines Magnetrührers in Kombination mit einem verkapselten Ferritkern, der sich entweder an der Achse am Kopfteil oder innerhalb des Rührers befindet, nicht-invasiv angetrieben (Abb. A. 1 C2, S. 94). Temperiert bzw. gekühlt werden SU-Reaktoren entweder über eine temperierte Vertiefung innerhalb der DCU oder einer Manschette [130, 149]. Für die Begasungseinheit werden statt klassischen Ring-Spargern häufig gesinterte Mikrosparger verwendet, die bei gleichem Volumenstrom einen höheren  $k_L a$ -Wert bewirken und das Auftreten von Koaleszenz vermindert. Da sehr kleine Blasen ( $< 10 \mu\text{m}$ ) beim Platzen an der Flüssigkeitsoberfläche einen höheren Scherstress als größere verursachen, muss die Sin-

terungsdichte für den Einsatz an Säugerzellkulturen auf eine Blasengröße  $> 10 \mu\text{m}$  abgestimmt sein [31, 38]. Das typische Verblocken von Mikrospargern spielt bei der Anwendung keine Rolle, da sie nach einem Prozess nicht wiederverwendet werden. Eine Alternative bietet die blasenfreie Begasung durch Hohlfasermembranen, die an den Rührer gespannt sind („SuperSpinner“ D1000) und mit der hohen Zelldichten bei Scherstress-sensitiven Ziellinien erreicht werden können [31, 96]. Die pH-Kontrolle bei SU-Reaktoren kann analog zu Edelstahl/Glas-Reaktoren mittels Peristaltikpumpen durchgeführt werden. Diese werden auch mit Rückschlagventilen gekoppelt, um einen Rückfluss zu verhindern [55, S. 21]. Darüber hinaus sind Systeme mit Mikroventildüsen im Reaktorkopf verfügbar, mit denen sehr präzise Dosagen von  $0,5\text{--}50 \mu\text{l}$  ermöglicht werden [139]. Dies ist vor allem für die Dosage von Substraten oder Induktoren relevant. Analog zur potentiometrischen Messung von pH und  $\text{pO}_2$  mittels Elektroden hat die Einführung von SU-Sensorspots (Chemosensoren) die nicht-invasive online-Analytik dieser Messgrößen ermöglicht [63, 64, 76]. Die Fluoreszenz-basierte Messung kann prinzipiell durch Polycarbonatwände hindurch erfolgen, wobei das Einbringen von adaptierten Lichtwellenleiter in Tauchhülsen am Reaktordeckel das Setup vereinfacht. Bei Sauerstoffsensoren ist es auch möglich den Sensor spot physikalisch vollständig vom Kulturmedium zu trennen, indem eine Silikonmembran an das Ende der Tauchhülse eingebracht wird, was das Ausbluten von Fluorophoren verhindert [38].

