





Hochschule für Angewandte  
Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

Masterarbeit im Studiengang pharmazeutische Biotechnologie

# **Online-Überwachung der Sauerstoffaufnahme- rate (OUR) in CHO Kultivierungssystemen**

zur Erlangung des Grades

Master of Science

vorgelegt von B. Sc. Katharina Dahlmann

geboren am [REDACTED] in [REDACTED]

Matrikelnummer:

[REDACTED]

Hannover, August 2017

Referent : Dr. Gesine Cornelissen

Korreferent: Dr. Dörte Solle



„Der Teufel steckt im Detail.“

Spruchwort seit 1940, [1]



# Inhaltsverzeichnis

Eidesstaatliche Erklärung .....	4
Abkürzungsverzeichnis .....	5
1. Einleitung und Zielsetzung .....	1
2. Grundlagen .....	2
2.1. CHO Zellkultivierung .....	2
2.2. Online Überwachung .....	4
2.3. Messung des Sauerstoffpartialdrucks .....	7
2.4. Sauerstoffübertragung.....	9
2.4.1. Der Sauerstoffübertragungskoeffizient $k_{La}$ .....	10
2.4.2. Die Sauerstoffaufnahme OUR .....	15
2.5. Design of Experiments .....	19
2.5.1. Definition der Einflussgrößen .....	19
2.5.2. Versuchsplanung.....	19
2.5.3. Rohdatenanalyse .....	20
2.5.4. Regressionsanalyse .....	21
2.5.5. Güteprüfung des Modells .....	22
3. Methoden .....	24
3.1. Bestimmung der Henry-Koeffizienten.....	24
3.2. Versuchsplan zur Bestimmung des $k_{La}$ -Wertes.....	25
3.3. Bestimmung des $k_{La}$ -Wertes.....	26
3.3.1. Ausgasungsmethode .....	26
3.4. Dynamische Methode zur Bestimmung des $k_{La}$ und der OUR.....	32
3.5. Bestimmung der qOUR .....	33
3.6. Online OUR.....	33
4. Ergebnisse und Diskussion.....	36
4.1. Bestimmung des $k_{La}$ - Wertes.....	36

4.1.1.	Analyse der Einflussparameter und Bestimmung der Parametergleichung des $k_{La}$ -Wertes über Multilineare Regression .....	36
4.1.2.	Modellbildung zu den Daten des zellfreien Modellsystems.....	38
4.1.4.	Kultivierung .....	46
4.2.	Vergleich der Modelle.....	51
4.3.	Vergleich Modellsystem PBS mit dem Kultivierungsmedium .....	55
4.4.	Online Bestimmung der OUR und qOUR .....	57
4.4.1.	Bestimmung der OUR und qOUR aus den Modellen.....	57
4.4.2.	OUR Bestimmung über die Dynamische Methode als Referenz.....	59
4.4.3.	Vergleich der online OUR Modelldaten mit Referenz Daten .....	60
5.	Zusammenfassung und Ausblick .....	62
	Anhang.....	1
	Danksagung .....	1
1.	Material .....	1
1.1.	CHO Zell Kultivierung.....	1
1.2.	Material und Geräte .....	1
1.3.	Chemikalien und Kulturmedien .....	2
1.4.	Software .....	3
2.	Abbildungsverzeichnis.....	3
3.	Tabellenverzeichnis.....	6
4.	Literaturverzeichnis .....	7
5.	Versuchsplan für die $k_{La}$ -Wert Bestimmung.....	9
6.	Berechnung des Henry-Koeffizienten über die Formel der Temperaturabhängigkeit.....	10
7.	Herleitung der Analogiedes Sauerstoffübertragungsverhalten über ein Elektrotechnisches Ersatzschaltbild.....	11
8.	Matlab Skripte.....	16
8.1.	$k_{La}$ über $PT_3$ System .....	16
8.2.	Ermittlung der empirischen Parameter für Van't Riet-Gleichung .....	19

8.3.	online OUR.....	19
9.	Weitere Auswertungsmethoden zur $k_{La}$ -Wert Bestimmung.....	19
9.2.	$k_{La}$ fit .....	19
9.3.	$k_{La}$ Ln .....	22
10.	Ergebnisse zur Bestimmung der Zeitkonstante $T_M$ der pO <sub>2</sub> - Sonde .....	26
11.	Ergebnisse der $k_{La}$ -Werte Bestimmung durch Annäherung an das PT <sub>3</sub> -Übertragungssystem.....	26
12.	Koeffizienten des MLR Modells aus den $k_{La}$ Werte der Näherung über das PT <sub>3</sub> -System.....	27

## Eidesstaatliche Erklärung

Diese Arbeit wurde in Kooperation des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover, Deutschland, mit der Hochschule für Angewandte Wissenschaften, Hamburg, Deutschland, in der Zeit von 01.03.2017 bis 31.08.2017 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Der Verfasser versichert, die vorliegende Arbeit eigenständig durchgeführt und alle verwendeten Hilfsmittel angegeben zu haben. Fremde Gedanken sind als solche kenntlich gemacht worden.

---

Katharina Dahlmann

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebenes Wort/ Wortgruppe	Ggf. Übersetzung
$a'$	Mittlere spezifische Austauschfläche	
$A$	Austauschfläche $\hat{=}$ Gasblasenoberfläche	
$A_{Kat}$	Fläche an der Kathodenspitze	
$b$	Dicke der Teflon -Membran	
$c_{AF}$	Antischaumkonzentration	
$c_{Gi}^*$	Thermodynamischer Gleichgewichtszustand auf der Seite der Gasphase G	
$c_{Gi}$	Konzentration der Komponente i in der Gasphase G	
$c_G$	Konzentration im Kern der Gasphase	
CHO	Chinese hamster ovary	
$c_{Li}$	Konzentration der Komponente i in der Flüssigphase L	
$c_{Li}^*$	Thermodynamischer Gleichgewichtszustand auf der Seite der Flüssigphase G	
$c_L$	Konzentration im Kern der Flüssigphase	
$c_{OL}$	Konzentration des Sauerstoffs in der Flüssigphase	
$c_L^*$	Konzentration in der Flüssigphase im Gleichgewichtszustand	
$c_{NL}$	Stickstoffkonzentration in der Flüssigphase	
$c_{NL max}$	Maximale Stickstoffkonzentration in der Flüssigphase	
$F$	Faraday Konstante	
$F_{nG}$	Begasungsrate im Luftraum unter Normalbedingungen	
$F_{nG}$	Begasungsrate bezogen auf Normalbedingungen ( $T = 273.15 K, p = 101\,325 \frac{N}{m^2}$ )	
$F_x$	Begasungsrate mit dem Gas X	
H	Henry Verteilungskoeffizient	

Abkürzung	Ausgeschriebenes Wort/ Wortgruppe	Ggf. Übersetzung
$k_G$	Stoffübertragungskoeffizient von der Seite des Gases	
$k_L$	Stoffübertragungskoeffizient von der Seite der Flüssigkeit	
$K_L$	Gesamtstoffaustauschkoeffizienten	
$M_{N_2}$	Molare Masse von Stickstoff	
$M_{O_2}$	Molaremasse von Sauerstoff	
$n$	Anzahl der Blasen	
$n_{e^-}$	Anzahl der dreien Elektronen durch die chemische Reaktion	
$n_{O_2}$	Sauerstoffstromdichte	
$n_{O_2}$	Volumenbezogener Stoffstrom	
$N_{St}$	Rührerdrehzahl	
$NTR$	Stickstoff Transfer Coefficient	
$NTR_{max}$	Maximale NTR	
OTR	Oxygen Transfer Rate	Sauerstoff-Transfer Rate
OUR	Oxygen Uptake Rate	Sauerstoffaufnahme-rate
PAT	Process analytical technology	Prozess-Analytische Technologie
$P_M$	Permeabilität für Sauerstoff durch die Teflon-Membran	
$p_{O_2}$	Sauerstoffpartialdruck	
$pO_2\%$	Sättigungsanteil des Sauerstoffpartialdrucks	
$pO_2\%$	Sauerstoffsättigungsanteil	
$pO_2(t)$	Aktueller Sauerstoffpartialdruck	
$pO_{2\ cal}$	Sauerstoffpartialdruck bei der Kalibrierung	
$pO_{2, max}\%$	Maximaler Sättigungsanteil für Sauerstoff über den gesamten Messverlauf	
$V_L$	Volumen der Flüssigphase	

<b>Abkürzung</b>	<b>Ausgeschriebenes Wort/ Wortgruppe</b>	<b>Ggf. Übersetzung</b>
$V_{nM}$	Molares Volumen bezogen auf Normalbedingungen	
$x$	Durchmesser der einzelnen Blase	
$x_{NG}$	Stickstoffanteil im Ingas	
$x_{O_{2in}}$	Sauerstoffanteil im Ingas	
$x_{O_{2out}}$	Sauerstoffanteil im Abgas	



## 1. Einleitung und Zielsetzung

In der modernen Biotechnologie werden Kultivierungsprozesse zumeist nur durch Kontrolle des pH-Wertes, der Temperatur und des Sauerstoffgehalts überwacht. Vereinzelt wird auch der Verlauf Nährstoffkonzentration gemessen. Für hohes Zellwachstum und eine hohe Produktausbeute sind jedoch viele weitere Prozessgrößen ebenfalls ausschlaggebend. Aussagen über die metabolische Aktivität der Zellen oder die Zellzahl selbst lassen sich meistens erst nach der Kultivierung machen, da eine Überwachungsmöglichkeit während der Kultivierung fehlt.

Eine dieser prozessrelevanten Größen zur Überwachung von biotechnologischen Prozessen ist die Menge des Sauerstoffs, der von den Zellen aufgenommen wird. Viele der in der Biotechnologie verwendeten Expressionssysteme für z.B. pharmazeutische Produkte sind auf Sauerstoff angewiesen. Mit steigender Produktivität im Kultivierungsverlauf steigt auch der Sauerstoffbedarf der Zellen. Eine aussagekräftige Größe zur Beurteilung der metabolischen Zellaktivität ist über die Sauerstoffaufnahme  $OUR$  und die zellspezifische Sauerstoffaufnahme  $qOUR$  möglich. Eine kontinuierliche Überwachung der Sauerstoffaufnahme  $OUR$  ist derzeit nur mit teurer Messtechnik wie Massenspektrometern und in mikrobiellen Kultivierung möglich. Für eine Aussage in Tierzellkultivierung sind bisher nur Methoden bekannt, die die Produktivität der Zellen stören können. Für eine effiziente Überwachung der metabolischen Aktivität ist eine Echtzeitbetrachtung des Sauerstoffverbrauchs gerade für Tierzellkultivierungen notwendig.

Ziel dieser Arbeit ist es eine online Bestimmung der Sauerstoffaufnahme ( $OUR$ ), der zellspezifischen Aufnahme ( $qOUR$ ) und des Sauerstoffübertragungskoeffizienten ( $k_L a$ ) in einer tierischen Zellkultivierung zu etablieren. Diese Größen sollen während der Kultivierung aus den Prozessparametern bestimmt werden ohne die Zellen dabei zu schädigen. Dafür die Systemcharakterisierung zur Bestimmung des Sauerstoffübertragungskoeffizienten ( $k_L a$ ) über Modellsysteme durchgeführt. Außerdem werden unterschiedliche Auswertungsmethoden, sowie Anwendungsmethoden während des Prozess verglichen.

## 2. Grundlagen

### 2.1. CHO Zellkultivierung

Chinese hamster ovary (Chinesischer Hamster Eierstock) oder CHO Zellen wurden 1957 das erste Mal charakterisiert und anschließend als Suspensionszelllinie CHO-K1 etabliert. Heute wird diese Zelllinie als Expression System für rekombinante Proteine genutzt. 60-70 % der rekombinant hergestellten Proteine der Biopharmazeutika werden in Säugetierzellen produziert [2], 70 % davon durch den Einsatz von CHO-Zellen [3]. Die Glykosylierung der produzierten rekombinanten Proteine ist nachweislich dem des human-Produktes entsprechend bzw. diesem sehr nah. [4]

Als Suspensionskultur liegen die Zellen in der Flüssigkeit als Einzelzellen vor [3] oder sammeln sich auch in kleinen Aggregaten an. Säugetierzellen besitzen keine stabile Zellwand. Nur die empfindliche Zellmembran schützt die Zelle vor physikalischen oder mechanischen äußeren Einflüssen. Daher ist die Anpassung der Kultivierungsbedingungen durch das passende Kultivierungsmedium, die Begasungsrate, die Rührerdrehzahl und die Rührergeometrie von entscheidender Bedeutung für die Gesundheit bzw. das Wachstum der Zellen. Das Kultivierungsmedium sollte genau dem osmotischen Druck der Ursprungsumgebung der Zellen von 250 bis 400 mOsm entsprechen. Das Rühr- und Begasungssystem steht vor der Herausforderung für eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen bei optimaler Durchmischung des Reaktors zu sorgen, ohne die scherempfindlichen Zellen zu beschädigen. [4]

Am Institut für Technische Chemie wurde ein Benchmark-Prozess zur Kultivierung von tierischen Zellen im 7.5 L Maßstab erfolgreich etabliert. Für die Kultivierung der Zellen wird ein 15L CSTR (continuos stirred tank reactor) Bioreaktor vom Typ C + der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH genutzt. Dieser Prozess lässt sich in drei Fütterungsphasen unterteilen: Batch, Fed-batch 1 und Fed-batch 2. Die Kultivierung in der Batchphase ist auf zwei Tage begrenzt und wird am dritten Tag durch die Fed-batch-Phase 1 durch eine tägliche Fütterung von Feed-Medium abgelöst. Die Fed-batch 2 beginnt, sobald die Glucose Konzentration auf etwa 0.6 g/L abgesunken ist. Ab diesem Zeitpunkt startet eine automatisierte Glucose-Regelung. Ein schematischer Verlauf der Phasen ist in Abb. 1 dargestellt.

Die Zellen wachsen zunächst exponentiell. Für das Wachstum brauchen die Zellen Sauerstoff, der Verbrauch des Sauerstoffs wird im Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate *OUR* wiedergegeben. Durch Limitierungen im Bioprozess geht das Wachstum der Zellen

von der exponentiellen in die stationäre Phase über. In dieser Phase stoppen die Zellen die Vermehrung und gehen in den Erhaltungsstoffwechsel über. Die stationäre Phase ist gefolgt von der Sterbe-Phase in der die Zellen anfangen zu lysieren. Der Übergang von der stationären Phase in die Sterbe-Phase lässt sich anhand des Wendepunkts der *OUR* erkennen. Dieses Indiz kann z.B. für die Effizienz der Prozessplanung genutzt werden, um zu entscheiden ab wann der Prozess abgebrochen werden kann, da sich das Absterben der Zellen ankündigt.

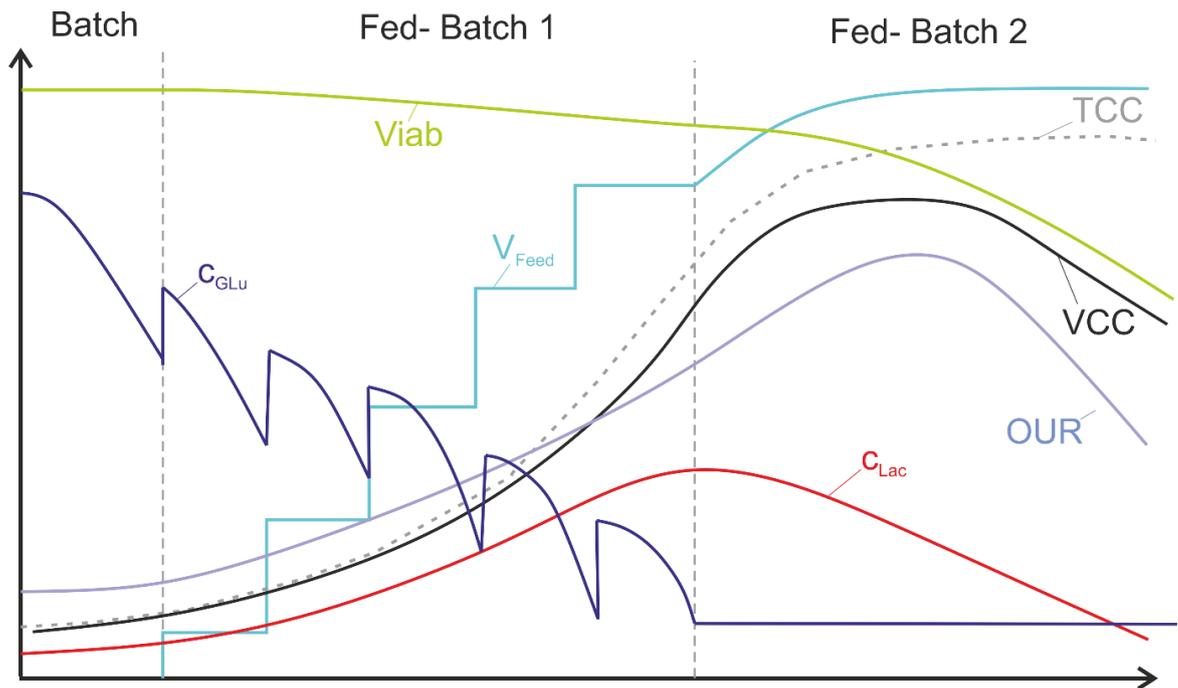


Abb. 1 - Schematische Darstellung der Fütterungsstrategie des Benchmark Prozesses

Über den gesamten Prozess werden pH und  $pO_2$  geregelt. Das pH-Optimum von 7.1 wird über die Zugabe von Natriumcarbonat ( $Na_2CO_3$ ) geregelt. Der Sauerstoffanteil soll auf 40% gehalten werden. Die Regelung des  $pO_2$  beginnt über die erste Kaskade durch das Mischen von Sauerstoff und Luft, über deren Begasungsraten. Sobald fast ausschließlich mit Sauerstoff begast wird, wird die Begasungsrate  $F_{nG}$  von  $24 \text{ L h}^{-1}$  auf  $60 \text{ L h}^{-1}$  angehoben. Die Regelung wird erneut über das Begasungsverhältnis und damit dem Sauerstoffanteil im Ingas geregelt (2. Kaskade). Als dritter und letzter Kaskadenschritt wird die Rührerdrehzahl  $N_{St}$  zwischen 100 und 200 rpm variiert. Der Verlauf der  $pO_2$ -Regelung während der Kultivierung ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.

Nach etwa 15 Tagen endet die Kultivierung, wobei sich die Zelldichte durch diese Strategie auf etwa  $32 \times 10^6 \text{ Zellen mL}^{-1}$  erhöht hat, mit einer Viabilität von etwa 60%.

