

Nutzung von Sensor Spots zur Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration in Single-use Systemen im Labormassstab

Rüdiger W. Maschke¹, Sören Werner¹, Mischa Stalder¹, Valentin Jossen¹, Dieter Eibl¹

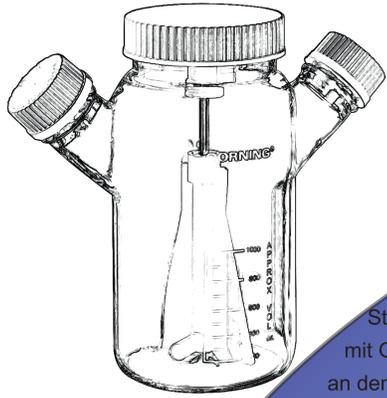
¹ Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Institut für Chemie und Biotechnologie, Fachstelle Bioverfahren- und Zellkulturtechnik, Wädenswil, Schweiz

Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften

Life Sciences und Facility Management
ICBT Institut für Chemie und Biotechnologie

Einleitung

Der optimale Einsatz von biotechnologischen Verfahren setzt die genaue Kenntnis des verwendeten Systems voraus. Im Falle von aeroben Kultivierungen spielt das Messen und die Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration eine entscheidende Rolle. Klassische Sauerstoffsonden widersprechen dabei dem *ready to use* Prinzip der Single-use Systeme. Eine Alternative stellen sogenannte Sensor Spots dar, wenige Millimeter kleine Messpunkte, welche im System integriert über Peripheriegeräte ausgelesen werden können. In der folgenden Posterpräsentation wird die Anwendung von Sensor Spots an vier Single-use Systemen im Labormassstab demonstriert.



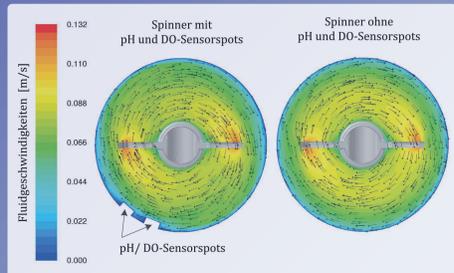
Spinnerflasche

Anwendungsbeispiel:

Für die online Prozessüberwachung der Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) wurden Einweg Spinnerflaschen mit Gelöstsauerstoff- und pH- Sensor Spots versehen und an den ShakeFlaskReader von PreSens angeschlossen [1].

Ergebnisse:

Es konnte gezeigt werden, dass das Hinzufügen von Sensor Spots in das Kultivierungsgefäss keine nennenswerten Veränderungen im Strömungsprofil und in den Fließgeschwindigkeitsgradienten verursacht. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass das Öffnen des Systems während der Probenahme den Gasaustausch intensiviert, was zu einem signifikanten Anstieg der Gelöstsauerstoffkonzentration im System führte [1].



Vergleich der Strömungsprofile in einer Corning® Spinnerflasche mit und ohne integrierten Sensor Spots, nach Jossen et al. [1]. Ein signifikanter Unterschied im Strömungsverhalten und in den Geschwindigkeitsprofilen ist nicht feststellbar.

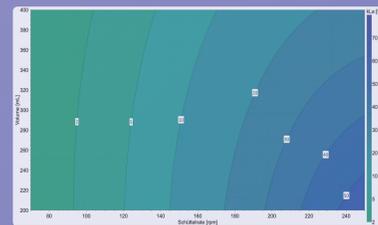
TubeSpin®

Anwendungsbeispiel:

Ermittlung von volumetrischen Sauerstofftransferkoeffizienten ($k_L a$ -Werten) bei unterschiedlichen Schüttelraten und Füllvolumina in 50 mL und 600 mL TubeSpin® Bioreaktoren

Ergebnisse:

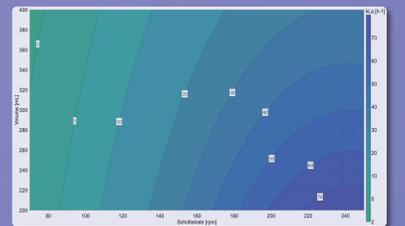
Die maximal erreichten $k_L a$ -Werte lagen bei über 60 h^{-1} (200 mL Füllvolumen, 50 mm und $> 200 \text{ rpm}$) im TubeSpin® 600 und bei über 20 h^{-1} im TubeSpin® 50 (275 rpm, 50 mm, 30 mL)



Der volumetrische Sauerstofftransferkoeffizient $k_L a$ in Abhängigkeit von der Schüttelrate und dem Füllvolumen im TubeSpin® 600 mL Bioreaktor. Oben mit 25 mm Schüttelamplitude, rechts mit 50 mm Schüttelamplitude