#### **4. Generation: Workstations und SU-Miniaturreaktoren**

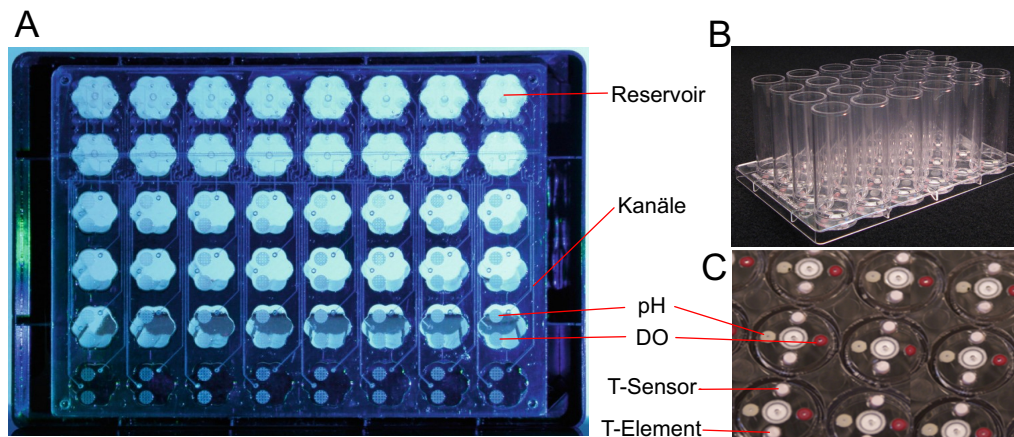
Neueste Entwicklungen im Bereich des HTS haben zur Verkleinerung des Reaktorvolumens auf bis zu  $8\text{--}15 \text{ ml}$  geführt, während  $8\text{--}48$  Einzelreaktoren parallel betrieben werden können („ambr<sup>®</sup> 15-Workstation“, „bioREACTOR 48“) [151, 154]. Die Einzelreaktoren sind mit Miniaturrührern ausgestattet, wobei die Komplexität des Antriebs durch eine gasinduzierte Rotation des Rührkörpers erheblich reduziert wird [154]. Weiterhin werden bei der Prozesskontrolle unterschiedliche Ansätze verfolgt. Das ambr<sup>®</sup>-System zeichnet sich durch eine vollständige Ein-

bettung in einen Pipettierroboter zum Liquid-handling innerhalb einer Sterilbank aus (Substratzugabe, Zugabe von Korrekturlösungen, Inokulieren, Probennahme) [84]. Das bioREACTOR-System bedient sich magnetisch-induktiven Mikromembranpumpen im Reaktorkopf, was im Vergleich auch eine kontinuierliche Zugabe kleiner Volumina ermöglicht [55, S. 24]. Diese Reaktoren können ebenfalls standardmäßig mit SU-Sensoren ausgestattet werden. Schließlich zeigt sich in diesem Maßstab, dass Universalreaktorsysteme, die optimal für mikrobielle Kulturen und Zelllinien abgestimmt wurden, noch nicht verfügbar sind. Das ambr<sup>®</sup> 15-System wird bevorzugt im Bereich der Säugerzellkultivierung zur Medienoptimierung, Produktionszellinienselektion im Rahmen des HTS verwendet [54, 84]. Im Vergleich dazu ist das bioREACTOR-System ausschließlich für die Prozessparameteroptimierung mikrobieller Bioprozesse wie z. B. der Butanolproduktion durch *C. acetobutylicum* oder zur Selektion von *E. coli* -Mutanten referenziert [46, 100, 154].

## A.2.2 Wellplates

Die seit 1951 verfügbaren Wellplates bzw. Mikrotiterplates (MTP) stellen eine der am häufigsten verwendeten Reaktorvariante für das Anfangsstadium einer Prozessentwicklung dar [14, 115]. Sie zeichnen sich durch sehr hohe Miniaturisierung, hohen Parallelisierungsgrad, hohe räumliche Versuchsdichte und dem geringsten, möglichen Kapitalaufwand pro Experiment aus. Dies macht sie ideal für das HTS und als Versuchsplattform des DoE [79]. Wellplates sind in diversen technischen Konfigurationen und Varianten verfügbar (Platten mit 6, 12, 24, 48 und 96 Wells, Füllvolumen 75  $\mu$ l–3 ml) [92, S. 39]. Um eine optimale Bewegung der Flüssigkeit im Well zu gewährleisten, sollte der Schüttelradius und -frequenz des verwendeten Inkubators auf den Radius der Wells abgestimmt sein (z. B. 300  $\text{min}^{-1}$  und 50 mm, 1000  $\text{min}^{-1}$  und 3 mm) [7, 116]. Vergleichbar mit Schüttelkolben ist der  $\text{O}_2$ -Eintrag stark abhängig vom Oberflächen/Volumen-Verhältnis und einer der kritischsten Prozessparameter bei der Verwendung von Wellplates. Durch Hydro-