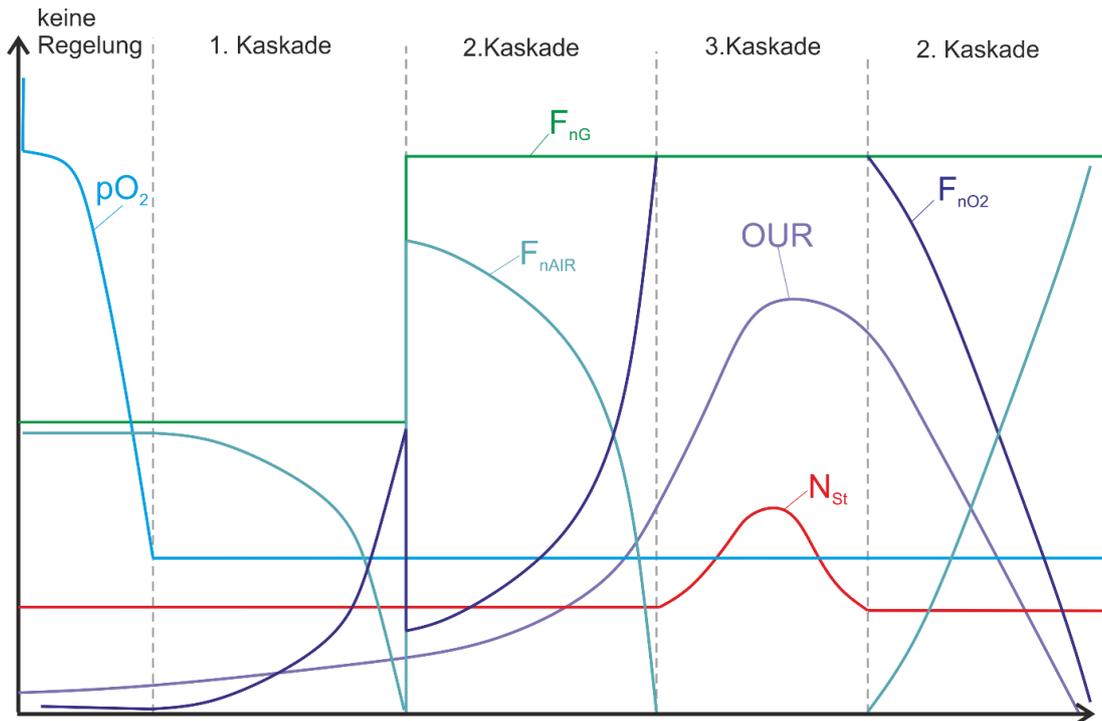


Abb. 2 – Schematischer Verlauf der  $pO_2$ -Regelung des Benchmark Prozesses

## 2.2. Online Überwachung

Die Process analytical technology (PAT) versucht über den Einsatz von verschiedenen Techniken und Methoden eine zeitnahe Erfassung stoffspezifischer Parameter in der Verfahrenstechnik und in Umweltprozessen zu ermitteln. Um eine Prozessoptimierung bzw. eine konstante Produktqualität zu erzielen, werden Informationen zu stoffspezifischen und qualitätsrelevanten Daten der Prozesse gesammelt. Man differenziert hierbei

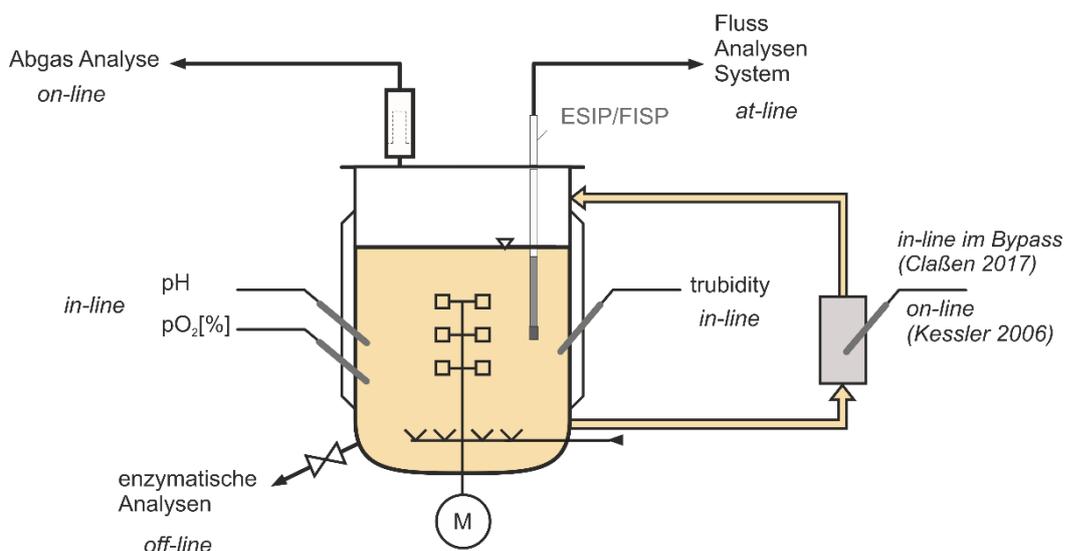


Abb. 3 – Veranschaulichung der Messcharakterisierung an einem beispielhaften Bioprozess [5], [8]

die folgenden Messmethoden: online, inline, atline und offline. Die Messmethoden der online und inline Messungen werden in der Literatur häufig synonym verwendet [5].

Während der Kultivierung werden unterschiedliche Messverfahren genutzt um den Prozess zu überwachen. Die Zelldichte wird online über die Aber® Futura Sonde und offline über das Zellzählsystem CEDEX® gemessen. Die Viabilität wird offline über CEDEX® bestimmt, die Glucose- und die Lactatkonzentration atline über das TRACE® System und offline über das YSI® aufgezeichnet. Zur Betrachtung weiterer unterschiedlicher Prozessgrößen werden verschiedene Spektrometer wie UV/VIS, NIR und 2D-F eingesetzt. Die online Abgase-Analyse wird mithilfe des Blue-Vis® Sensors vorgenommen. Eine Regelung des pH-Wertes und des  $pO_2$  ist über die Messergebnisse der inline-Messung der entsprechenden Sonden möglich (vgl. Abb. 3).

Die Messungen lassen sich wie folgt charakterisieren:

**Online-Messung:** Bedingung für online-Messsystem ist, dass der Zeitverzug zwischen der Messung inkl. Auswertung und dem Übersenden der Daten an den Zentralrechner bzw. das Prozessleitsystem kleiner ist, als die Zeit in der sich die Prozesseigenschaften ändern. Diese Messungen werden automatisch über einen kontinuierlichen Probenstrom, oft im Bypass, in der Prozessumgebung vorgenommen und ausgewertet. Die online-Messung zeichnet sich durch eine kontinuierliche Korrelation zwischen Messergebnissen und den Prozesseigenschaften bzw. Produkteigenschaften aus. Die Steuerung oder Regelung, die aus den Messdaten erfolgt, wird ohne große Zeitverzögerung gewährleistet. Die meisten inline- und atline-Messungen werden durch das Messen einer kontinuierlichen Größe als online eingestuft, da die Messverzögerungszeit im Vergleich zur Änderungszeit der gemessenen Größe im System sehr gering ist [6].

**Inline-Messung:** Die Messstelle befindet sich direkt im Messstrom (invasive) und es ist keine manuelle Probenahme notwendig [7]. Dabei ist die Positionierung der Messsonde entscheidend, sie muss so gewählt werden, dass sie das homogen durchmischte System repräsentiert [6], [7]. Wie bei der Onlinemessung befindet sich die Analyseeinheit in unmittelbarer Prozessnähe, so dass auch hier die Auswertung und die daraus bedingte Steuerung des Prozesses ohne große Zeitverzögerung erfolgen können. Werden Messungen dieser Klassifizierung im Bypass vorgenommen, besteht das Risiko, dass sich die Messung durch die Abweichung der Temperatur und des Sauerstoffgehalts im Vergleich zur Inprozessmessung verändert und daher abweicht [7].

**Atline-Messung:** Die Probe für die Messung wird hier von der Prozessumgebung entfernt und in unmittelbarer Nähe vermessen und ausgewertet. Die Probenahme geschieht dabei automatisch. Durch den entstehenden Zeitverzug kann sich das Produkt ändern. Die Ergebnisse der Messungen lassen eine manuelle und automatische Steuerung des Prozessablaufes mit einer Zeitverzögerung zu. Für den Einsatz dieser Messungen werden häufig Filtrations-Module eingesetzt, diese nehmen häufig Einfluss auf die Probe und können dadurch nicht mehr repräsentativ für den Messzeitpunkt im Messsystem sein [6].

**Offline Messung:** Die Probe für die Messung wird aus der Prozessumgebung entfernt und zum Analysegerät transportiert. Die Messung ist diskontinuierlich. Ähnlich wie bei der atline Messung kann sich das Produkt über den Transport- und ggf. Lagerungszeitraum verändern. Für die Bestimmung des Zeitintervalls der Probenahme ist Expertenwissen essentiell, um abzuschätzen wie groß die Messabstände sein müssen, damit ggf. über eine manuelle Regelung in den Prozess eingegriffen werden kann oder Änderungen der detektierten Größe angemessen nachzugewiesen werden können. Gleichzeitig kann die Probennahme und die folgende Analyse flexibel gestaltet werden.

[6], [8], [9]

### 2.3. Messung des Sauerstoffpartialdrucks

Die Sauerstoffmessung in der Flüssigphase wird durch die kontinuierliche Messsignalfolge als inline Messung klassifiziert und ist neben der pH und Temperaturmessung die wichtigste und gängigste Messung in Bioprozessen[6]. Der Sauerstoffpartialdruck  $pO_2$  kann über eine amperometrische Messung oder eine faseroptische Messung bestimmt werden.

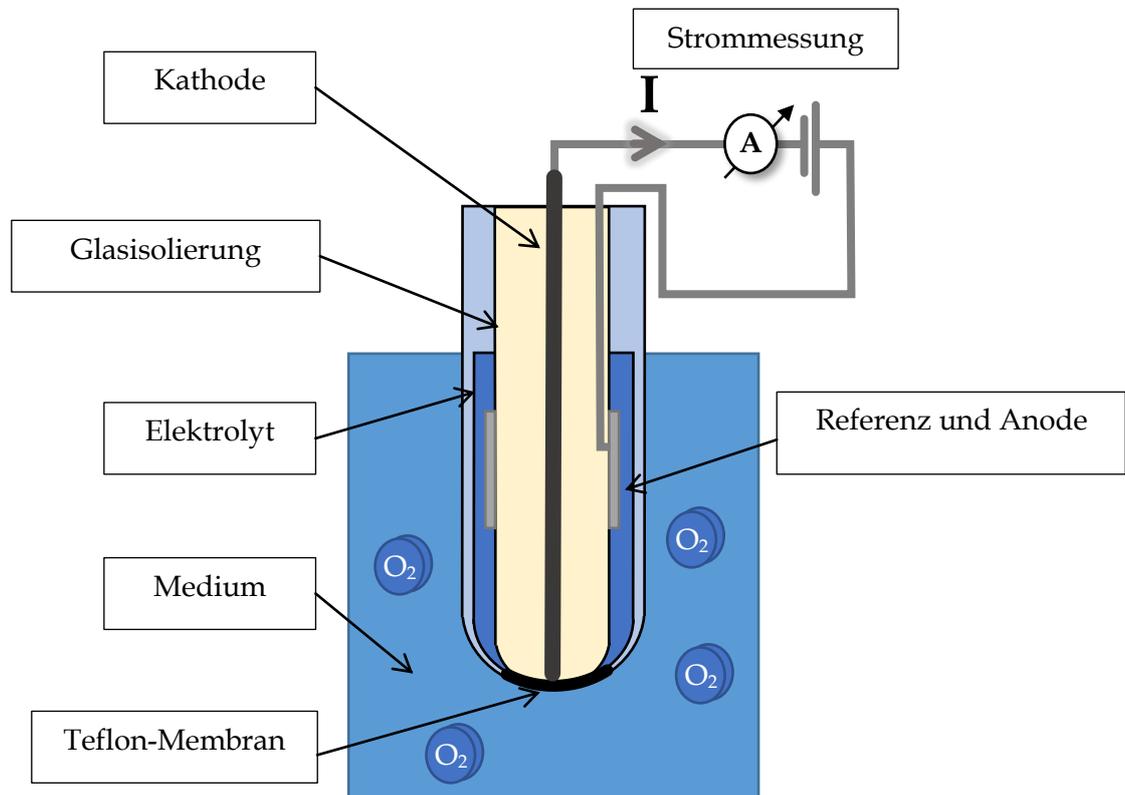
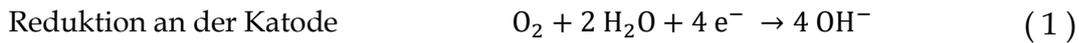


Abb. 4 - Aufbau einer Sauerstoffpartialdruck Sonde - nach dem Clark Messprinzip

Für die amperometrische Messung des Sauerstoffpartialdrucks nach Clark wird die in Abb. 4 gezeigte Aufbau genutzt. Die Clark-Elektrode besteht aus zwei Elektroden: einer Silber-Anode und einer Platin-Kathode. Die Platin-Kathode ist in Glas eingefasst. Nur die Spitze der Kathode wird in den umgebenen Elektrolyten exponiert. Der Elektrolyt ist eine halb-gesättigte KCl-Lösung zum Transport von freien Elektronen. Anode und Kathode werden durch eine Teflon-Membran von dem umgebenen Medium getrennt. Die Teflon-Membran ist semipermeabel für Sauerstoff. Dieser kann durch Diffusion in die Elektrolytlösung gelangen. Durch das Anlegen einer negativen Polarisationsspannung von  $-600\text{ mV}$  wird der gelöste Sauerstoff an der Oberfläche der Platin-Kathode reduziert. An der Silber-Silber-Chlorid-Anode werden die Elektronen dafür durch Oxidation frei und wandern zur Kathode. Diese Elektronenwanderung stellt das Messsignal dar.



Der Messstrom ist über folgende Formel proportional zum Sauerstoffpartialdruck:

$$I = n_{e^-} \cdot F \cdot P_M \cdot \frac{p_{O_2}}{b} \cdot A_{Kat} \quad (3)$$

$n_{e^-}$	-	Anzahl der freien Elektronen durch die chemische Reaktion	[-]
$F$	-	Faraday-Konstante	$\left[ \frac{As}{mol} \right]$
$P_M$	-	Permeabilität für Sauerstoff durch die Teflon-Membran	$\left[ \frac{mol}{mm^2 s} \right]$
$p_{O_2}$	-	Sauerstoffpartialdruck	[bar]
$b$	-	Dicke der Teflon-Membran	[mm]
$A_{Kat}$	-	Fläche an der Kathodenspitze	[mm <sup>2</sup> ]

[10]

Der  $p_{O_2}$  kann sowohl als Partialdruck in der [mbar] oder [mN m<sup>-2</sup>] angegeben werden oder als Sättigungsanteil zum Partialdruck der Kalibrierung in [%].

$$p_{O_2\%}(t) = \frac{p_{O_2}(t)}{p_{O_2 cal}} \cdot 100\% \quad (4)$$

$p_{O_2\%}$	-	Sauerstoffsättigungsanteil	[%]
$p_{O_2}(t)$	-	Aktueller Sauerstoffpartialdruck	[mbar]
$p_{O_2 cal}$	-	Sauerstoffpartialdruck bei der Kalibrierung	[mbar]

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass bei der Angabe des Sauerstoffsättigungsanteils, also dem Bezug des aktuellen Partialdrucks  $p_{O_2}(t)$  auf den zur Kalibrierung  $p_{O_2 cal}$ , folgende Nomenklatur verwendet wird:  $p_{O_2\%}(t)$ . Beim Bezug auf den Sauerstoffpartialdruck in [mbar] wird diese Nomenklatur verwendet:  $p_{O_2}(t)$ .

## 2.4. Sauerstoffübertragung

Für die Sauerstoffversorgung einer Kultivierung wird oft ein mit Luft oder Sauerstoff durchströmter Begasungsring - Sparger - im unteren Reaktor Drittel genutzt. Die Sauerstoffübertragung findet zwischen den Gasblasen und der Flüssigphase des Systems statt (vgl. Abb. 5). Die Löslichkeit von Sauerstoff in wässriger Lösung ist sehr gering und bedarf daher großer Aufmerksamkeit, um die Zellen mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Der Sauerstofftransfer von der Gasphase in die Flüssigphase findet durch Molekülbewegung statt. Der Konzentrationsunterschied der Gas-Flüssig-Phase ist die treibende Kraft. Der Sauerstoffeintrag wird in den meisten Kultivierungen durch den Leistungseintrag des Rührers und die Begasungsrate begünstigt. Über die Blasen wird eine große Austauschfläche über die Gasblasenoberfläche erzeugt. Der Konzentrationsunterschied wird durch die immer neu gebildeten Gasblasen hochgehalten.

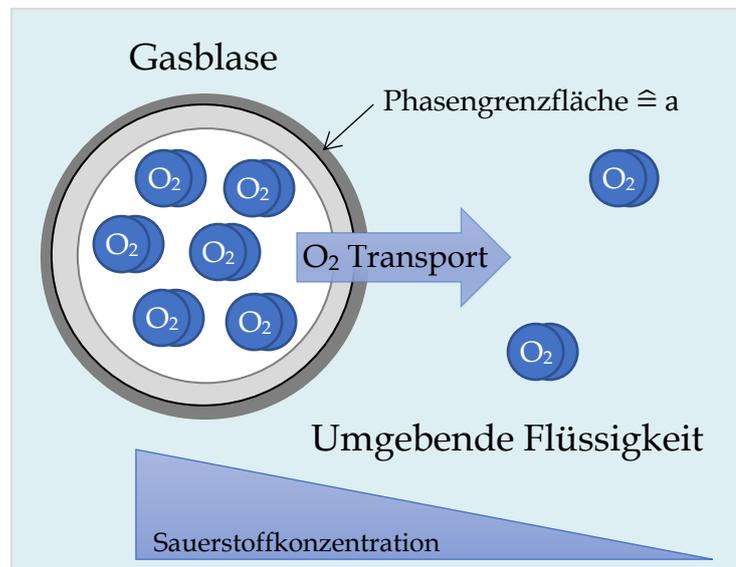


Abb. 5 - Gasblasen in Flüssigkeit mit Konzentrationsunterschied von Sauerstoff

Der Sauerstoff muss bei seinem Weg von der Gasblase durch die Flüssigkeit zur Zelle unterschiedliche Widerstände überwinden (vgl. Abb. 6 ):

1. Kern der Gasblase zur Grenzschicht Gas/Flüssigkeit
2. Grenzschicht Gas/Flüssigkeit
3. Das die Blase umgebende, nicht gemischte Flüssigkeitsgebiet
4. Das gut gemischte Flüssigkeitsgebiet
5. Das den Zellverband umgebende, nicht durchmischte Flüssigkeitsgebiet
6. Den Zellverband
7. Die Zellmembran und intrazelluläre Komponenten zu den Reaktionsplätzen

[4]

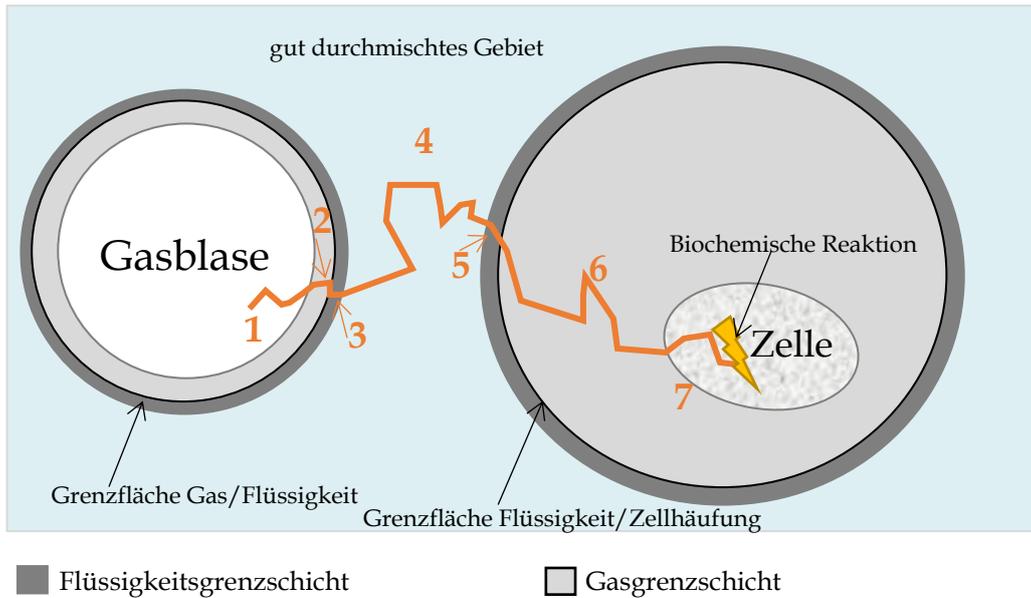


Abb. 6 - Schematische Darstellung der Widerstände beim Durchlaufen des Sauerstoffs auf seinem Weg von der Gasblase zu den Zellen/Zellverbund [28]