Gemessene $k_L a$ -Werte im TubeSpin 50 bei unterschiedlichen Schüttelraten, Amplituden und Füllvolumina, nach [2]

Schüttelrate [rpm]	Amplitude [mm]	Füllvolumen [mL]	$k_L a$ [h^{-1}]
150	25	10	1.1
150	50	10	1.9
175	50	20	5.3
200	50	20	6.4
200	25	10	2.9
225	50	10	6.7
250	25	20	4.2
250	50	10	8.6
275	50	30	21.1



Sensor Spots

Grösse: 5 mm
Messbereich:
0 bis 100 % O_2
Genauigkeit:
 $\pm 0.05 \text{ \% O}_2$ bei 0.21 \% O_2
 $\pm 0.4 \text{ \% O}_2$ bei 20.9 \% O_2

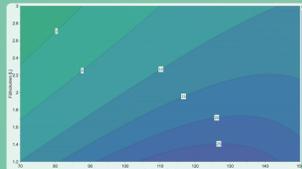
Thomson Optimum Growth Kolben™

Anwendungsbeispiel:

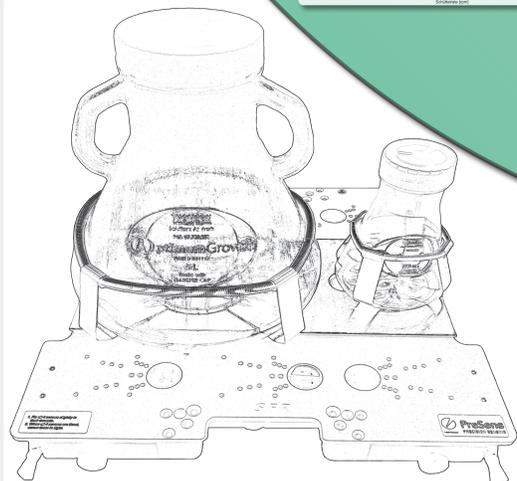
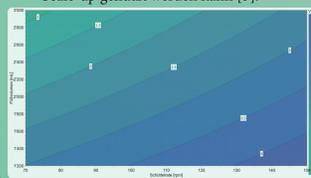
Ermittlung von $k_L a$ -Werten bei unterschiedlichen Schüttelraten und Füllvolumina in 500 und 5000 mL Thomson Optimum Growth™ Schüttelkolben sowie Anwendung der gewonnenen Werte zur Kultivierung von *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen.

Ergebnisse:

Wie erwartet, konnten die höchsten $k_L a$ -Werte ($> 25 \text{ h}^{-1}$) bei höheren Schüttelraten ($> 100 \text{ rpm}$) und niedrigen Füllvolumina ($< 1.5 \text{ L}$) erreicht werden. Im Falle des 5 L Kolbens mit 50 mm Amplitude führten Kombinationen, welche einen hohen $k_L a$ -Wert begünstigten, ebenfalls zu höheren Zelldichten ($> 4 \cdot 10^6$ Zellen). Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht bei allen untersuchten Systemen beobachtet werden [3].



Links: $k_L a$ -Werte (bestimmt nach [4]) in Abhängigkeit von der Schüttelrate und dem Füllvolumen in 500 mL und 5 L Thomson Optimum Growth™ Schüttelkolben [5].
Unten: Maximale viable Zelldichte einer CHO XM 111-10 Kultur unter den zuvor charakterisierten Bedingungen, welche ebenfalls für einen $k_L a$ -basierten Scale-up genutzt werden kann [3].



Weitere Bioreaktoren

Erlenmeyerkolben:

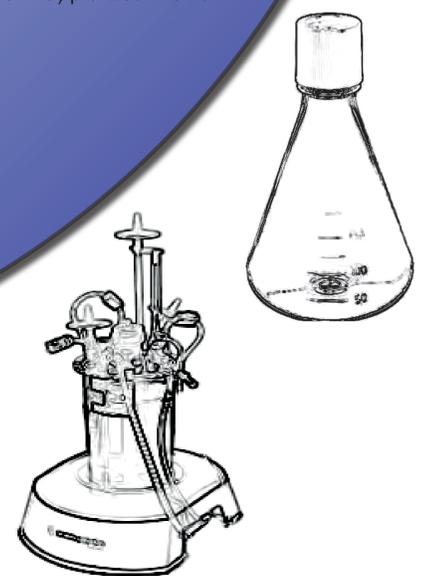
Die $k_L a$ -Werte wurden bei unterschiedlichen Schüttelraten und Füllvolumina in 500 mL Corning® Single-use Schüttelkolben ermittelt. Des Weiteren wurde die Sauerstoffaufnahme (*oxygen uptake rate* OUR) für tierische und pflanzliche Zellen bestimmt. Für CHO XM111-10 Zellen betrug diese $2.8 \cdot 10^{-13} \text{ mol O}_2 \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$, für die pflanzlichen *Nicotiana tabacum Bright Yellow 2* (BY2) Zellen $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol O}_2 \text{ Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [6].