philisieren der Wells werden durch die besseren Benetzungseigenschaften bei gleicher Schüttelfrequenz höhere  $k_L a$ -Werte erreicht [2][92, S. 40]. Ebenso wichtig sind verschiedene Wellgeometrien für den  $O_2$ -Eintrag, die in aktuellen Forschungsarbeiten evaluiert wurden. Eine 6-blättrige Blumenform wurde als optimale Geometrie hinsichtlich des  $O_2$ -Eintrags (bis zu  $0,14 s^{-1}$ ) und der möglichst minimalen Neigung zum Herausschleudern der Kulturflüssigkeit determiniert [32]. In weiteren Arbeiten wurde der Vorteil von quadratischen gegenüber zirkulären Wells in Kultivierungsversuchen von *S. cerevisiae* bestätigt [71, 72]. Darüber hinaus sind Deep-Wellplate-Varianten verfügbar, die bei höheren Schüttelfrequenzen betrieben werden können und das 4 bis 5-fache des in zirkulären Wells maximal möglichen  $O_2$ -Eintrags erreichen (auf Basis des OTR) [92, 116]. Eine Herausforderung während Kultivierungen besteht im quantitativen Verlust von Kulturflüssigkeit durch Verdampfung. Es kann beispielsweise bei  $200 \mu l$  Kulturflüssigkeit abhängig von der Agitation zu einem Verlust von bis zu 55 % kommen [58]. Hierzu wurden Systeme mit sauerstoffpermeabler Membran in der Abdeckung entwickelt [30]. Für das Prozessmonitoring und die Prozesssteuerung stehen speziell angepasste Inkubatoren zur Verfügung. Mit diesen können Temperatur, pH,  $pO_2$  für jedes Well individuell gemessen und im Fall der Temperatur auch gesteuert werden. Die pH- und  $pO_2$ -Messung erfolgt dabei über Mikrosensorspots. Der Agitations-abhängige  $O_2$ -Eintrag lässt sich zudem über eine im Boden der Wells integrierten Membran blasenfrei erhöhen („Micro-24 MicroReactor System“) [7, 135]. Die zusätzliche Messung der optischen Dichte, der Fluoreszenz, eine pH-Kontrolle und die Zugabe von Feed-Lösungen werden durch die Kombination aus Plate-Reader und speziellen mit Mikrokanälen durchzogenen Wellplates realisiert (BioLector® Pro) (Abb. A. 2, S. 99) [33, 61, 94]. Die Flüssigkeit aus den in mehreren Wells integrierten Reservoirs (bis 1,5 ml) wird dabei durch Mikropumpen gefördert [55, 94]. Durch die online-Fluoreszenzmessung wird weiterhin die Quantifizierung rekombinanter GFP-Fusionsproteine ermöglicht [61, 115].



**Abb. A. 2** Mikrotiterplates mit integrierten Sensoren und Elementen zur Prozesskontrolle: A) „Flowerplate“-Wellplate des Biolector<sup>®</sup> Pro (Mikrokanäle bieten die Option zur online-pH-Kontrolle) [136], B) 24-Wellplate des Micro-24-MicroReactor System [135], C) Unterseite einer Wellplate des Micro-24 MicroReactor Systems (am Boden der Wells sind Sensorspots aufgeklebt und Elemente zur Temperatur-Kontrolle).

### A.2.3 Schüttelkolben

Der seit den 30er Jahren eingesetzte Schüttelkolben wird bis heute intensiv in der Biotechnologie eingesetzt und stellt die einfachste und oft ökonomischste Reaktorvariante dar, die für verschiedenste Organismen geeignet ist [66]. Zu den Anwendungsgebieten gehören eine Vielzahl an Screenings, das Scale-up sowie die Produktion von Proteinen, Plasmiden und Naturstoffen im kleinen Maßstab. Schüttelkolben kommen zur Entwicklung von Bioprozessen bevorzugt zum Einsatz, wenn eine hohe Flexibilität erwünscht ist, technische Risiken minimiert werden sollen, finanzielle Mittel begrenzt sind und qualifiziertes Personal zum Betreiben komplexerer Systeme fehlt. Limitierungen bestehen vor allem in einem relativ schlechten Sauerstoffübergangskoeffizienten ( $k_L a$ ) der Begasungsmethode über Headspace. Auch eine starke Abhängigkeit des Mischverhaltens und des  $O_2$ -Eintrags von geringen Abweichungen in der Geometrie handgemachter Glaskolben-Schikanen liegt vor [10]. Außerdem ist die sterile Probennahme aufwändig und Möglichkeiten zur Prozesskontrolle sind eingeschränkt. Insbesondere im Fall des „out of