#### 2.4.1. Der Sauerstoffübertragungskoeffizient $k_{La}$

Für den Übergang des Sauerstoffs von der Gas- in die Flüssigphase muss zunächst der Widerstand der Gasblasengrenzschichten überwunden werden. Zur Betrachtung dieses Transportvorgangs wird das vereinfachte Modell der Zweifilmtheorie angenommen (siehe Abb. 7). Die Grenzschichten werden dabei in die Grenzschicht der Flüssigkeit und die des Gases unterteilt. Das Modell der Zweifilmtheorie beruht darauf, dass auf den beiden Seiten der Grenzflächen je ein stagnierender laminarer Fluidfilm entsteht. Durch diese beiden Filme findet der Stofftransport ausschließlich durch molekulare Diffusion statt. Der gesamte Transportwiderstand liegt dabei auf der Seite des Fluidfilms. [11], [12] Andere Stofftransportwiderstände, beispielsweise die durch die Zellen, werden komplett vernachlässigt [13]. An den Phasengrenzen wird ein thermodynamisches Gleichgewicht angenommen. In Abb. 7 ist rechts der Verlauf des resultierenden linearen Konzentrationsgradienten und der Transportkoeffizienten dargestellt. [11]

Die angenommenen laminaren Fluidströme können experimentell nicht nachgewiesen werden [4]. Aufgrund der verhältnismäßig simplen Berechnungsweise und der viel verbreiteten Modellbeschreibung, wird das Zweifilmmodell für die weiteren Betrachtungen

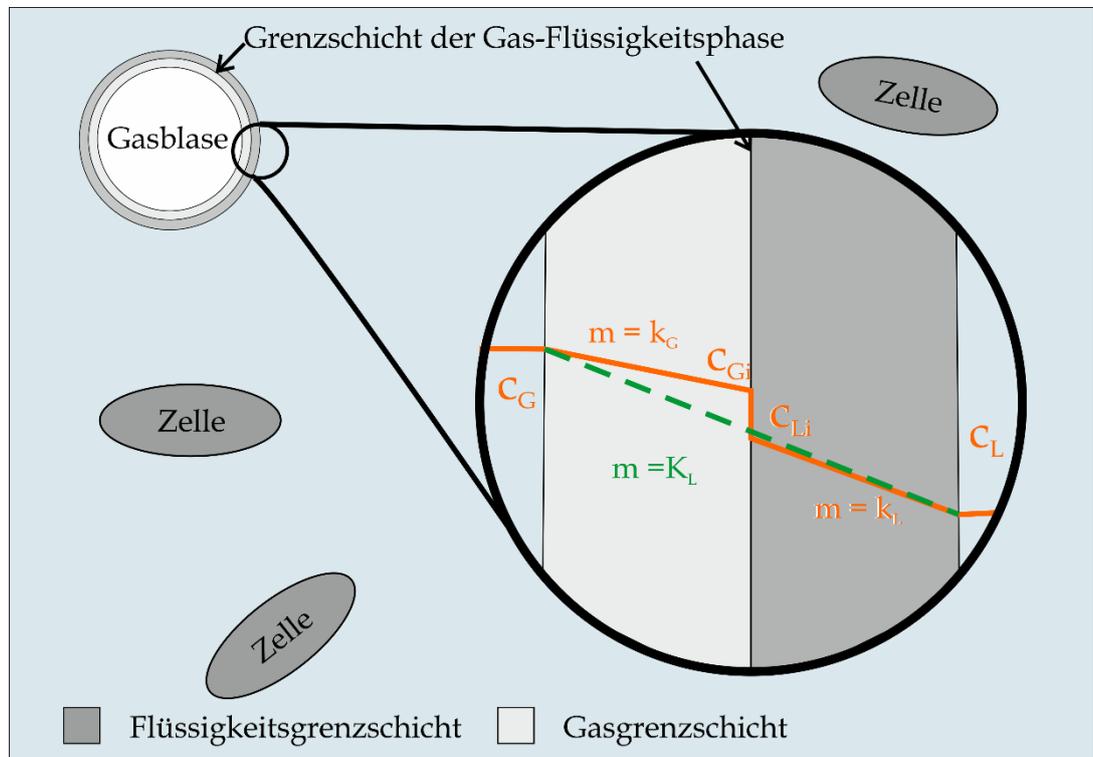


Abb. 7 Zweifilmtheorie – Schematische Darstellung der Sauerstoffkonzentration im Übergang von der Gas- in die Flüssigphase [4]

genutzt [13].

In der Grenzschicht der Flüssigkeit bzw. der Gasphase gilt folgende Beziehung für den Sauerstofftransport beschrieben durch die Sauerstoffstromdichte  $\dot{n}_{O_2}$ :

$$\text{Gasfilm:} \quad \dot{n}_{O_2 G} = k_G \cdot (c_G - c_{Gi}) \quad (5)$$

$$\text{Flüssigkeitsfilm:} \quad \dot{n}_{O_2 L} = k_L \cdot (c_L - c_{Li}) \quad (6)$$

$\dot{n}_{O_2}$	-	Sauerstoffstromdichte	$\left[ \frac{\text{g O}_2}{\text{m}^2 \text{ s}} \right]$
$k_G$	-	Stoffübertragungskoeffizient von der Seite des Gases	$\left[ \frac{\text{m}}{\text{s}} \right]$
$k_L$	-	Stoffübertragungskoeffizient von der Seite der Flüssigkeit	$\left[ \frac{\text{m}}{\text{s}} \right]$
$c_L$	-	Konzentration im Kern der Gasphase	$\left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right]$
$c_G$	-	Konzentration im Kern der Flüssigphase	$\left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right]$

Da die Grenzflächenkonzentration nicht gemessen werden kann, wird der Transportwiderstand über beide Schichten zusammen über den Gesamtstofftransportkoeffizienten  $K_L$  betrachtet. Die treibende Kraft für den Sauerstofftransport ist Konzentrationsdifferenz  $c_{OL}^* - c_{OL}$ . Dabei ist  $c_{OL}^*$  die Konzentration von Sauerstoff in der Flüssigphase, die im Gleichgewichtszustand mit der Gasphase entsteht. Sie lässt sich über das Henry Gesetz bestimmen [4], [14]:

$$H_n \cdot c_L^* = c_G \quad (7)$$

$$\text{bzw.} \quad c_{O_2}^* = c_{OL}^* = \frac{p_{O_2,G}^*}{H_{O_2}} \cong \frac{p_{O_2,G}}{H_{O_2}} \quad (8)$$

$c_{O_2}^*$	- Konzentration des Sauerstoffs im Gleichgewichtszustand	$\left[ \frac{\text{g O}_2}{\text{L}} \right]$
$c_{OL}^*$	- Konzentration des Sauerstoffs in der Flüssigkeit im Gleichgewichtszustand	$\left[ \frac{\text{g O}_2}{\text{L}} \right]$
$p_{O_2,G}^*$	- Sauerstoffpartialdruck im Gleichgewichtszustand in der Gasphase	[Pa]
$p_{O_2,G}$	- Messbarer Sauerstoffpartialdruck in der Gasphase	[Pa]
$H_{O_2}$	- Henry-Koeffizient für Sauerstoff	$\left[ \frac{\text{Nm}}{\text{kg}} \right]$

Solange die Konzentration in der Flüssigkeit  $c_{OL}$  die Sättigungskonzentration  $c_{OL}^*$  nicht erreicht, wird Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigphase transportiert[13].

Durch Zusammenfassung der Transportkoeffizienten  $k_L$  und  $k_G$  zu  $K_L$  wird die Sauerstoffstromdichte wie folgt beschrieben:

$$\dot{n}_{O_2L} = \dot{n}_{O_2} = K_L \cdot (c_{OL}^* - c_{OL}) \quad (9)$$

Der Gesamtstoffaustauschkoeffizienten  $K_L$  lässt sich über den folgenden Zusammenhang beschreiben:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{H^{cc} \cdot k_G} \quad (10)$$

Sauerstoff als gering lösliches Gas hat einen Henry-Koeffizienten  $H^{cc}$  größer als 1. Der Stoffübertragungskoeffizient von der Seite der Flüssigkeit ist deutlich kleiner als der Übertragungskoeffizient von der Seite des Gases. Man geht davon aus, dass kein gasseitiger Stofftransportkoeffizient berücksichtigt werden muss [15]. Es wird daher folgende Annahme getroffen:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{H^{cc} \cdot k_G} \quad | H^{cc} > 1 ; k_G \gg k_L$$

Daraus folgt:  $K_L = k_L$  (11)

Gleichzeitig geht aus dieser Betrachtung hervor, dass der Stofftransportwiderstand auf der Seite des Flüssigkeitsfilms liegt.

Überträgt man dieses Modell zur Berechnung des Sauerstofftransportes auf ein Bioreaktorsystem, müssen das gesamte Verhältnis der Austauschfläche  $A_G$  zum Flüssigkeitsvolumen  $V_L$  berücksichtigt werden:

$$\begin{aligned} \dot{n}_{O_2} &= k_L \cdot \frac{A_G}{V_L} \cdot (c_{OL}^* - c_{OL}) \\ &= k_L \cdot a \cdot (c_{OL}^* - c_{OL}) = k_L a \cdot (c_{O_2}^* - c_{O_2}) \end{aligned} \quad (12)$$

$\dot{n}_{O_2}$	-	Volumenbezogener Stoffstrom	$\left[ \frac{\text{g}}{\text{s m}^3} \right]$
$A_G$	-	Austauschfläche $\hat{=}$ Gasblasenoberfläche	$[\text{m}^2]$
$V_L$	-	Flüssigkeitsvolumen	$[\text{m}^3]$
$a$	-	Gas/Flüssigkeitsgrenzfläche pro Reaktorvolumen	$[\text{m}^{-1}]$

Die in Gleichung (11) betrachtete Näherung gilt auch für Gleichung (12).  $k_L$  beschreibt den Stofftransportkoeffizienten über beide Teilsysteme der Grenzschicht. Da die Austauschfläche für Sauerstoff schwer zu bestimmen ist, wird der Sauerstofftransportkoeffizient oft zu der Größe  $k_L a$  [ $\text{h}^{-1}$ ] zusammengefasst. In der Literatur wird häufig die Größe  $k_L a'$  betrachtet. Sie bezieht sich im Vergleich zu  $k_L a$  nicht auf das Flüssigkeitsvolumen, sondern auf das gesamte Reaktorvolumen mit Gas- und Flüssigphase.

Der volumenbezogene Stoffstrom  $\dot{n}_{O_2}$  ist eine örtliche Größe. Mittelt man diese Größe über das gesamte Reaktorvolumen, erhält man den Zusammenhang der Sauerstofftransportrate  $OTR$ :

$$\overline{\dot{n}_{O_2}} = OTR = \frac{1}{V_L} \cdot \int_0^{V_L} \dot{n}_{O_2} dV_L \quad (13)$$

$OTR$	-	Oxygen Transfer Rate - Sauerstofftransportrate	$\left[ \frac{\text{g}}{\text{Lh}} \right]$
-------	---	------------------------------------------------	---------------------------------------------

[4]

Die Korrelation der Sauerstofftransferrate  $OTR$  von dem Massentransportkoeffizienten  $k_L$  auf der Flüssigkeitsseite und der Gasblasenaustauschfläche  $a$  ist in Gleichung ( 12 ) und ( 13 ) zu erkennen:

$$\overline{\dot{n}_{O_2}} = OTR = \frac{1}{V_L} \cdot \int_0^{V_L} n_{O_2} dV_L \quad (13) \quad | \text{ mit Gleichung ( 12 )}$$

$$\overline{\dot{n}_{O_2}} = OTR = \frac{1}{V_L} \cdot \int_0^{V_L} k_L \cdot \frac{A_G}{V_L} \cdot (c_L^* - c_L) dV_L$$

Der  $k_L a$  ist als der volumetrische Stofftransportkoeffizient oder auch die Belüftungskonstante bekannt [15]. Die verschiedenen Einflüsse auf den Transport von Sauerstoff aus der Gas in die Flüssigkeitsphase kann unterschiedlicher Natur sein und lassen sich wie folgt unterteilen:

Tabella 1 - Charakterisierung der Einflussgrößen des Sauerstoffübertragungskoeffizienten

Konstruktionsgrößen	Betriebsgrößen	Medieneigenschaften
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaktorgröße und -form</li> <li>• Rührerdurchmesser und -art</li> <li>• Stromstörer/Bewehrungssystem</li> <li>• Begasungssystem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rührerdrehzahl</li> <li>• Begasungsrate</li> <li>• Flüssigkeitsvolumen</li> <li>• Temperatur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viskosität</li> <li>• Dichte</li> <li>• Sauerstofflöslichkeit</li> <li>• Diffusivität</li> <li>• Koaleszenzverhalten</li> </ul>

Über die Kenngröße des  $k_L a$  lässt sich ein direkter Zusammenhang mit der Größe des Sauerstofftransports erkennen. Je größer der Sauerstofftransportkoeffizient  $k_L a$ , desto größer ist der Sauerstofftransport von der Gas- in die Flüssigphase. Zusammen mit der  $OTR$  sind beide wichtige Größen für die Zellkultur, um die Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten. Kennt man die Einflussgrößen eines Systems, lassen Änderungen in der Betriebsart oder der Konstruktion vornehmen, um den  $k_L a$ -Wert zu vergrößern. Zudem schafft der Sauerstofftransportkoeffizient  $k_L a$  eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Begasungssystemen. Über den  $k_L a$  lassen sich maximale Wachstumsraten oder Biomassekonzentrationen abschätzen, wenn die Organismen unter Sauerstofflimitierung wachsen. [13]

Hauptsächlich ist der  $k_L a$ -Wert von den Eigenschaften und dem Verhalten der eingebrachten Gasblasen abhängig. Typische  $k_L a$ -Werte in einem Produktionsbioreaktor mit Säugetierzellen können zwischen  $0.9 - 4.29 \text{ h}^{-1}$  liegen [13], [16], [17].

#### 2.4.2. Die Sauerstoffaufnahme $OUR$

Die Sauerstoffaufnahme (Oxygen Uptake Rate -  $OUR$ ) ist eine fundamentale Größe, die das physiologische Verhalten der Zellen charakterisiert. Sie wird häufig genutzt, um Bioprozesse zu optimieren. Mit der Bestimmung der  $OUR$  kann auf die Viabilität der Zellen rückgeschlossen werden [18], [19].

Die Sauerstoffaufnahme  $OUR$  beschreibt das Aufnahmeverhalten der Zellen von Sauerstoff. Die Aufnahme von Sauerstoff ist stark bedingt durch die Verfügbarkeit an Sauerstoff in der Flüssigphase. Die Verfügbarkeit an Sauerstoff wiederum hängt mit der Größe der Transferleistung – der  $OTR$ - zusammen. Da der Transfer durch den Sauerstoffkonzentrationsgradienten von der Gas- in die Flüssigphase bedingt ist, bestimmen die Zellen durch ihren Sauerstoffverbrauch die Konzentrationsdifferenz und damit gleichzeitig die  $OTR$ . [12], [18] Der Zusammenhang dieser beiden Größen wird über die folgende Funktion deutlich [12]:

$$\frac{d c_{L O_2}}{d t} = OTR(t) - OUR(t) \quad (14)$$

$\frac{d c_{L O_2}}{d t}$  - Änderung der Sauerstoffkonzentration über die Zeit  $\left[ \frac{\text{g}}{\text{Lh}} \right]$

In Abb. 8 ist der Zusammenhang grafisch dargestellt.

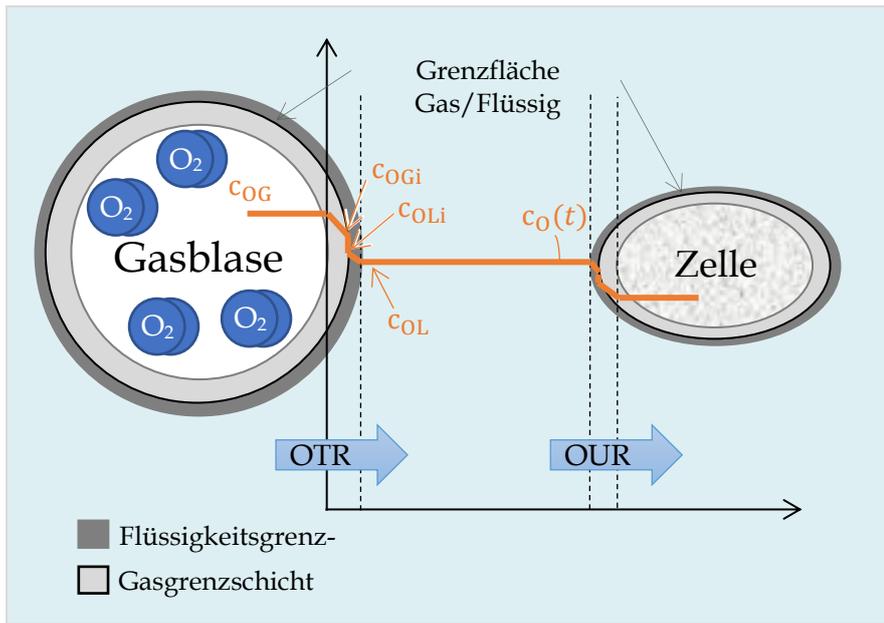


Abb. 8 - Verlauf der Sauerstoffkonzentration von der Gasblase zu den Zellen über die Flüssigphase [4], [13]

Ein charakteristischer Verlauf einer batch- Kultivierung ist in Abb. 9 dargestellt. Sobald die Zellen in das Kultivierungsmedium überführt werden, sinkt die Sauerstoffkonzentration exponentiell. Der Prozess wird über den gesamten Kultivierungszeitraum begast.