UniVessel® SU:

Der Single-use Rührreaktor UniVessel® SU von Sartorius Stedim Biotech verfügt über integrierte Sauerstoff und pH-Wert Sensor Spots im Reaktorboden sowie über Anschlüsse für „klassische“ Sonden im Deckel. Grebe et al. verglichen die gemessenen Gelöstsauerstoffkonzentrationen beider Sensorarten und stellten in ihren Experimenten (Reinstwasser bei 37 °C) praktisch keinen Unterschied fest [7].

Schüttelrate [rpm]	Füllvolumen [mL]	$k_L a$ [h^{-1}]
80	200	0.72
120	50	18.96
160	150	7.08
160	250	8.28
210	50	38.4
250	100	44.28
250	200	39.24

Gemessene $k_L a$ -Werte im 500 mL Erlenmeyerkolben bei unterschiedlichen Schüttelraten und Füllvolumina, links bei 25 mm Amplitude, rechts bei 50 mm, nach [6]



Zusammenfassung

Sensor Spots stellen eine einfach anwendbare Alternative für die Gelöstsauerstoffkonzentrationsmessung in durchsichtigen Single-use Gefässen im Labormassstab dar. Mit ihrer Hilfe können $k_L a$ -Werte bestimmt und die Sauerstoffkonzentration im System online überwacht werden. Durch die geringe Grösse wird das Strömungsprofil der Systeme dabei praktisch nicht verändert, die Vergleichbarkeit mit „klassischen“ Sonden ist ebenfalls gewährleistet.

Referenzen

- [1] V. Jossen, C. Schirmaier, G. T. John, D. Eibl, and R. Eibl, "On-line-pH und -DO-Messungen in Mikrocarrier-basierter hMSC-Kultur", *BIOspektrum*, no. 4, pp. 422-424, 2015
- [2] T. Backoff, J. Malig, S. Werner, D. Eibl, and G.T. John, "Where does the oxygen go? $k_L a$ measurement in bioreactors", *G.I.T. Lab. J.*, vol. 9, no. 10, pp. 21-22, Oct. 2012
- [3] J. Meister, R.W. Maschke, S. Werner, E. Abellan, N. Stichling, D. Egger and D. Eibl, "Cultivation of CHO Cells in Thomson Optimum Growth™ Shake Flasks and Scale-up", Conference Poster, <http://dx.doi.org/10.21256/zhaw-1151>, Sep. 2016
- [4] W. Meusel, C. Löffelholz, U. Husemann, T. Dreher, G. Greller, J. Kauling, D. Eibl, S. Kleebank, J. Bauer, R. Glöckler, P. Huber, W. Kuhlmann, G. T. John, S. Werner, S. C. Kaiser, R. Pörtner, and M. Kraume, "Recommendations for process engineering characterisation of single-use bioreactors and mixing systems by using experimental methods", ISBN: 978-3-89746-171-0, 2016
- [5] J. Meister, R.W. Maschke, S. Werner, G.T. John, and D. Eibl, "How to Efficiently Shake Viscous Culture Broths", *Genet. Eng. Biotechnol. N.*, vol. 36, no. 15, Sep. 2016
- [6] J. Malig and T. Backoff, "Untersuchungen zum Mischverhalten, Sauerstofftransfer und zur Sauerstoffaufnahme von tierischen Zellen, pflanzlichen Zellen und Insektenzellen in orbital geschüttelten Einwegbioreaktoren", Masterarbeit Hochschule Anhalt und Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften, Jan. 2012
- [7] A. Grebe, C. Fenge, and J.-F. Chaubard, "Single-Use, Stirred-Tank Bioreactors - Efficient Tools for Process Development and Characterization", *Bioprocess Int.*, no. 12., pp. 7-9

Poster Download:



<http://dx.doi.org/10.21256/zhaw-1152>

Kontakt:

ZHAW, Institut für Chemie und Biotechnologie
Rüdiger W. Maschke
Campus Grüental
CH-8820 Wädenswil
Tel: +41 (0) 58 934 54 83
Mail: ruediger_maschke@zhaw.ch
Web: www.zhaw.ch/lsvm