phase“-Schütteln bei Verwendung ungünstiger Kombinationen von Kolbengröße, Agitation und Schüttelradius liegt eine geringe Reproduzierbarkeit des Prozesses vor [12, 13]. Trotz dieser Limitierungen wurde der Schüttelkolben im letzten Jahrzehnt durch den Einsatz und Integration neuer Technologien erheblich aufgewertet. Statt Baumwoll- oder Zellstoffstopfen wurden PTFE-Membranen in Schraubdeckel integriert, was insbesondere die hohen Anforderungen an Sterilität in der Säugerzellkultivierung erfüllt und einen guten  $k_L a$ -Wert gewährleistet [102, S. 37]. Wie auch bei SU-Rührkesselreaktoren können Sensorspots für die pH- und  $pO_2$ -Messung in Schüttelkolben eingeklebt werden. Die optische, nicht-invasive Messung wird dabei mit einer speziellen Sensorplattform durchgeführt („shake flask reader“ SFR) [101]. Seitdem schikanierte Glaskolben sowie deren SU-Varianten aus Polycarbonat (PC) maschinell hergestellt werden, wurden Probleme bzgl. der geometrischen Variabilität praktisch gegenstandslos [43]. Weiterhin ist durch die Messung der  $CO_2$ -Konzentration im Kopfgas die Berechnung von OTR,  $CO_2$ -Transferrate (CTR) und des respiratorischen Quotienten (RQ) ermöglicht worden („RAMOS“) [103]. Enzym-basierte  $\gamma$ -sterilisierbare Biosensoren werden zur selektiven online- und *in situ*-Messung von Glucose, Glutamat und Lactose eingesetzt („CITSens Bio sensor“) [9]. Ebenfalls wurde in den letzten Jahren analog zu Turbiditäts- und Streulichtmesssonden eine Biomassenmessung mittels  $180^\circ$ -Streulicht entwickelt und kommerzialisiert („SFR vario“) (Abb. 2.2.2 C1–C4, S. 12) [98, 111]. Streulicht-, pH- und  $pO_2$ -Messung wurden hierbei innerhalb einer Plattform kombiniert. Auf der Seite der Prozesskontrolle wurden Erweiterung des Kolbendeckels durch mehrere Ports für Sterilfilter und Ansaugkapillare realisiert und ermöglichen eine einfachere Probennahme-Technik [134, 71], wobei sich SU-Probennahmeventile als Sterilbarriere als adäquat erwiesen haben (DASGIP®). Autarke diffusionsgetriebene Systeme für fed-batch-Kultivierungen wurden ebenfalls erprobt. Dabei handelt es sich z. B. um submerse Polymerscheiben (aus PDMS), die Glucosekristalle enthalten oder ein Reservoir das über eine UF-Membran mit dem Medium in Kontakt steht [17, 56]. Auch der Einsatz

eines kompakten, vollautomatischen Dosagemoduls für eine autarke online-pH-Kontrolle konnte erfolgreich getestet werden [112]. Letztlich wird durch die Realisierung von Prozessmonitoring und -kontrolle für Kleinstreaktoren die Übertragbarkeit von experimentellen Daten im Scale-up maßgeblich verbessert.