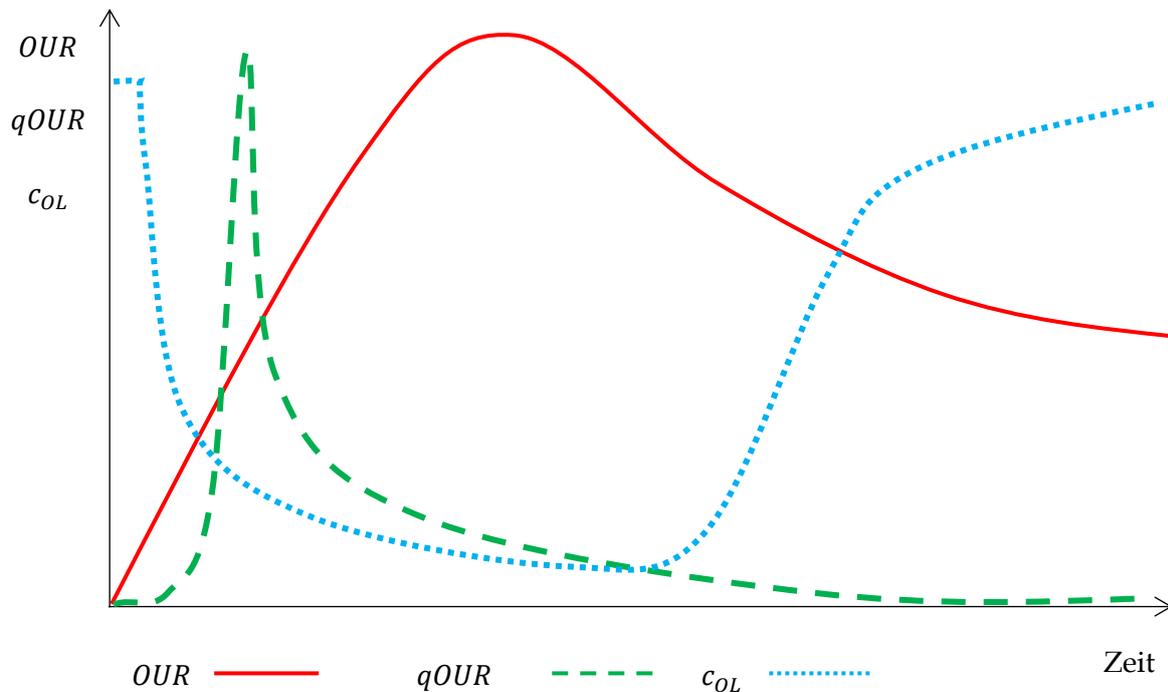


Abb. 9 - schematischer Verlauf der Größen  $OUR$ ,  $qOUR$  und  $c_{OL}$  während einer batch- Kultivierung

Die Zellen brauchen viel Sauerstoff, um ihren Bedarf zum Überwinden der lag-Phase zu decken und anschließend in der exponentiellen Wachstumsphase das vorliegende Substrat mit einer hohen Stoffwechselrate zu konsumieren. Infolge dieser Zusammenhänge, steigt sowohl die Sauerstoffaufnahme  $OUR$  als auch der der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme  $qOUR$  steil an. Während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen ist die Sauerstoffkonzentration der Flüssigphase  $c_{OL}$  auf einem Minimum. Mit dem Verlassen des exponentiellen Wachstums und dem Übergang der Zellen zu einer konstanten Zellzahl steigt die Konzentration des Sauerstoffs in der Flüssigkeit  $c_{OL}$  wieder an. Zellen verstoffwechseln nur noch so viel Substrat wie nötig, wie für die Selbsterhaltung gebraucht wird und vermehren sich nur noch sehr wenig bis sie schließlich anfangen zu lysieren. Durch dieses Verhalten sinkt die Sauerstoffaufnahme  $OUR$  und die zellspezifische Sauerstoffaufnahme  $qOUR$ . [18]

Die Bestimmung der  $OUR$  wird mithilfe der Gleichung ( 14 ) gelöst. Wenn die Änderung der Sauerstoffkonzentration gleich 0 ist, also  $\frac{d c_{OL}}{d t} = 0$ , gilt:

$$OTR = OUR \quad (15)$$

Zur Bestimmung der  $OUR$  werden unterschiedliche Möglichkeiten beschrieben. Diese sind jedoch zu aufwendig und für das System nicht geeignet. Der Vollständigkeit halber sollen sie jedoch kurz beschrieben werden:

#### 2.4.2.1. Gasmassenbilanz

Die Bestimmung der  $OUR$  kann über die Bilanzierung des Sauerstoffs über die Differenz der Konzentration aus dem Ingas und dem Abgas bestimmt werden. Wichtig dafür sind genaue Messungen der Sauerstoffkonzentration über z.B. ein Massenspektrometer.

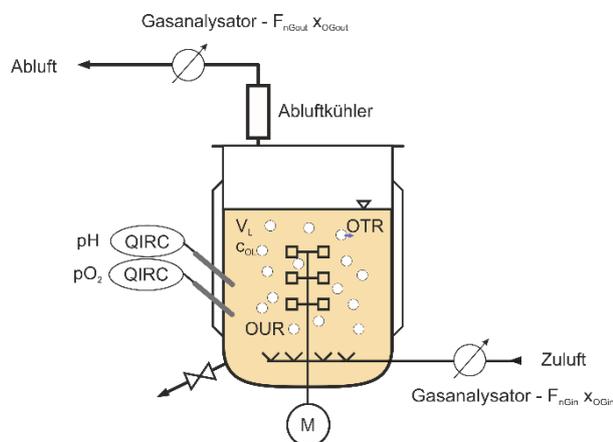


Abb. 10 – Aufbau eines Reaktors zur Bestimmung der  $OUR$  über die Gasmassenbilanzierung [20]

Die Zuluft wird beispielsweise über den Begasungsring des Spagers mit der Begasungsrate  $F_{nG\ in} [L\ h^{-1}]$  und der Sauerstoffkonzentration  $x_{OGin} [-]$  in den Reaktor gebracht. Über die Austauschfläche der Gasblasen wird der Sauerstoff in die Flüssigkeitsphase übertragen ( $OTR$ ) und dort von den Zellen aufgenommen ( $OUR$ ) und verbraucht. Das Gas verlässt das System mit der Begasungsrate  $F_{nG\ out}$  und dem Sauerstoffanteil  $x_{OG\ out}$  [20]. Über eine globale Massenbilanzierung der Flüssig- und Gasphase, lässt sich die  $OUR$  bei konstanter Sauerstoffkonzentration ( $\frac{d\ c_{OL}}{d\ t} = 0$  und  $\frac{d\ c_{OG}}{d\ t} = 0$ ) über die folgende Gleichung bestimmen:

$$OUR = \frac{F_{nGin} \cdot x_{OGin} - F_{nGout} \cdot x_{OGout}}{V_L} \quad (16)$$

Die Messinstrumente für diese Methode und müssen mit hoher Präzision arbeiten. Die Sauerstoffdifferenz zwischen dem Ingas und dem Abgas ist besonders gering. Zudem stört die Begasung von  $CO_2$  für die pH-Regelung oder die Begasung des Headspayses. Daher entfällt diese Art der Bestimmung der  $OUR$  für den Rahmen dieser Arbeit.

#### 2.4.2.2. *Modifizierte dynamische Methode*

Um nicht alle Zellen dem Stress des  $pO_2$ -Abfalls auszusetzen, werden die Zellen kontinuierlich durch ein Bypass-System gepumpt. Über die Strecke des Bypasses ist ein linearer Abfall des  $pO_2$ -Signals zu beobachten. Mit einer Messung der  $pO_2$ -Werte am Anfang und am Ende des Bypasses lässt sich über die folgende Gleichung die  $OUR$  bestimmen:

$$OUR = \frac{1}{\Delta t} \cdot (c_{OL\ Ende} - c_{OL\ Anfang}) \quad (17)$$

Vorteil dieser Methode ist es, dass sie unabhängig vom  $k_L a$ -Wert ist und nicht alle Zellen dem Stress des Sauerstoffabfalls ausgesetzt werden. Problematisch gestaltet sich bei dieser Methode die Differenz der beiden  $pO_2$ -Signale, da der Sauerstoffverbrauch der Zellen und nicht der Unterschied des  $pO_2$ -Signals durch unterschiedliche Kalibrierung gemessen werden soll. Durch diesen Anspruch ist der Kalibrierungsaufwand sehr hoch. Es müssen Messsysteme installiert werden, die genau aufeinander abgestimmt werden. [21]

Da die Methode der Bestimmung der  $OUR$  über die Gasmassenbilanz und die modifizierte dynamische Methode nicht zur Verfügung stehen, wurde ein anderer Ansatz gewählt. Näheres zu den verwendeten Methoden folgt in Kapitel 3 Methoden.

## 2.5. Design of Experiments

Die meisten Versuchsergebnisse hängen nicht von einem einzelnen Einflussfaktor ab, sie lassen sich meistens auf die Kombination der Faktoreneinstellungen zurückführen. Um Fragestellungen hinsichtlich Optimierung, Screening oder Robustheitstest zu beantworten, wird das Prinzip des „Design of Experiments“ (DoE) genutzt. Dabei wird versucht im Rahmen einer Versuchsplanung mit der systematischen Änderung der Einflussfaktoren eine qualitative und quantitative Aussage über den Einfluss der Faktoren und deren Kombinationen zu treffen. [22] Die Herangehensweise des DoE wird in vieler Hinsicht als eines der wichtigsten Werkzeuge in der Entwicklung von PAT-Modellen gesehen [23].

### 2.5.1. Definition der Einflussgrößen

Die Reaktion eines Systems auf Änderungen von Einflussgrößen wird in Form einer Systemantwort wiedergegeben. Die Einflussgrößen sollten für die Systemanalyse unabhängig sein und in einem variablen Intervall kontrolliert auf einen konstanten Wert gesetzt werden können. Über die gemessene Systemantwort lässt sich anschließend das Systemverhaltens analysieren. [22]

### 2.5.2. Versuchsplanung

Es gibt verschiedene Strategien zur Versuchsplanung, die in Abhängigkeit der Fragestellung angewendet werden. Das Ziel bestimmt dabei das Modell und den Versuchsplan. Unterschieden werden drei Schritte der strategischen Versuchsplanung: Screening, Optimierung und Robustheitstest. Für den Schritt des **Screenings** werden viele mögliche Einflussfaktoren ausgewählt und in einem systemrepräsentativen Untersuchungsintervall festgelegt. Über einen teilfaktoriellen Versuchsplan (VP) kann anschließend ein lineares oder interagierendes Versuchsmodell interpoliert werden. Bei dem Schritt der **Optimierung** wird aus den relevanten Einflussfaktoren der „perfekte“ Arbeitspunkt bestimmt. Die Versuche hierfür werden häufig vollfaktoriell oder zentral zusammengesetzt durchgeführt, anschließend kann ein quadratisches oder kubisches Versuchsmodell abstrahiert werden. Für die **Robustheitstestung** wird die Beständigkeit eines Modells geprüft, indem betrachtet wird, wie das System auf leichte Schwankungen der Einflussgrößen reagiert. Auch dies wird über eine teilfaktorielle oder vollfaktorielle VP durchgeführt und anschließend mit einem linearen oder interagierenden Modell beschrieben. Eine grafische Darstellung des VP ist in Abb. 11 abgebildet.

Der teilfaktorielle und vollfaktorielle Versuchsplan zeichnet sich durch Versuche an den Eckpunkten der Einflussgrößen aus. Dabei deckt das vollfaktorielle Design alle Eckpunkte des VP ab, das teilfaktorielle nur ausgewählte Eckpunkte. Zusammen mit mindestens drei Versuchen im Zentrum (Center Point) decken sie den Versuchsraum ab. Die Versuchspunkte des zentral zusammengesetzten Versuchsplans liegen unter anderem außerhalb bzw. innerhalb der Güteintervallgrenzen des Versuchsraums. [22]

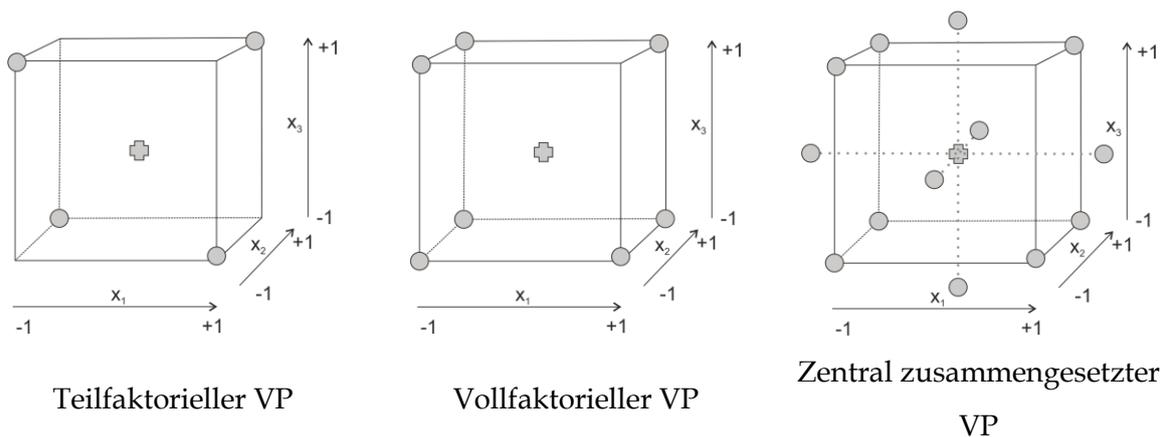


Abb. 11 - Darstellung der drei verschiedenen Versuchsplanmodelle teilfaktoriell, vollfaktoriell und zentral zusammengesetzt für drei normierte physikalische Einflussfaktoren. Dabei stellen die Kreise die durchzuführenden Experimente da, das Kreuz in der Mitte steht für die Zentral Versuche (Center Points), in jedem Versuchsplan werden dafür drei oder mehr von den Center-Point-Versuchen durchgeführt.

### 2.5.3. Rohdatenanalyse

Für die Analyse der Versuchsergebnisse wird eine Normalverteilung vorausgesetzt. Das Prüfen auf eine Normalverteilung kann mit Hilfe grafischer Histogramme vorgenommen werden (vgl. Abb. 12). Eine Normalverteilung kann ggf. über eine Transformation der Daten vorgenommen werden. [22]

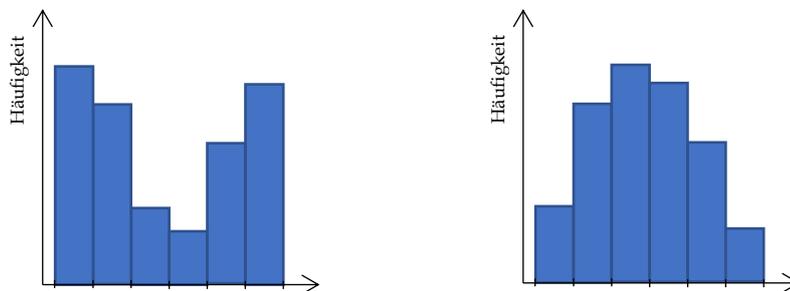


Abb. 12 - Grafische Darstellung zur Hilfe bei der Auswertung zur Normalverteilung. links nicht normalverteilt, rechts normalverteilt

#### 2.5.4. Regressionsanalyse

Zur Erstellung der linearen Zusammenhänge wird die Gleichung der *multi linearen regression* (MLR) genutzt:

$$y_m = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i \cdot x_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^n b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} \cdot x_i^2 + \varepsilon \quad (18)$$

$y_m$	-	Berechnete Systemantwort
$b_0$	-	Grundsystemantwort - Offset
$b_i$	-	Interpolierter Regressionsfaktor zur Einflussgröße i
$b_{ij}$	-	Interpolierter Interaktions-Regressionsfaktor zur Einflussgröße i und j
$b_{ii}$	-	Interpolierter quadratischer-Regressionsfaktor zur Einflussgröße i
$x_i$	-	Einflussgröße i
$x_j$	-	Einflussgröße j
$\varepsilon$	-	Unbekannter Fehler, Differenz zum realen Zustand

In die Berechnung zur Signalantwort werden nur Faktoren integriert, die signifikant sind. Durch die Varianzanalyse kann ein Ausschluss der Faktoren vorgenommen werden, indem betrachtet wird, ob der Vertrauensbereich des Faktors größer ist als der Einfluss des Faktors selber. Die Faktoren werden dabei schrittweise aus dem Berechnungsmodell der Systemantwort entfernt. Durch das Entfernen eines Faktors verschiebt sich die Verteilung der Vertrauensbereiche der übrig gebliebenen Faktoren. Die Reihenfolge der Eliminierung kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Vorgegangen wird bei der Faktor-Eliminierung dabei wie folgt: erst werden quadratische  $b_{ii}$  oder die Interaktions-Faktoren  $b_{ij}$  entfernt. Erst danach werden die Faktoren  $b_i$  oder  $b_j$  selber eliminiert. In Abb. 13 ist exemplarisch ein fiktives Koeffizienten Diagramm der Faktoren darge-

stellt. Hier müsste zunächst der quadratische Faktor  $b_{ii}$  entfernt werden. Durch die Änderung der Varianz durch die Eliminierung des quadratischen Faktors könnte der Interaktions-Regressionsfaktor  $b_{ij}$  noch im Modell enthalten bleiben.

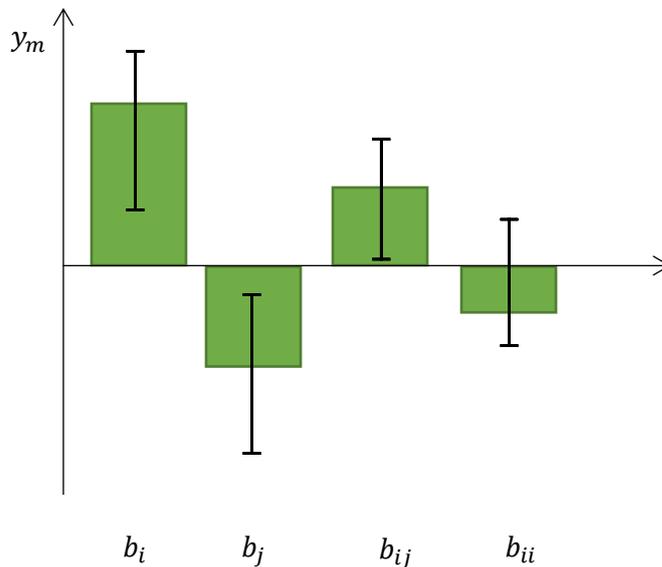


Abb. 13 - Beispiel eines Koeffizienten Diagramms eines Interaktionsmodells zur Varianzanalyse vor der Eliminierung einzelner Regressionsfaktoren

### 2.5.5. Güteprüfung des Modells

Für die Güte-Beurteilung eines Regressionsmodells werden die folgenden Größen betrachtet:

- **Bestimmtheitsmaß  $R^2$ :**  
Hat eine minimal Anforderung von  $> 0.5$  in einem Wertebereich zwischen 0 und 1. Das Bestimmtheitsmaß beschreibt die Differenz zwischen dem Regressionsmodell und den Rohdaten. Der Wert von 1 repräsentiert dabei ein perfektes angepasstes Modell.
- **Vorhersagegüte  $Q^2$ :**  
Sollte größer als 0.1 für ein signifikantes und größer als 0.5 für ein gutes Modell sein.  $Q^2$  kann im Wertebereich zwischen  $-\infty$  und 0 liegen. Die Vorhersagegüte ermöglicht eine Bewertung der Güte für zukünftige Werte.
- **Differenz zwischen  $R^2$  und  $Q^2$ :**  
Für ein gutes Modell sollte die Differenz zwischen dem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  und der Vorhersagegüte  $Q^2$  nicht größer als 0.3 sein.
- **Modellvalidität MV:**  
Werte dieser Gütegröße sollten größer als 0.25 sein. Sie können zwischen  $-\infty$  und 1 liegen. Die Modellvalidität gibt an, wie weit das Regressionsmodell das

Systemverhalten repräsentiert. Mitunter kann diese Größe bei sehr guten Modellen ( $Q^2 > 0.9$ ) sehr klein ausfallen, wenn die Empfindlichkeit im Test sehr hoch war oder die Wiederholungen der Center Points CP extrem gut sind.

- **Reproduzierbarkeit RP:**

Die Reproduzierbarkeit sollte mindestens bei 0.5 des Wertebereichs von 0 bis 1 liegen. Durch die Gütegröße RP lassen sich Aussagen über die Wiederholbarkeit von Experimenten machen.

[22]

### 3. Methoden

In dem folgenden Kapitel werden die Methoden beschrieben, die genutzt wurden, um zunächst den  $k_L a$  Wert zu bestimmen und im Anschluss daran den Software Sensor zur Bestimmung der online-*OUR* zu entwickeln. Dabei wurde über einen DoE-Versuchsplan mit 19 Vorversuchen eine Gleichung zur Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes während der Kultivierung entwickelt. Die *OUR* lässt sich im Anschluss über online-Messungen der Prozessgrößen bestimmen.

#### 3.1. Bestimmung der Henry-Koeffizienten

Der Henry-Koeffizient gibt über das Henry Gesetz Auskunft über das Löslichkeitsverhalten von Gasen in Flüssigkeiten. Für den Übergang von der Gas- in die Flüssigkeitsphase der Koeffizient als „Henry Volatilität“ bezeichnet. [14] Aus dem Henry-Gesetz, Gleichung ( 8 ), lässt sich die Gelöstsauerstoffkonzentration im Gleichgewichtszustand  $c_{OL}^*$  über den Druck der Gasphase  $p_G$  bestimmen. Sowohl der Henry-Koeffizient, als auch die Gelöstsauerstoffkonzentration im Gleichgewichtszustand  $c_{OL}^*$  werden gebraucht, um den  $k_L a$ -Wert und die *OUR* zu berechnen.

$$c_{O_2}^* = c_{OL}^* = \frac{p_{O_2,G}^*}{H_{O_2}} \cong \frac{p_{O_2,G}}{H_{O_2}} \quad (8)$$

mit 
$$p_{O_2,G} = p_G \cdot x_{O_2,G} \quad (19)$$

Die experimentelle Bestimmung des Henry-Koeffizienten für das Kultivierungsmedium ist kompliziert und mit einem hohen materiellen Aufwand verbunden. Der Henry-Koeffizient für reines Wasser ist in der Fachliteratur zu finden. Dieser als Grundlage zur Bestimmung des Henry-Koeffizienten für das Kultivierungsmedium und die Kultivierungsbedingungen genutzt. Der Henry-Koeffizient wird in Abhängigkeit der Temperatur (Kultivierungstemperatur 37 °C) berechnet. Der Einfluss durch den Ionengehalt des Medium [13] wird außer Acht gelassen.

Die Abhängigkeit des Henry-Koeffizienten zur Temperatur wird über das Bunsen-Gesetz oder die Formel der Temperaturabhängigkeit beschrieben (vgl. Anhangskapitel 6 Seite X). Der Henry-Koeffizient wurde mit dem Bunsen-Gesetz bestimmt.

$$H_{O_2}(T) = \frac{H_{nO_2}}{1 + \sum_{i=1}^4 K_{iO_2} \cdot \vartheta_L^i(t)} \quad (20)$$

$$H_{nO_2} = 1.448 \cdot 10^6 \text{ Nm/kg}$$

Theoretischer Henry-Koeffizient für Sauerstoff bei 0°C und unter Standardbedingungen

$$K_{1O_2} = -2.723 \cdot 10^{-2} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$$

1. Konstante des Bunsen-Gesetzes

$$K_{2O_2} = 5.627 \cdot 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-2}$$

2. Konstante des Bunsen-Gesetzes

$$K_{3O_2} = -6.597 \cdot 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-3}$$

3. Konstante des Bunsen-Gesetzes

$$K_{4O_2} = 3.283 \cdot 10^{-8} \text{ }^\circ\text{C}^{-4}$$

4. Konstante des Bunsen-Gesetzes

[24]

Mit diesen Daten ergibt sich für die Kultivierungstemperatur von 37 °C ein Henry-Koeffizient von:

$$H_{O_2}(37^\circ\text{C}) = 2.95 \cdot 10^6 \frac{\text{Nm}}{\text{kg}} = 29.5 \frac{\text{L bar}}{\text{g}}$$

Fermentationsmedien haben Henry-Koeffizienten zwischen  $28 - 40 \frac{\text{bar L}}{\text{g}}$  bzw.  $2.8 \cdot 10^6 - 4.0 \cdot 10^6 \frac{\text{Nm}}{\text{kg}}$  [13].

### 3.2. Versuchsplan zur Bestimmung des $k_L a$ -Wertes

Wie in Kapitel 2.4.1 auf Seite 10 beschrieben, hängt der  $k_L a$ -Wert von vielen Prozessgrößen ab. Zur Bestimmung eines mathematischen Zusammenhangs der Prozessgrößen auf den  $k_L a$  wurden der Einfluss der Rührerdrehzahl  $N_{Si}$ , der Begasungsrate  $F_{nG}$ , des Begasungsverhältnis  $r$ , des Volumens  $V_L$  und der Antischaumkonzentration  $c_{AF}$  in DoE-Versuchen untersucht.

Diese Größen wurden gewählt, da sie bekanntermaßen Einfluss auf den  $k_L a$ -Wert haben und während der Kultivierung verändert werden. Größen die während eines Kultivierungsprozesses konstant gehalten werden (Temperatur und Druck), werden nicht als Einflussgrößen untersucht. Das Begasungsverhältnis wird durch den folgenden Zusammenhang beschrieben:

$$r = \frac{F_{nO_2}}{F_{nO_2} + F_{nAIR}} \quad (21)$$

$$F_{nO_2} \quad - \quad \text{Begasungsrate von Sauerstoff} \quad \left[ \frac{\text{L}}{\text{h}} \right]$$

$$F_{nAIR} \quad - \quad \text{Begasungsrate von Luft} \quad \left[ \frac{\text{L}}{\text{h}} \right]$$

Die Einflussfaktoren bewegen sich während der Kultivierung in den in Tabelle 2 aufgelisteten Grenzen.

Tabelle 2 – Grenzpunkte des Design Raums zum DoE zu Bestimmung des  $k_La$ 's

Zustandsgröße	Variablenzeichen	Grenzintervall
Rührerdrehzahl	$N_{St}$	100 – 200 rpm
Begasungsrate	$F_{nG}$	24 – 60 L/h
Begasungsverhältnis	R	0 – 1
Flüssigkeitsvolumen	$V_L$	6 – 10L
Antischaumkonzentration	$c_{AF}$	0 – 0.4 %

Es wurde ein teilfaktorieller Versuchsplan mit 19 Versuchen entwickelt, siehe *Anhang Kapitel 5 - Versuchsplan für die  $kLa$ -Wert Bestimmung Seite IX.*

### 3.3. Bestimmung des $k_La$ -Wertes

Da das Kultivierungsmedium sehr teuer ist, wurde sich ein passendes Modellsystem für die Bestimmung des  $k_La$ -Wertes gesucht. Für die Untersuchungen wurde PBS als zellfreies Modellsystem gewählt. Messungen der Leitfähigkeit und der Osmolarität vom PBS-Puffer, dem Kultivierungsmedium und der Zellsuspension wurden durchgeführt, um die Vergleichbarkeit zu überprüfen.

#### 3.3.1. Ausgasungsmethode

Für die Ausgasungsmethode wird das zellfreie Modellsystem PBS genutzt. Unter eingeschalteter Begasung wird gewartet, bis sich die Gleichgewichtskonzentration in der Flüssigphase einstellt. Hat sich eine konstante Sättigungskonzentration eingestellt, kann die Begasung von Luft auf Stickstoff umgestellt werden. Die Gelöstsauerstoffkonzentration sinkt mit einem sigmoiden (S-förmigen) Verlauf auf null. Dieser Verlauf von der Gleichgewichtskonzentration bis zur Nullkonzentration wird als **Abnahmekurve** oder **Entladekurve** bezeichnet. Anschließend wird die Begasung wieder auf Luft umgestellt. Die Sauerstoffkonzentration der Flüssigphase steigt wieder auf die Gleichgewichtskonzentration an. Der Anstieg hat einen umgekehrt sigmoiden Verlauf wie die Abnahmekurve. Der Anstieg von der Gelöstsauerstoffkonzentration von  $0 \frac{g}{L}$  auf die Sättigungskonzentration wird als **Aufladekurve** bezeichnet. Ein Modellverlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration ist in Abb. 14 dargestellt.

[13]

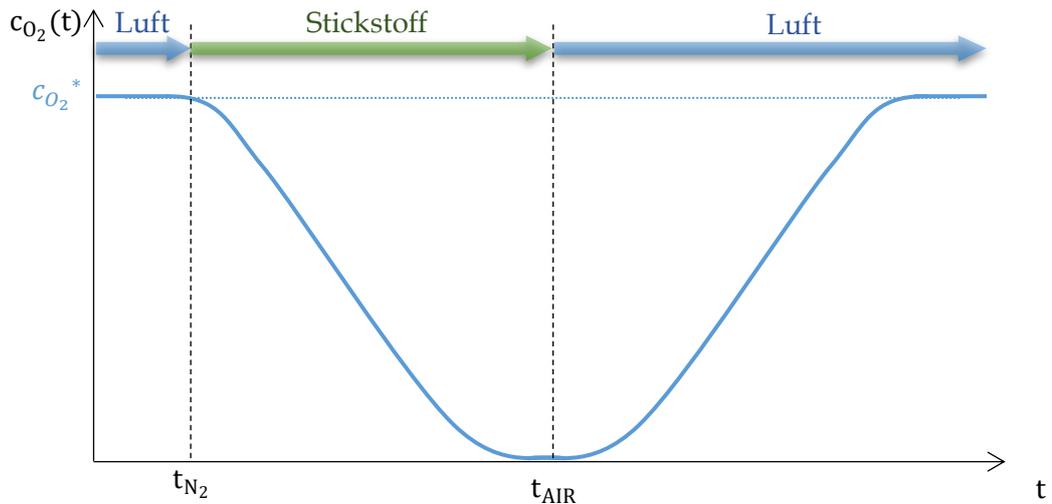


Abb. 14 - Bestimmung des  $k_L a$ - Wertes im Zellfreien Modellsystem mit der Ausgasungsmethode [13]

Das oben beschriebene Modell wurde sowohl mit Luft, als auch mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch und reinem Sauerstoff begast. Dadurch bewegt sich die Sauerstoffkonzentration  $c_{O_2}^*$  zwischen 10 und  $35 \frac{mg}{L}$ . Es lassen sich  $c_{O_2}(t)$  und  $c_{O_2}^*$  für den praktischen Gebrauch gegen  $pO_2\%(t)$  und 100 % bzw. 477 % austauschen [25]. Durch die Kalibrierung der  $pO_2$ -Sonde mit Luft zeigt die Sonde bei reiner Sauerstoffbegasung einen maximal Wert von 477 % an.

$$\frac{x_{OGin}(t)}{x_{OGcal}} \cdot 100\% = pO_2(t) \quad (22)$$

Mit  $x_{OGin} = 1$  und  
 $x_{OGcal} = 0.2094$

$$\frac{1}{0.2094} \cdot 100\% = 477 \%$$

Ausgewertet wurde für jeden Versuch nur die Aufladekurve, da bei dieser die Begasungsrate durch den Massendurchflussregler bekannt war. Für die Begasung des Reaktorsystems mit Stickstoff ist kein Massendurchflussregler vorhanden. In der weiteren Auswertung wird die Aufladekurve energiefrei „gesetzt“, indem die Gleichgewichtskonzentration, die sich nach der Begasung mit Stickstoffeingestellt eingestellt hat -  $pO_2\%_{N_2\ off}$ , von allen Datenpunkt der Aufladekurve abgezogen wird (Gleichung (23)).

$$pO_2\%_{norm}(t) = pO_2\%_{org} - pO_2\%_{N_2\ off} \quad (23)$$

$pO_2\%_{norm}$	-	Normierter $pO_2$ -Wert	[%]
$pO_2\%_{org}$	-	Originaler $pO_2$ – Wert der Aufladekurve	[%]
$pO_2\%_{N_2\ off}$	-	$pO_2$ -Wert des Gleichgewichtszustands nach der Begasung mit Stickstoff - Offset	[%]

3.3.1.1. Auswertung durch Näherung der Sprungantwort an ein  $PT_3$ -System

Für die mathematische Beschreibung des Verlaufs der Systemantwort aus der Ausgangsmethode kann ein bekanntes System zur Hilfe genommen werden, bei dem das gleiche Systemverhalten zu beobachten ist und der mathematische Zusammenhang bereits bekannt ist.

Einer charakteristischen  $pO_2$ -Aufladekurve zeichnet sich durch seine sigmoide Form aus. Der gleiche Verlauf wird in der Elektrotechnik als Ausgangssignal einer RC-Kombination (R=Widerstand; C=Kondensator) beobachtet. Die RC-Kombination lässt sich mathematisch beschreiben. Zur Beschreibung des Übertragungsverhaltens von Sauerstoffs aus der Gasphase über die Flüssigphase zur  $pO_2$ -Messsonde kann die Analogie über ein elektrotechnisches Ersatzschaltbild hergestellt werden. Das betrachtete Ersatzschaltbild und die Analogie aus dem Sauerstoffübertragungssystem ist in Abb. 15 abgebildet. Eine detaillierte Herleitung und Beschreibung des Analogieverhaltens ist im Anhang beschrieben, siehe Anhangskapitel 7 Seite XI.

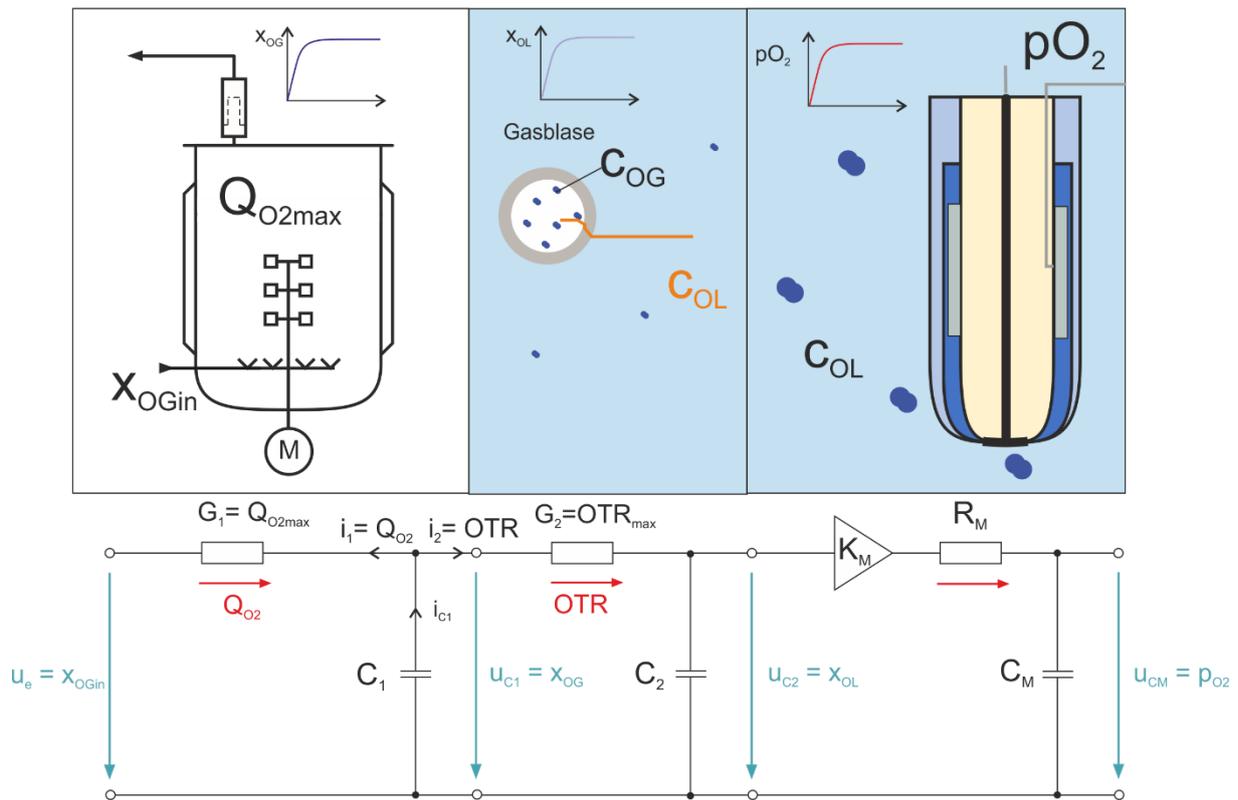


Abb. 15 - Analogie zwischen dem Sauerstoffübertragungsverhalten und dem Elektrotechnischen Ersatzschaltbild

Für das Systemverhalten sei an dieser Stelle der folgende Zusammenhang festgehalten:

- Das Übertragungsverhalten lässt sich als Verzögerungssystem dritter Ordnung über ein PT<sub>3</sub>-System über drei Differenzialgleichungen beschreiben
- Das System wird von einem energiefreien Startpunkt aus aufgebaut
- Es gibt eine Rückwirkung von der Flüssig in die Gasphase

Angewandt wird diese Analogie in Form einer Simulation der Systemantwort. Die simulierte Systemantwort wird über die Minimierung der Fehlerquadratsumme nach dem Algorithmus von Nelder-Mead dem Verlauf des  $pO_2$ -Signals angepasst. Über die charakterisierten Zeitkonstanten des PT<sub>3</sub>-Systems lässt sich der  $k_L a$ -Wert bestimmen und als Ausgabeparameter der Simulation formulieren.

Die drei Differenzialgleichungen lauten:

### 1. Differentialgleichung

Diese Differentialgleichung beschreibt das P-T<sub>1</sub>-System für den Übergang der Sauerstoffmoleküle aus der Gasphase:

$$\dot{x}_{OG}(t) = \frac{1}{T_{11}} \cdot \left[ (x_{OGin}(t) - x_{OG}(t)) - \frac{T_{12}}{T_{22}} \cdot (x_{OG}(t) - x_{OL}(t)) \right] \quad (24)$$

$\dot{x}_{OG}$  - Änderung des Sauerstoffanteils in der Gasphase [-]

$T_{11}$  - Zeitkonstante zur Beschreibung der Verweilzeit in der Gasphase [h]

$T_{12}$  - Zeitkonstante zur Beschreibung der Rückwirkung aus der Gas- in die Flüssigphase [h]

$T_{22}$  - Zeitkonstante zur Beschreibung der Grenzflächentransferzeit [h]

### 2. Differentialgleichung

Diese Differentialgleichung beschreibt das P-T<sub>1</sub>-System für das Eintreten der Sauerstoffmoleküle in die Flüssigphase:

$$\dot{x}_{OL}(t) = \frac{1}{T_{22}} \cdot [x_{OG}(t) - x_{OL}(t)] \quad (25)$$

$x_{OG}$  - Verlauf des Sauerstoffanteils in der Gasphase [-]

$x_{OL}$  - Verlauf des Sauerstoffanteils in der Flüssigphase [-]

### 3. Differentialgleichung

Diese Differentialgleichung beschreibt die Änderung des  $pO_2$ -Signals

$$\dot{pO}_2(t) = \frac{1}{T_M} \cdot [K_M \cdot x_{OG}(t) - pO_2(t)] \quad (26)$$

$T_M$	-	Zeitkonstante der $pO_2$ -Sonde	[h]
$K_M$	-	Proportionalitätsfaktor der $pO_2$ -Sonde	[-]
$pO_2(t)$	-	Messdaten aus der Versuchen	[%]

Die Zeitkonstanten haben folgende Zusammenhänge:

$$T_{11} = \frac{V_G}{F_G} = \tau_G \quad (27)$$

$\tau_G$	-	Verweilzeit des Gases in der Flüssigphase	[h]
$V_G$	-	Volumen der Gasphase	[L]
$F_G$	-	Begasungsrate	$\left[\frac{L}{h}\right]$

$$T_{22} = \frac{c_{OLmax}}{OTR_{max}} = \frac{1}{k_L a} \quad (28)$$

$c_{OLmax}$	-	Maximal mögliche Konzentration von Sauerstoffs in der Flüssigphase	$\left[\frac{g}{L}\right]$
$OTR_{max}$	-	Maximale Sauerstofftransferate	$\left[\frac{g}{L h}\right]$

$$T_{12} = \frac{c_{OLmax}}{Q_{O2max}} \quad (29)$$

$Q_{O2max}$	-	Maximale Sauerstoffeintragsrate	$\left[\frac{g}{L h}\right]$
-------------	---	---------------------------------	------------------------------

Aus den simulierten Daten zur Zeitkonstante  $T_{22}$  lässt sich der  $k_L a$  direkt bestimmen.

Aus gemessenen Aufladekurven der 19 Versuche des DoE-Versuchsplans können so die jeweiligen  $k_L a$ -Werte bestimmt werden. Im Anschluss kann über die Multilineare-Regression bzw. nach der Gleichung von Van't Riet ein Zusammenhang zu den Faktoreinstellungen beschrieben werden.