## B Anhang: Experimenteller Teil

### B.1 Lizenzen

#### SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Mar 11, 2016

---

This is a License Agreement between Christian Ude ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	3826080377694
License date	Mar 11, 2016
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Applied Microbiology and Biotechnology
Licensed content title	Online analysis of protein inclusion bodies produced in E. coli by monitoring alterations in scattered and reflected light
Licensed content author	Christian Ude
Licensed content date	Jan 1, 2016
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Full text
Number of copies	7
Author of this Springer article	Yes and you are a contributor of the new work
Order reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Multi Sensor Networks for Parallel Reactor Systems
Expected completion date	Feb 2016
Estimated size(pages)	80

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 28, 2016

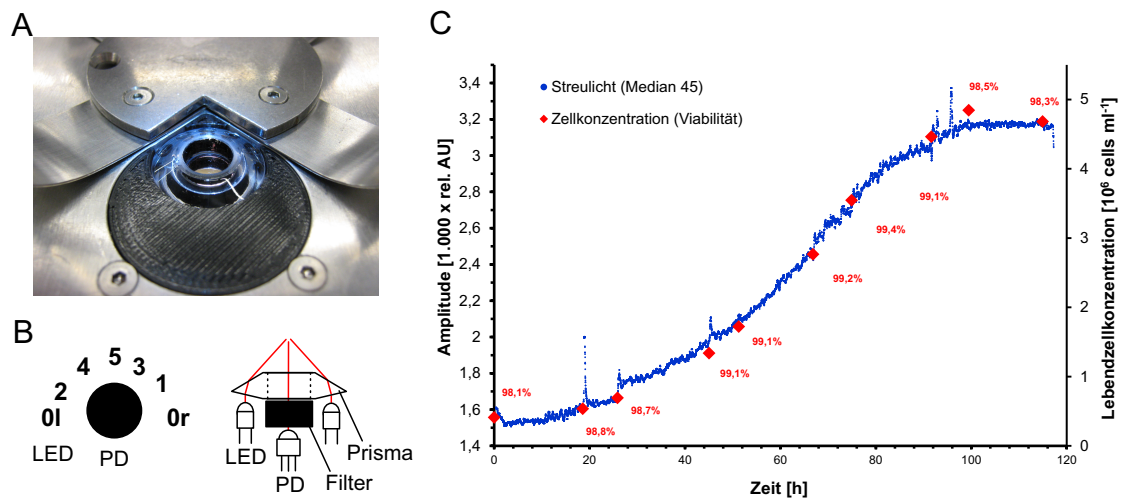
---

---

This is a License Agreement between Christian Ude ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Christian Ude
Customer address	Callinstraße 5 Hannover, 30167
License number	3693680482836
License date	Aug 21, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Sensors and Actuators B: Chemical
Licensed content title	New Perspectives in Shake Flask pH Control using a 3D-printed Control Unit based on pH online Measurement
Licensed content author	Christian Ude, Thorleif Hentrop, Patrick Lindner, Tim H. Lücking, Thomas Scheper, Sascha Beutel
Licensed content date	31 December 2015
Licensed content volume number	221
Licensed content issue number	n/a
Number of pages	9
Start Page	1035
End Page	1043
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Multi Sensor Networks for Parallel Reactor Systems
Expected completion date	Feb 2016
Estimated size (number of pages)	80
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12



**Abb. B. 1** A) CHO–Streulichtsensor für Schüttelkolbenkultivierungen, B) Konstruktionsskizze des Sensoraufbaus aus IR–LED (SFH4350, Osram), Filter (850nm Hard Coated Bandpassfilter, Edmund Optics) und Photodiode (GSI10530, GSI Semiconductor) C) Kultivierung von CHO–K1 in einem 500 ml–Kolben und 125 ml–Füllvolumen bei 130 min<sup>-1</sup> und 20 mm Schütteldurchmesser.