### 3.3.1.2. Berechnung des $k_L a$ Wertes über die Gleichung nach Van't Riet

Ein weiterer Ansatz zur Beschreibung des Zusammenhangs des  $k_L a$ -Wertes von den Einflussfaktoren ist über die Gleichung von Van't Riet möglich. Diese Gleichung wurde 1979 für Newtonsche Flüssigkeiten entwickelt.

$$k_L a = C \cdot \left(\frac{P_g}{V_L}\right)^\alpha \cdot u_s^\beta \quad (30)$$

$C$	-	Empirisch bestimmter Vorfaktor	[-]
$P_g$	-	Eingebrachte Leistung in begasten Bioreaktor	[W]
$V_L$	-	Reaktorvolumen	[L]
$u_s$	-	Gasleerrohrgeschwindigkeit	$\left[\frac{m}{s}\right]$
$\alpha, \beta$	-	Empirische Parameter	[-]

Diese Gleichung ist eine empirische Bestimmungsgleichung. Zu der keine sinnvolle Einheitenrechnung gemacht werden kann. [3]

Der Leistungseintrag  $P_g$  ist proportional zur Rührerdrehzahl hoch drei,  $N_{St}^3$ . Die Gasleerrohrgeschwindigkeit  $u_s$  ist proportional zur Begasungsrate  $F_{nG}$ . Darüber lässt sich die folgende Gleichung entwickeln:

$$k_L a = k_{LaEP} \cdot \left(\frac{N_{St}(t)}{N_{StEP}}\right)^{3\alpha} \cdot \left(\frac{F_{nG}(t)}{F_{nGEP}}\right)^\beta \cdot \left(\frac{V_L}{V_{LEP}}\right)^{-\alpha} \quad (31)$$

$EP$	-	Entwicklungspunkt	[-]
$k_{LaEP}$	-	$k_L a$ des EP- Werts aus Vorversuchen	$\left[\frac{1}{h}\right]$
$N_{St}(t)$	-	Rührerdrehzahl zum aktuellen Zeitpunkt	[rpm]
$N_{StEP}$	-	Rührerdrehzahl vom EP	[rpm]
$F_{nG}(t)$	-	Begasungsrate zum aktuellen Zeitpunkt	$\left[\frac{L}{h}\right]$
$F_{nGEP}$	-	Begasungsrate vom EP	$\left[\frac{L}{h}\right]$
$V_L$	-	Flüssigkeitsvolumen zum aktuellen Zeitpunkt	[L]
$V_{LEP}$	-	Flüssigkeitsvolumen vom EP	[L]
$\alpha$	-	Empirisch ermittelter Parameter	[-]
$\beta$	-	Empirisch ermittelter Parameter	[-]

Als Entwicklungspunkte können in dieser Gleichung die maximalen Parameter des Versuchsplans mit den Größen  $k_L a_{max}$ ,  $N_{St max}$ ,  $F_{nG max}$  und  $V_{L max}$  genommen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Gleichung über die Parameter der „System Mitte“ zu entwickeln. In der Versuchsplanung des DoE werden diese Versuche durch die Center Points repräsentiert. [26]

Die empirischen Parameter wurden über den Optimierungsalgorithmus nach Nelder-Mead bestimmt. Über die Simulation der Van't Riet Daten, wird die Minimierung der Fehlerquadratsumme zu den Messwerten bestimmt. Das verwendete Matlab-Skript befindet sich im Anhangs Kapitel 8.2 - Matlab Skripte - Ermittlung der empirischen Parameter für Van't Riet Seite XIX.

### 3.4. Dynamische Methode zur Bestimmung des $k_L a$ und der OUR

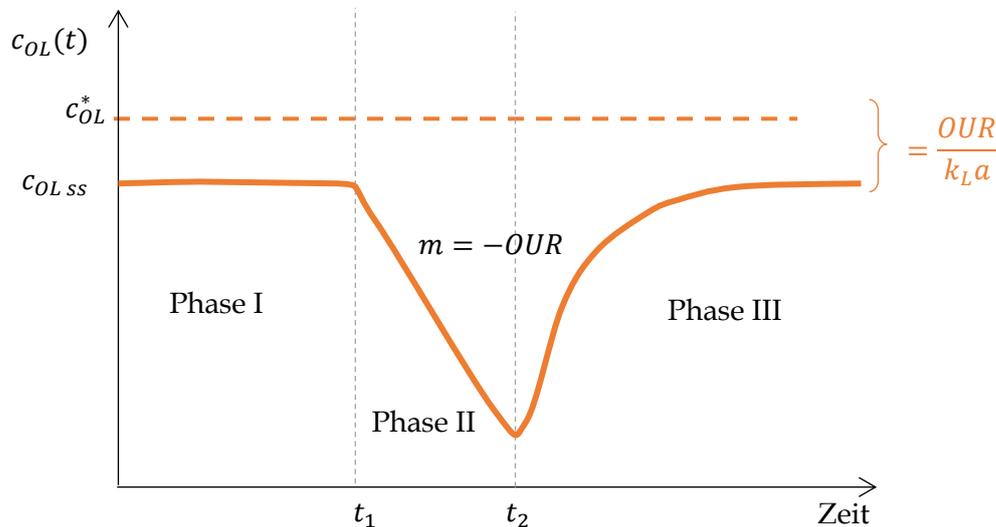


Abb. 16 - Modellverlauf der dynamischen Methode zur Bestimmung der OUR und des  $k_L a$

Zur Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes während der Kultivierung kann die dynamische Methode verwendet werden. Ein schematischer Verlauf ist in Abb. 16 gezeigt. Das System befindet sich in Phase I im Gleichgewicht. Zu diesem Zeitpunkt gilt Gleichung (15), da sich die Sauerstoffkonzentration in den untersuchten kurzen Zeitintervallen näherungsweise nicht ändert,  $\frac{d c_{OL}}{d t} = 0$ . Es gilt also  $OUR = OTR$ . Zum Zeitpunkt  $t_1$  wird die Zuluft ausgeschaltet. Die Zellen verbrauchen den Sauerstoff in der Flüssigkeit, es wird kein weiterer Sauerstoff aus der Gasphase nachgeliefert, die gelöste Sauerstoffkonzentration sinkt. Um die Zellen nicht unter Stress zu setzen wird die Zuluft zum Zeitpunkt  $t_2$  wieder angeschaltet-Phase II. Die gelöste Sauerstoffkonzentration steigt wieder bis auf den Gleichgewichtszustand an - Phase III. [4] Nach der Bestimmung der  $OTR$ , als Steigung

der Gelöstsauerstoffkonzentration zwischen den Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$ , kann durch das Umformen des folgenden Zusammenhangs der  $k_L a$  bestimmt werden:

$$(c_{OL}^* - c_{OLss}) = \frac{OUR}{k_L a}$$

$$k_L a = \frac{OUR}{(c_{OL}^* - c_{OLss})} \quad (32)$$

$c_{OLss}$  - Gelöstsauerstoffkonzentration im Gleichgewichtszustand  $\left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right]$

[16]

Zu Bestimmung des  $k_L a$  's während der Kultivierung der CHO Zellen wurde die Zuluft am Kultivierungstag mehrmals am Tag abgeschaltet. Der  $pO_2\%(t)$  – Wert sank dabei von seinem Sollwert von  $pO_{2w} = 40\%$  auf  $pO_2 = 10\%$ , anschließend wurde die Zuluft wieder angeschaltet. Die pH Regelung und die Begasung mit  $CO_2$  wurde über den Versuchszeitraum abgeschaltet.

### 3.5. Bestimmung der qOUR

Aus der  $OUR$  kann mit der Information der aktuellen Zellzahl die zellspezifische Sauerstoffverbrauchsrate  $qOUR$  berechnet werden:

$$qOUR = \frac{OUR}{X} \quad (33)$$

$X$  - Zellzahl viabler Zellen  $\left[ \frac{10^6 \text{ Zellen}}{\text{mL}} \right]$

### 3.6. Online OUR

Bei bekanntem  $k_L a$  und Sättigungskonzentration  $c_{OL}^*$  des Sauerstoffs in der Flüssigphase kann die  $OUR$  bzw. die  $OTR$  die Messwerte der  $pO_2$ -Sonde berechnet werden. Die Änderung der Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase kann über die folgende Gleichung bestimmt werden:

$$\frac{dc_{OL}}{dt} = OTR - OUR \quad (34)$$

Im Gleichgewichtszustand, ändert sich die Sauerstoffkonzentration nicht, d.h.  $\frac{dc_{OL}}{dt} = 0$ .  
Es gilt:

$$OUR = OTR = k_L a \cdot (c_{OL}^* - c_{OL}) \quad (35)$$

Über das Henry-Gesetz lässt sich die Sättigungskonzentration bestimmen:

$$c_{O_2}^* = c_{OL}^* = \frac{p_{O_2,G}^*}{H_{O_2}} \cong \frac{p_{O_2,G}}{H_{O_2}} = \frac{p_{nG} \cdot x_{OGin}}{H_{O_2}} \quad (8)$$

$x_{OGin}$  lässt sich aus den Begasungsraten der Massendurchflussregler bestimmen. [18], [27] Durch den vorher berechneten Henry-Koeffizienten lässt sich die Sättigungskonzentration  $c_{OL}^*$  bestimmen und damit über das  $pO_2$ -Signal die  $OUR$  ermitteln:

$$OUR = \frac{k_L a \cdot \left( p_{nG} \cdot x_{OGin} - \frac{p_{O_2}\%}{100\%} \cdot p_{G\,cal} \cdot x_{OG\,cal} \right)}{H_{O_2}} \quad (36)$$

$p_{G\,cal}$	-	Druck bei der Kalibrierung	$\left[ \frac{N}{m^2} \right]$
$x_{OG\,cal}$	-	Sauerstoffanteil im Ingas bei der Kalibrierung	$[-]$

Abb. 17 zeigt die Kommunikation der Softwarekomponenten während der Kultivierung zum Ermitteln der online  $OUR$  aus den Betriebsparametern  $N_{St}$ ,  $F_{nG}$ ,  $V_L$ ,  $pO_2\%$ ,  $X$  und  $c_{AF}$ . MFCS-WiPro als Reaktorsteuerungssoftware kommuniziert über seine eigene MFCS-WiPro-Datenbank mit SIMAC Sipat. SIMAC Sipat als Datenmanagementsoftware hat die Möglichkeit über Matlab Skripte online Berechnungen während der Kultivierung durchzuführen. Die gemessenen Werte aus der MFCS-WiPro-Datenbank werden für die Berechnung des  $k_L a$ -Wertes, der  $OUR$  und der  $qOUR$  genutzt. Da die Antischaumkonzentration noch durch keine Messung aus der Kultivierung zurückgegeben werden kann, wird sie über eine Konstante mit  $c_{AF} = 0.3\%$ , in der Berechnung vorgegeben.

Der Kapazitätswert der Zellzahl der Kultivierung wurde über den Futura® OPC Sever weiter an SIMATIC Sipat gegeben. Über die lineare Geradengleichung (37) wurde die Zellzahl berechnet.

$$X(t) = X_0 + Y_{C\,zu\,X} \cdot C_{Zelldichte}(t) \quad (37)$$

$X_0$	-	Inokulierte Zellzahl	$\left[ \frac{10^6 \text{ Zellen}}{mL} \right]$
$Y_{C\,zu\,X}$	-	Umrechnungsfaktor von Kapazität zu Zellzahl, ermittelt aus offline Messungen der Zellzahl	$\left[ \frac{10^6 \text{ Zellen}}{mL \cdot F} \right]$
$C_{Zelldichte}(t)$	-	Kapazitätssignal zum Zeitpunkt t	$[F]$

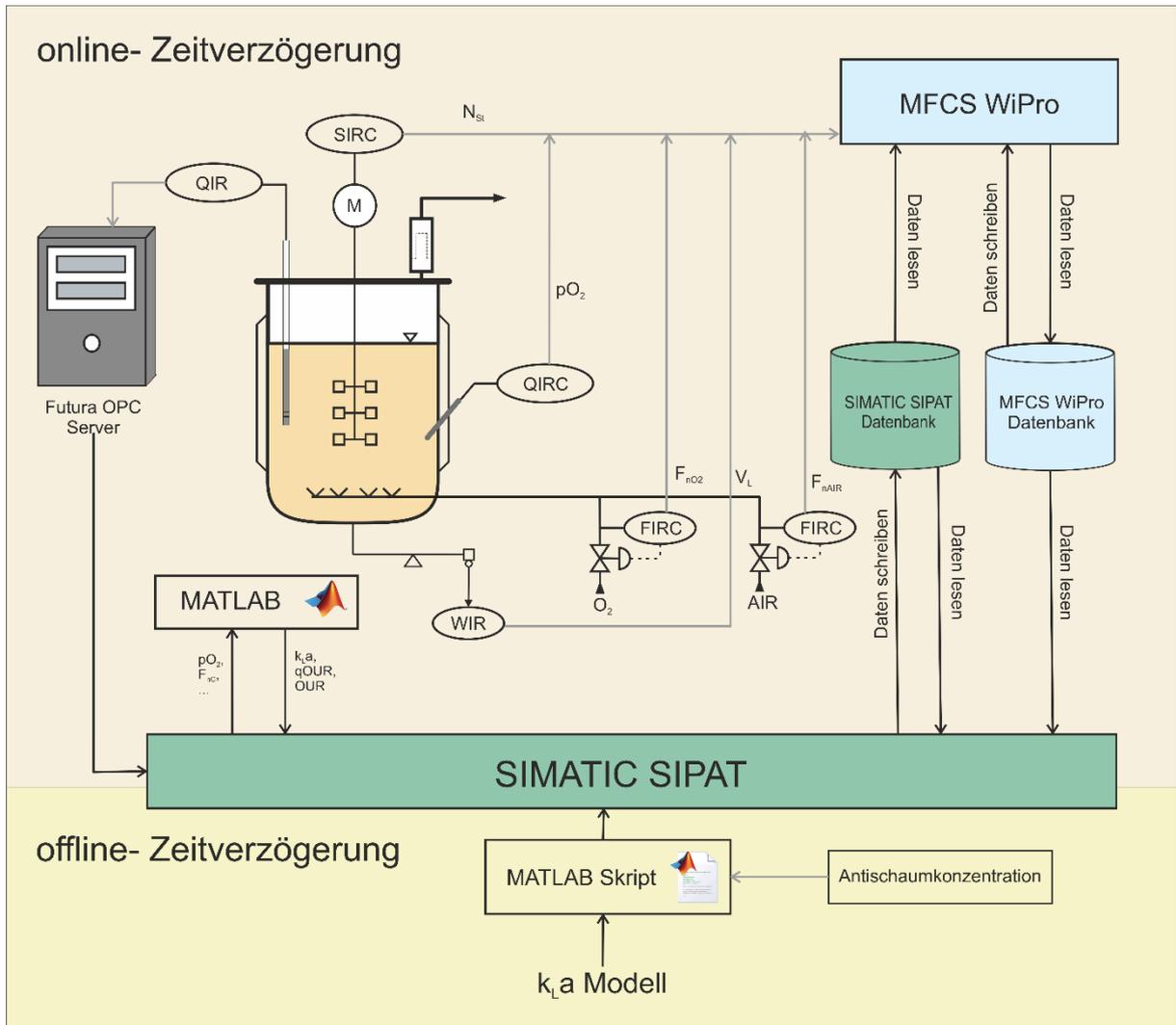


Abb. 17 - Darstellung der Softwarestruktur zur online Bestimmung der OUR während der Kultivierung

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Die Benchmark-Kultivierung der CHO-Zellen wurde etabliert um verschiedene Sensor- und Modellsysteme zur Bioprozessautomatisierung zu testen. In dieser Arbeit wurden Modelle entwickelt, die den Verlauf des  $k_L a$ -Wertes aus den Systemparametern berechnen und in der Verbindung mit weiteren online Daten die  $OUR$  und die  $qOUR$  berechnen. Als Referenz zu diesen Werten gelten dabei die Ergebnisse der  $OUR$  und der  $k_L a$  Bestimmung aus der dynamischen Methode.

### 4.1. Bestimmung des $k_{LA}$ - Wertes

Für die Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes wurde zunächst der Ansatz der Ausgasungsmethode des zellfreien Modellsystems PBS gewählt.

Aus den daraus ermittelten Daten soll dann in zwei unterschiedlichen Ansätzen je eine Gleichung entwickelt werden. Die Gleichungen sollen das Systemverhalten in Form des  $k_L a$  -Wertes in Abhängigkeit der Prozessparameter während der Kultivierung beschreiben.

Es werden dafür die Ansätze der multilinenen Regression (MLR) und die von Van't Riet genutzt.

#### 4.1.1. Analyse der Einflussparameter und Bestimmung der Parametergleichung des $k_{LA}$ -Wertes über Multilineare Regression

Für die Vorversuche zur Parameterbestimmung wurden das zellfreien Modellsystem PBS genutzt und über die Ausgasungsmethode die Systemantwort in Form des  $pO_2\%$ -Verlaufs aufgezeichnet. Es wurde für unterschiedliche Systemparameterkombinationen die Sprungantwort durch das Umschalten der Begasung von Stickstoff (nach konstantem  $pO_2\%$ ) auf ein Luft-Sauerstoff-Gemisch aufgenommen.

Zur Bestimmung der Systemantwort als  $k_L a$  wurden zunächst unterschiedliche Auswertungsmethoden genutzt. Die Methode der  $k_L a$  -Wert-Bestimmung über die Annäherung an das  $PT_3$ -System-Verhalten entwickelt aus dem elektrotechnischen Ersatzschaltbild, repräsentierte das Systemverhalten dabei am besten. In dieser Auswertungsmethode wird die Verzögerung durch die  $pO_2$ -Sonde durch die Zeitkonstante  $T_M$  mitberücksichtigt. Die Ergebnisse der anderen Methoden und Versuche zur Bestimmung der  $pO_2$ -Sonden-Zeitkonstante  $T_M$  sind im Anhang dieser Arbeit zu finden (*Anhangs Kapitel 9 - Seite XIX und 10 - Seite XXVI*).

In Abb. 18 ist exemplarisch einer der insgesamt 19 durchgeführten Versuche zur Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes gezeigt. Durch rote Punkte (○) sind in beiden Abbildungen die Datenpunkte des  $pO_2$ %-Verlaufs abgebildet. Der simulierte Verlauf über die Annäherung an das Systemverhalten des PT3-Systems ist als eine blaue Linie (---) dargestellt. Abb. 18 zeigt dabei eine nahezu optimale Annäherung an den Verlauf der gemessenen  $pO_2$ %-Daten.

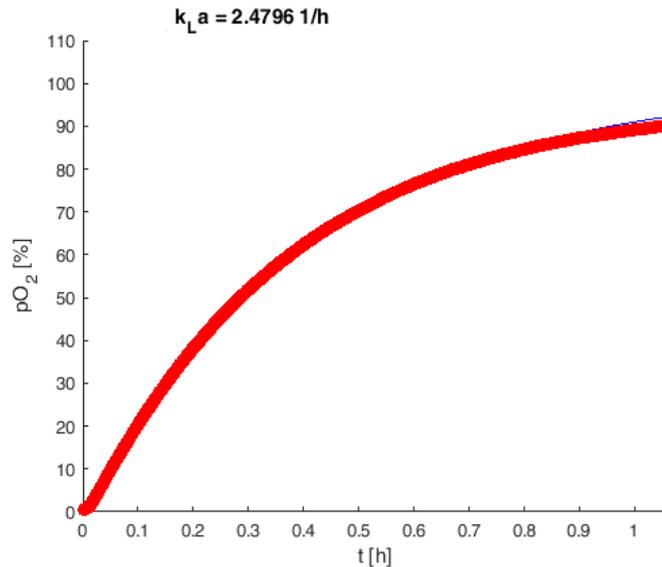


Abb. 18 - V12 -  $N_{St}$ : 200 rpm  $F_{nG}$ : 24 L/h  
 $r$ : 0  $c_{AF}$ : 0.4%

Die so bestimmten  $k_L a$  - Werte aus dem teilfaktoriellen Design des Versuchsplans sind in Tabelle 3 zu sehen.