## C Kooperierende Arbeiten

Die vorgestellten Arbeiten am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover (TCI) entstanden im Rahmen eines drittmittelfinanzierten Forschungsprojekts der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. innerhalb der Zentralen–Innovationsoffensive–Mittelstand des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit dem Industriepartner PreSens GmbH (Regensburg) durchgeführt. Für Publikationen wurden praktische Arbeiten von anderen Wissenschaftlern durchgeführt dessen relativer Anteil an der Gesamtarbeit in Tab. C. 2 (S. 105) aufgeführt sind. Im Rahmen des Gesamtprojekts wurde ein Teil der praktischen Arbeiten für eine studentische Abschlussarbeit zur Verfügung gestellt. Die Tätigkeiten hierzu entstanden nach Vorgabe von und in Zusammenarbeit mit dem Autor. Die beteiligten Personen wurden ggf. im Text erwähnt. Eine Auflistung der unterstützenden

Tätigkeiten ist Tab. C. 1 (S. 105) zu entnehmen.

**Tab. C. 1** Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt.

<b>Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt</b>	<b>Beteiligte Personen</b>
Bereitstellung von Sensoren und Single-use Schüttelkolben	Dr. Gernot John, Dr. Michael Findeis (PreSens GmbH)
Auswertung cytometrischer Daten	André Jochums (TCI)
Online-Monitoring von <i>E. coli</i> in nanoporösen Silizium-Wafern	Dr. Nadav Ben-Dov (Technion Haifa)
Umsetzung technischer Zeichnungen der Dosagemodulprototypen in ein CAD-Modell	Thorsten Stempel (TCI)
Entwicklung der Elektronik für das Dosagemodul	Thorleif Hentrop, Andreas Kosterke
Programmierung des Regleralgorithmus des Dosagemodul	Dr. Patrick Lindner (TCI)

**Tab. C. 2** Unterstützende Tätigkeiten am Gesamtprojekt.

<b>Publikation</b>	<b>Mitautor</b>
„Application of an Online-Biomass Sensor in an Optical Multisensory Platform Prototype for Growth Monitoring of Biotechnical Relevant Microorganism and Cell Lines in Single-Use Shake Flasks“ in Sensors MDPI	Dr. Jörg Schmidt-Hager (5 %)
„Online analysis of protein inclusion bodies produced in <i>E. coli</i> by monitoring alterations in scattered and reflected light“ in Applied Microbiology and Biotechnology	André Jochums (10 %), Dr. Nadav Ben-Dov (15 %), Dr. Zhaopeng Li (5 %)
„New perspectives in shake flask pH control using a 3D-printed control unit based on pH online measurement“ in Sensors and Actuators B	Thorleif Hentrop (10 %), Dr. Patrick Lindner (10 %), Dr. Tim Lücking (5 %)

## D Lebenslauf des Autors

---

### **Persönliche Daten**

Name	Christian Ude
geboren am	24.06.1988
Geburtsort	Bad Gandersheim
Wohnort	Ginsterweg 1, 30880 Laatzen
Kontakt	info@ude-technology.de

---

### **Beruf**

seit 2016 Mitarbeiter der PreSens GmbH in Regensburg, Deutschland

### **Studium**

2013 Verleihung des Karl-Schügerl-Preises

2012-2016 Promotion im Fach Chemie an der Leibniz-Universität-Hannover

2012 Abschluss des Studienganges Life Science mit dem Grad: Master of Science (Abschlussnote: ausgezeichnet)

2010-2012 Masterstudium Life Science an der Leibniz-Universität-Hannover

2007-2010 Bachelorstudium Life Science an der Leibniz-Universität-Hannover (Abschlussnote: ausgezeichnet)

### **Schulische Ausbildung**

2007 Verleihung des GDCh-Abiturientenpreis

2000-2007 Besuch des Gymnasiums und der gymnasialen Oberstufe an der Albert-Einstein-Schule mit Abschluss des Abiturs (Abschlussnote: 1,3)

### **Mitgliedschaften**

seit 2012 Dechema Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie

seit 2007 Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.

### **Ehrenamtliche Tätigkeiten**

2008-2012 Aktives Mitglied des Fachrates Chemie-Biochemie-Life Science der Leibniz-Universität-Hannover (Tutoren- und Serviceteam, studentische Vertretung in universitären Gremien)