Tabelle 3- Versuchsergebnisse der  $kLa$ -Wert-Bestimmung aus den Vorversuchen über das Modellsystem PBS

Ver- suchsnr	$N_{St}$ [rpm]	$V_L$ [L]	$r$ [-]	$F_{nG}$ [L/h]	$c_{AF}$ [%]	$k_L a$ [1/h]
2	100	10	0	24	0	1.39
3	100	6	0	24	0.4	1.89
5	100	6	0	60	0	6.16
8	100	10	0	60	0.4	2.28
9	200	6	0	60	0	8.22
12	200	10	0	24	0.4	2.48
14	200	10	0	60	0	7.21
15	100	10	1	60	0	2.67
17	100	6	1	24	0	2.72

Ver- suchsnr	N <sub>St</sub>	V <sub>L</sub>	r	F <sub>nG</sub>	c <sub>AF</sub>	k <sub>La</sub>
	[rpm]	[L]	[-]	[L/h]	[%]	[1/h]
18	100	10	1	24	0	1.55
20	100	10	1	24	0.4	1.19
23	100	6	1	60	0.4	5.28
26	200	10	1	24	0	3.10
27	200	6	1	24	0.4	3.21
29	200	6	1	60	0	11.21
32	200	10	1	60	0.4	3.93
33	150	8	0.5	42	0.2	3.06
34	150	8	0.5	42	0.2	2.66
35	150	8	0.5	42	0.2	2.66

Die über das zellfreie Modellsystem PBS bestimmten  $k_{La}$ -Werte liegen zwischen 1.19 und 11.21 h<sup>-1</sup>. Diesen Werten lassen sich folgende Parametereinstellungen zuordnen:

Tabelle 4- Parameter zu den maximalen und minimalen  $k_{La}$ -Wert des zellfreien Modellsystems PBS

	Ver- suchsnr	N <sub>St</sub>	V <sub>L</sub>	r	F <sub>nG</sub>	c <sub>AF</sub>	k <sub>La</sub>
		[rpm]	[L]	[-]	[L/h]	[%]	[1/h]
<b>Maximaler k<sub>La</sub></b>	29	200	6	1	60	0	11.21
<b>Minimaler k<sub>La</sub></b>	20	100	10	1	24	0.4	1.19

#### 4.1.2. Modellbildung zu den Daten des zellfreien Modellsystems

Für die Bestimmung des  $k_{La}$ -Wertes aus den DoE-Versuchen für die online Bestimmung während der Kultivierung wurden zwei verschiedene Modelle genutzt. Das MLR-Modell beschreibt dabei einen multilinearen Zusammenhang der Einflussgrößen des Systems. Das Modell von Van't Riet löst sich vom linearen Modell und nutzt empirisch ermittelte Exponenten zur Beschreibung der Zusammenhänge zwischen den Einflussgrößen.

#### 4.1.2. MLR

Da zunächst keine Normalverteilung der  $k_L a$ -Werte vorlag wurde diese über eine logarithmische Transformation hergestellt (vgl. Abb. 19). Die Transformationskonstanten C1 und C2 haben dabei die folgenden Werte:

$$C1 = 1.4$$

$$C2 = -0.6$$

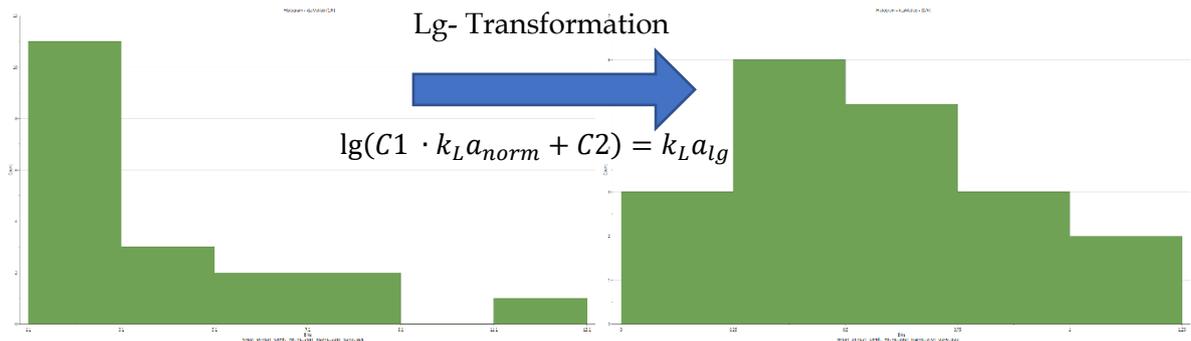


Abb. 19 - Histogramm vor und nach der Transformation zur Normalverteilung des  $k_L a$ - Wertes

Dies erfordert eine Rücktransformation der berechneten  $k_L a$ -Werte. Abb. 21 zeigt die Effekte aller untersuchten Einflussgrößen ( $F_{nG}$ ,  $N_{St}$ ,  $V_L$ ,  $r$  und  $c_{AF}$ ) auf den  $k_L a$ -Wert. Die Einflussgrößen der Begasungsrate  $F_{nG}$  und der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  wirken sich über einen positiven Effekt auf den  $k_L a$ -Wert aus. Dabei hat die Begasungsrate  $F_{nG}$  einen größeren positiven Einfluss, als die Rührerdrehzahl  $N_{St}$ . Negative Effekte auf den  $k_L a$ -Wert haben das Flüssigkeitsvolumen  $V_L$  und die Antischaumkonzentration  $c_{AF}$ . Der Einfluss des Flüssigkeitsvolumens  $V_L$  ist dabei deutlich größer als der Einfluss der Antischaumkonzentration  $c_{AF}$ . Der Interaktionseffekt zwischen der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  und dem Flüssigkeitsvolumen  $V_L$  übt sich positiv auf den  $k_L a$  aus. In Abb. 21 ist auch zu sehen, dass das Begasungsverhältnis  $r$  keinen signifikanten Einfluss hat. Daher wird das Begasungsverhältnis  $r$  nicht bei der Bestimmung des  $k_L a$ - Wertes berücksichtigt. Das Begasungsverhältnis  $r$  zeigt den Sauerstoffanteil im Ingas an  $x_{O_{2in}}$ , der  $k_L a$ -Wert hängt also nicht von dem Sauerstoffanteil im Ingas ab.

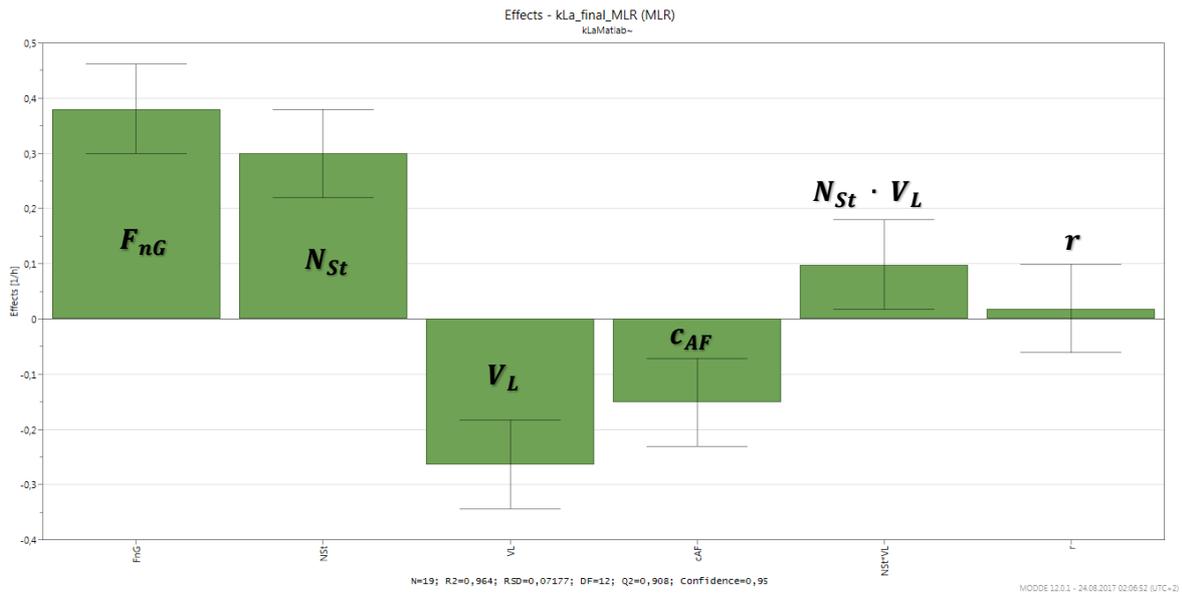


Abb. 21 - Effekte und deren Standardabweichungen im MLR Modell

Die Koeffizienten der resultierenden MLR-Gleichung sind in Abb. 20 gezeigt. Die Koeffizienten dieser Abbildung sind skaliert und zentriert und lassen daher einen direkten Vergleich der Koeffizienten und eine Beurteilung ihrer Einflussreichweite zu.

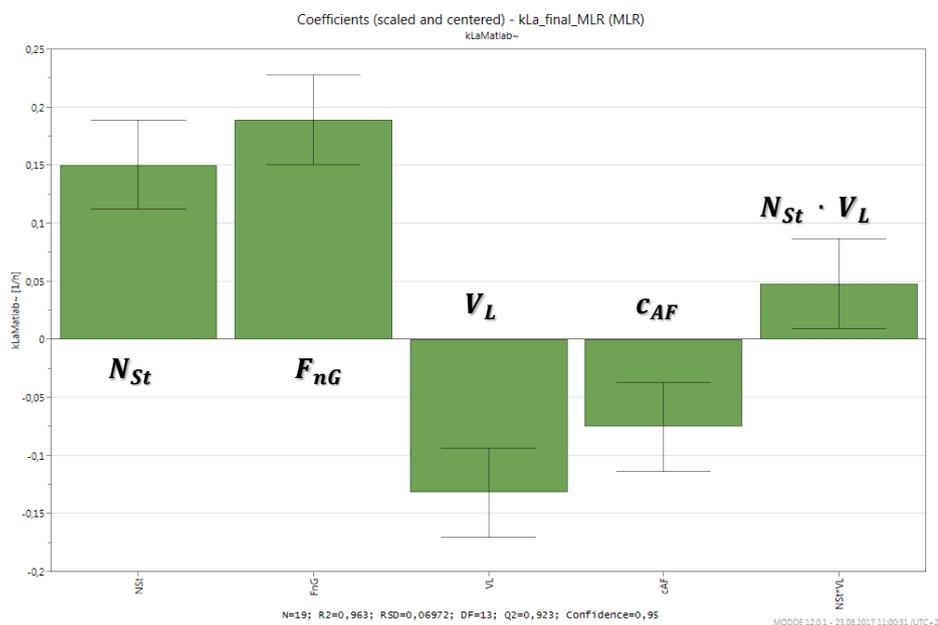


Abb. 20 - Finale Koeffizienten der MLR Gleichung zu den über Matlab bestimmten  $k_{La}$  Daten.

Zur Beurteilung der Modellgüte wird der „Summary of fit“ herangezogen (siehe Abb. 22). Alle Gütegrößen liegen über den Mindestanforderungen. Die Regressionsgleichung weist ein Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von 0.963 auf, die Differenz zwischen den Rohdaten und dem Regressionsmodell ist verhältnismäßig gering. Zukünftige Werte haben eine relativ hohe Güte, da die Vorhersagegüte  $Q^2$  bei 0.923 liegt. Das Modellverhalten wird in einem

angemessenen Rahmen durch die Regressionsgleichung repräsentiert. Die Modelvalidität liegt bei  $MV = 0.666$ . Die Experimente weisen eine sehr gute Wiederholbarkeit auf, mit einer Reproduzierbarkeit von  $RP = 0.982$ .

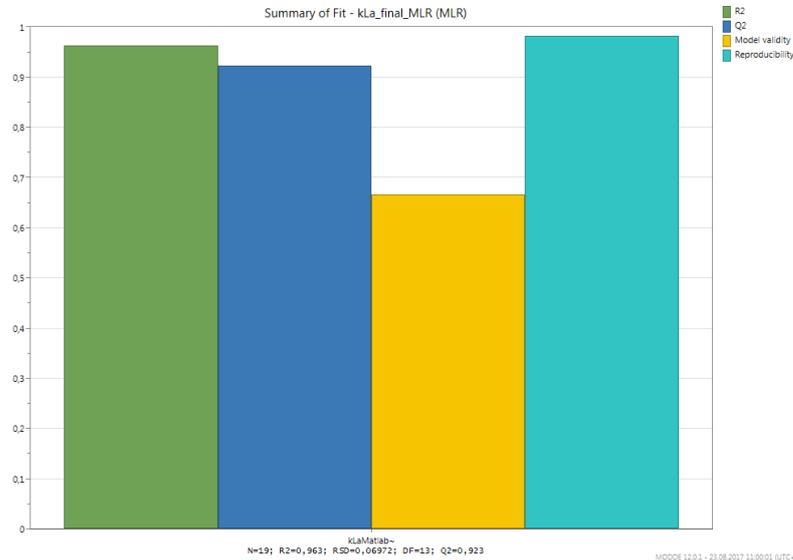


Abb. 22 - Güteprüfungsgrößen der MLR-Gleichung zur  $k_La$ -Wert Berechnung

Die Einflüsse der Faktoren die über das MLR-Modell festgestellt wurden lassen sich auch in den Versuchsverläufen der Vorversuche wiedererkennen. In Abb. 23 ist der Vergleich von Vorversuch 18 zu anderen Vorversuchen gezeigt, bei denen jeweils nur ein Einflussparameter geändert wurde. Die Steigung der Aufladekurve repräsentiert den  $k_La$ -Wert.

Die Kurve des Verlaufs von Vorversuch V17 mit einem Flüssigkeitsvolumen von  $V_L = 6L$  ist deutlich steiler als die von Vorversuch V18 mit einem Flüssigkeitsvolumen  $V_L = 10L$ . Durch den steileren Anstieg ist der  $k_La$ -Wert von V17 höher als der von V18. Der negative Einfluss des Flüssigkeitsvolumens lässt sich hier wiederzufinden. Aus der Betrachtung der Effekte ist hervorgegangen, dass das Begasungsverhältnis  $r$  keinen signifikanten Einfluss auf den  $k_La$ -Wert hat. Betrachtet man dafür V18 gegenüber V2 in Abb. 23, ist hier zwar ein Unterschied in der Steigung und damit im  $k_La$ -Wert zu erkennen, die Differenz der Steigungsabweichung ist jedoch deutlich geringer als die Differenz, die in den anderen Gegenüberstellungen zu beobachten ist.

Die MLR Gleichung für den logarithmierten  $k_La$ -Wert lautet:

$$k_La_{lg} = 0.883 + 0.00084 \cdot N_{St}(t) + 0.0105 \cdot F_{nG}(t) - 0.14 \cdot V_L(t) - 0.377 \cdot c_{AF}(t) + 0,0005 \cdot N_{St}(t) \cdot V_L(t) \quad (38)$$

Anschließend muss dieser Rücktransformiert werden, über die folgende Gleichung:

$$k_L a = \frac{10^{k_L a_{ig}} - C2}{C1} \quad (39)$$

Mit  $C1 = 1.4$  und  $C2 = -0.6$

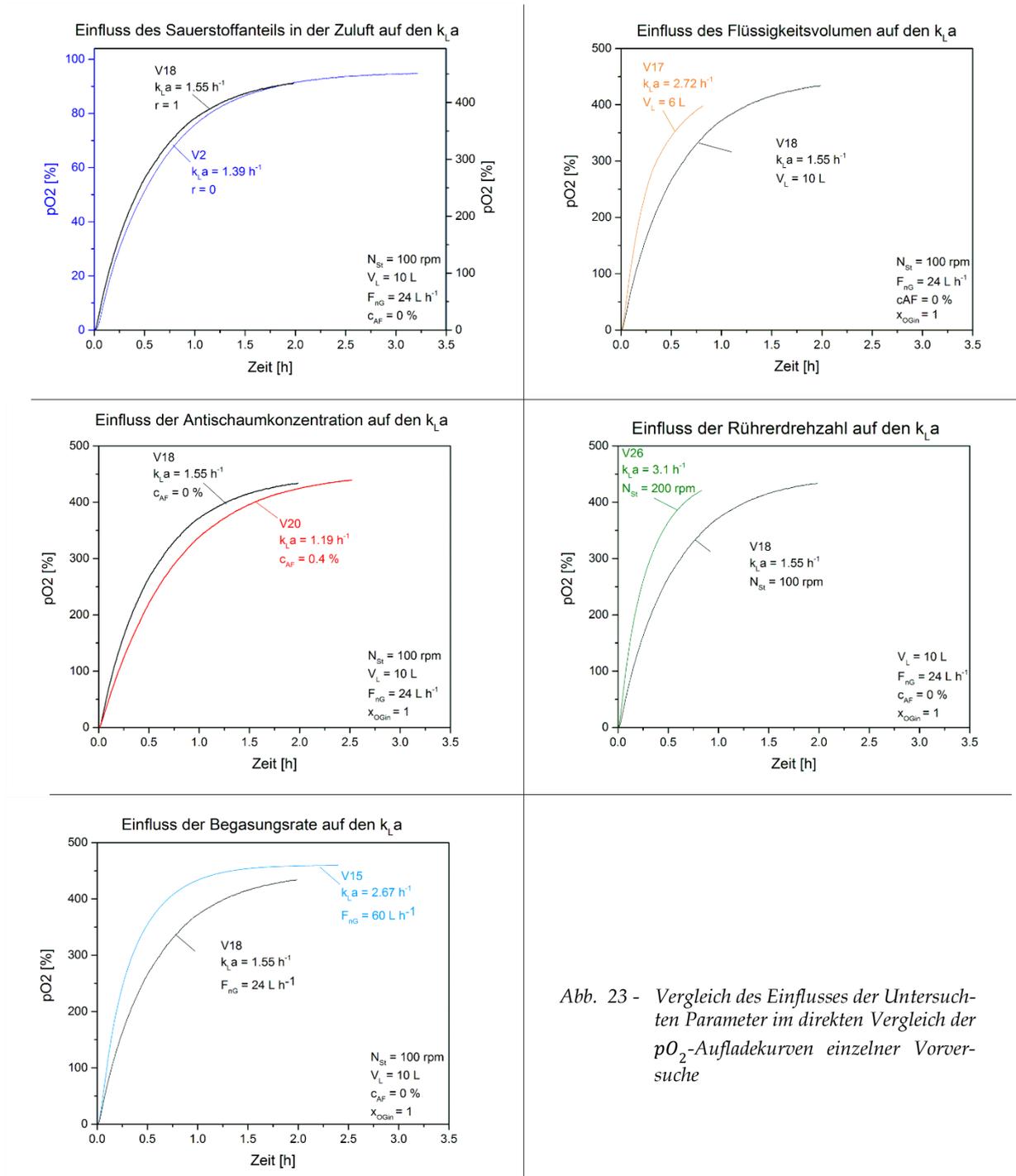


Abb. 23 - Vergleich des Einflusses der Untersuchten Parameter im direkten Vergleich der pO<sub>2</sub>-Aufladekurven einzelner Vorversuche

In Abb. 24 werden die aus dem MLR-Modell berechneten  $k_L a$ -Werte gegenüber den gemessenen  $k_L a$ -Werten gezeigt. Die Korrelation zeigt, dass das MLR-Modell sehr gut in der Lage ist, die gemessenen  $k_L a$ -Werte zu beschreiben.

Mit Hilfe dieser Vorversuche und der multilinearen Gleichung kann jeder Prozessparameter der zugehörigen  $k_L a$ -Werte online bestimmt werden.

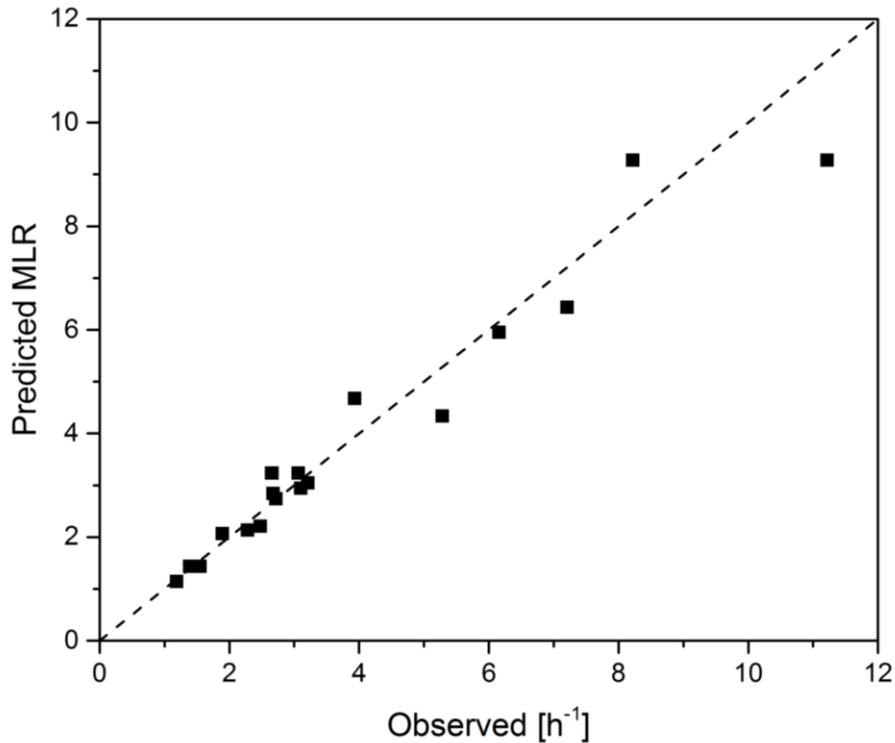


Abb. 24 - Gegenüberstellung der Analysierten  $k_L a$  Daten mit den Berechneten  $k_L a$ -Daten aus dem daraus gefolgerten MLR-Modell

#### 4.1.3. Van't Riet

Aus den Daten der  $k_L a$ -Werte der Vorversuche, wurde die empirischen Parameter der Van't-Riet-Gleichung bestimmt. Die Gleichung wurde zum einen auf den maximalen Werten der Vorversuche entwickelt, d.h. auf  $k_L a_{max}$ ,  $N_{St max}$ ,  $F_{nG max}$  und  $V_L max$ . Diese Gleichung wird im weiteren Van't Riet Max genannt. Eine weitere Gleichung wurde auf den Werten der Center Points der Vorversuche entwickelt, d.h. auf  $k_L a_{CP}$ ,  $N_{St CP}$ ,  $F_{nG CP}$  und  $V_L CP$ . Dieser Zusammenhang wird im weiteren Van't Riet EP genannt. Dabei ergaben sich die folgenden beiden Gleichungen:

Auf Basis der Maximalwerte:

Van't Riet Max: (40)

$$k_L a = 11.21 \cdot \left( \frac{N_{St}(t)}{200 \text{ rpm}} \right)^{3 \cdot 0.43} \cdot \left( \frac{F_{nG}(t)}{60 \text{ L/h}} \right)^{1.83} \cdot \left( \frac{V_L}{10L} \right)^{-0.43}$$

Auf Basis der Entwicklungspunkte (EP = Center Points):

Van't Riet EP:

( 41 )

$$k_L a = 2.8 \cdot \left( \frac{N_{St}(t)}{150 \text{ rpm}} \right)^{3 \cdot 0.2} \cdot \left( \frac{F_{nG}(t)}{42 \text{ L/h}} \right)^{0.42} \cdot \left( \frac{V_L}{8L} \right)^{-0.2}$$

Die empirischen Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  unterscheiden sich deutlich voneinander. So ist das  $\alpha$  der Van't Riet Max Gleichung mit  $\alpha = 0.43$  fast doppelt so groß wie das  $\alpha$  der Van't Riet EP Gleichung,  $\alpha = 0.2$ .

Das  $\beta$  der Van't Riet Max Gleichung  $\beta = 1.83$ , ist viermal so groß wie das der Van't Riet EP Gleichung,  $\beta = 0.42$ . Auf Basis der angenäherten Datenpunkte unterscheiden sich die Parameter des  $k_L a_{EP}$  mit einem Faktor von vier sehr stark voneinander,  $k_L a_{EP EP} = 2.8$ ;  $k_L a_{EP max} = 11.21$ .

In Abb. 25 sind die ermittelten  $k_L a$  -Werte aus den Vorversuchen gegenüber den berechneten  $k_L a$  -Wertes aus dem Van't Riet Modell – EP dargestellt. Zu erkennen ist hier, dass die berechneten  $k_L a$  -Werte die gemessenen Werte nicht beschreiben können. Die Abweichungen der  $k_L a$  -Werte sind sehr groß. Aus dem Modell ergeben sich keine  $k_L a$  -Werte größer als  $3 \text{ h}^{-1}$ , wo hingegen in den Vorversuchen Werte bis  $11 \text{ h}^{-1}$  gemessen

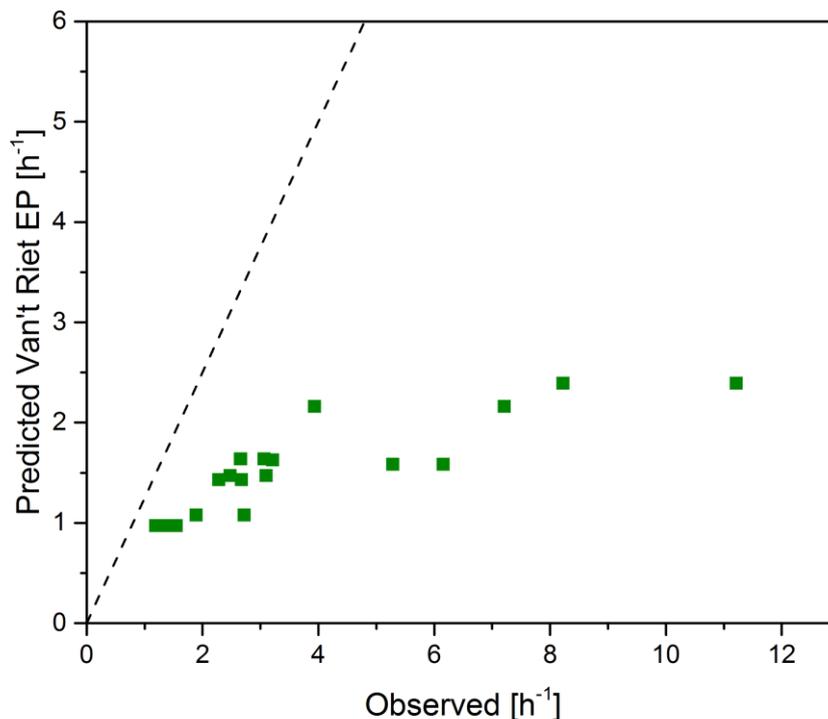


Abb. 25 - Gegenüberstellung der Analysierten  $k_L a$  Daten mit den Berechneten  $k_L a$ -Daten aus dem daraus Van't Riet Modell entwickelt über die Center Points

wurden. Dieses Modell ist daher nicht in der Lage die  $k_L a$ -Werte des Modellsystems zutreffend zu beschreiben.

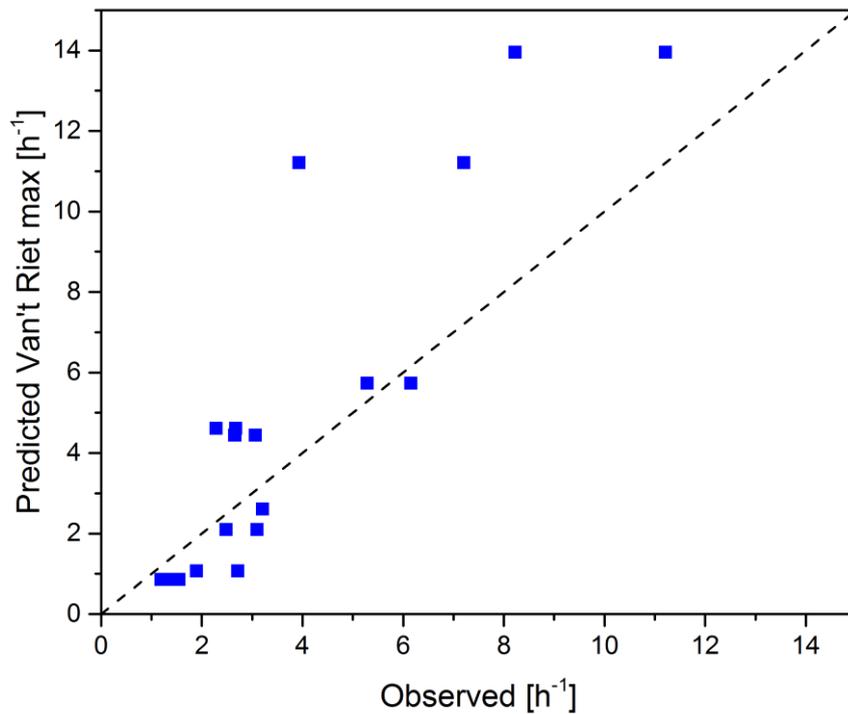


Abb. 26 - Gegenüberstellung der Analysierten  $k_L a$  Daten mit den Berechneten  $k_L a$ -Daten aus dem daraus gefolgerten Van't Riet Modell entwickelt über die Maximalwerte der Vorversuche

In Abb. 26 sind die ermittelten  $k_L a$  -Werte aus den Vorversuchen gegenüber den berechneten  $k_L a$  -Wertes aus dem Van't Riet Modell Max dargestellt. Die berechneten  $k_L a$  -Wertes aus diesem Modell sind im unteren Wertebereich innerhalb einer annehmbaren Toleranz. Im oberen Bereich weichen sie jedoch stark von den Original Daten ab. Für  $k_L a$ -Werte zwischen 2 und 3  $h^{-1}$  sind große Varianzen zu beobachten. Auch dieses Modell beschreibt die  $k_L a$ -Werte aus den Vorversuchen nur unzureichend.

Aus den Vorversuchen konnte ein Zusammenhang der Prozessparameter zum  $k_L a$ -Wert hergestellt werden, sodass es basierend hierauf möglich ist, online in einer Kultivierung den  $k_L a$ -Wert zu jedem Zeitpunkt zu bestimmen.

#### 4.1.4. Kultivierung

Die Kultivierung wurde mit einer Batch-Phase gestartet, auf die zwei Fed-batch Phasen folgen. Während der Kultivierung wurde der  $pH$  und der  $pO_2$  geregelt. Der  $pO_2$  wurde über drei Regelungskaskaden auf dem Sollwert gehalten.

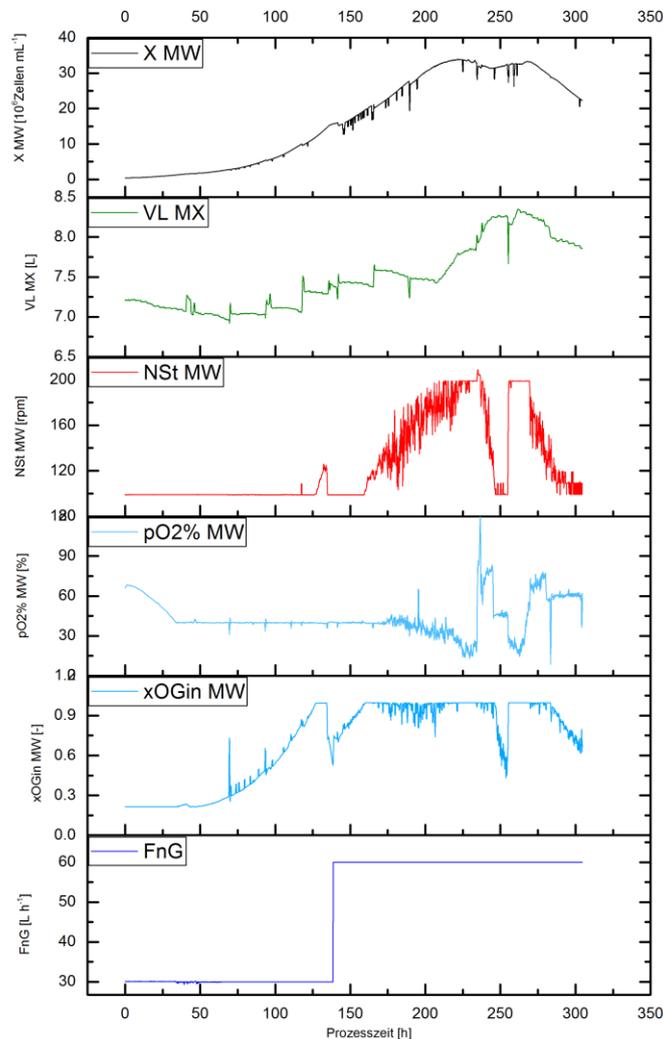


Abb. 27 - Verlauf der einzelnen Parameter über den gesamten Verlauf der Kultivierung, gemittelt über 10 Wertepaare bzw. 30min

Die Kultivierung verlief wie in Kapitel 2.1 Seite 2 beschrieben. In Abb. 27 ist der Verlauf der Zellzahl  $X$  [ $10^6$  Zellen  $mL^{-1}$ ], des Flüssigkeitsvolumen  $V_L$  [L], der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  [rpm], des  $pO_2$  [%], des Sauerstoffanteils im Ingas  $x_{OGin}$  [-] und der gesamte Begasungsrate  $F_{nG}$  [ $L h^{-1}$ ] dargestellt. Über die ersten 50 h ist keine  $pO_2$ -Regelung nötig. Die Zellen wachsen exponentiell, die Rührerdrehzahl  $N_{St}$ , die Begasungsrate  $F_{nG}$  und der Sauerstoffanteil im Ingas  $x_{OGin}$  sind konstant. Nach etwa 70 h beginnt die  $pO_2$ -Regelung durch das Anheben des Sauerstoffanteils im Ingas  $x_{OGin}$ . Etwa zum gleichen Zeitpunkt beginnt die erste Fed-batch Phase, durch manuelle Zugabe von Feed-Medium,

wodurch sich das Volumen der Flüssigkeit erhöht. Die Zellen wachsen weiterhin exponentiell, die Rührerdrehzahl  $N_{St}$  und die Begasungsrate  $F_{nG}$  bleiben unverändert. Nach einer Prozesszeit von 120 h wird nur noch mit reinem Sauerstoff begast ( $x_{OGin} \approx 1$ ). Da dies nicht ausreicht um den  $pO_2\%$  auf seinem Sollwert von 40% zu halten, wird die Rührerdrehzahl  $N_{St}$  von 100 rpm automatisch schrittweise angehoben auf etwa 125 rpm. Nach 130 h Kultivierung wird im Rahmen der zweiten Regelungskaskade die Begasungsrate  $F_{nG}$  von 30 L h<sup>-1</sup> manuell auf 60 L h<sup>-1</sup> angehoben. Die Regelung beginnt erneut über das Verhältnis der Begasungsrate von Sauerstoff und Luft zu regeln, wodurch der Sauerstoffanteil im Ingas  $x_{OGin}$  sinkt, genauso wie die Rührerdrehzahl  $N_{St}$ .

Bis zu diesem Zeitpunkt wachsen die Zellen exponentiell mit ihrer maximalen Wachstumsrate. Anschließend sinkt die Wachstumsrate. Ab einer Prozesszeit von etwa 200 h ist der Anteil der sterbenden und neu wachsenden Zellen im Gleichgewicht, bis ab einer Prozesszeit von 270 h der Anteil der lysierenden Zellen überwiegt und die Zellzahl sinkt. Nach 170 h Kultivierung kommt die  $pO_2$ -Regelung an ihre Grenzen. Die Begasung mit reinem Sauerstoff ( $x_{OGin} \approx 1$ ) reicht nicht aus und die dritte Regelungskaskade über den Rührer beginnt erneut. Die Rührerdrehzahl  $N_{St}$  steigt bis auf 200 rpm. Der  $pO_2\%$  steigt zwischen 225 und 250 h Prozesszeit wieder über seinen Sollwert. Der Sauerstoffanteil im Ingas  $x_{OGin}$  geht zurück und auch die Rührerdrehzahl  $N_{St}$  sinkt auf 100 rpm, solange bis der  $pO_2\%$  wieder unter 40 % sinkt. Nach etwa 300 h Kultivierungszeit ist die Viabilität der Zellen unter 60 % und der Prozess wird abgebrochen. Die kleinen Peaks im  $pO_2\%$ -Signal, die deutlicher in dem Prozesszeitintervall von 0 bis 180 h zusehen sind, repräsentieren die Messungen der dynamischen Methode.

#### 4.1.4.1. *Ergebnisse aus der Referenzmethode*

Über die dynamische Methode wurde mehrmals am Tag während der Kultivierung der  $k_L a$ -Werte bestimmt. Der Verlauf des  $k_L a$ -Wertes ist zusammen mit den einflussnehmenden Prozessparametern in Abb. 28 abgebildet. Die  $OUR$  wurde über die Steigung des Sauerstoffabfalls über die dynamische Methode bestimmt. Über die Division der  $OUR$  durch die Differenz der Sauerstoffkonzentration der Sättigungskonzentration  $c_{OL}^*$  zum Gleichgewichtszustand  $c_{OLSS}$ , kann der  $k_L a$ -Wert bestimmt werden.

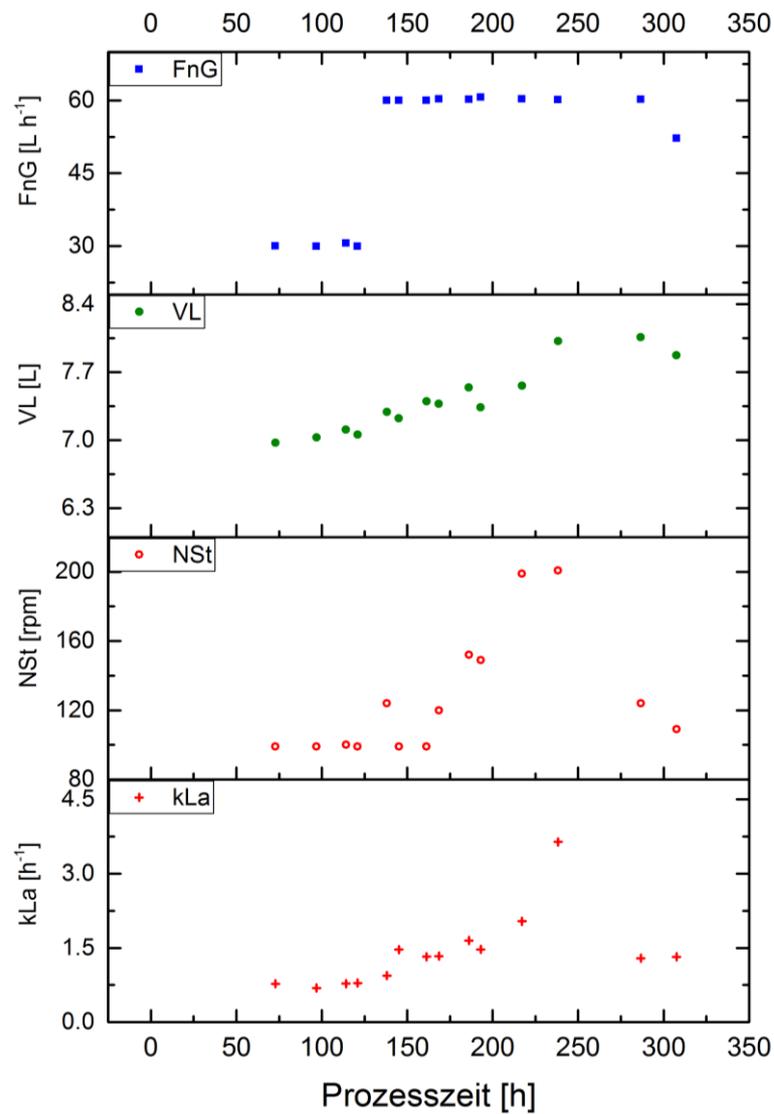


Abb. 28 - Einflussnehmende Prozessparameter auf den  $k_{La}$ -Wert zusammen mit dem Verlauf des  $k_{La}$ -Wertes aus der Kultivierung bestimmt über die dynamische Methode

Der Verlauf dieses  $k_{La}$ -Wertes ist zusammen mit den einflussnehmenden Prozessparametern in Abb. 28 abgebildet. Der maximale  $k_{La}$ -Wert der in dieser Abbildung bei einer Prozesszeit von etwa 230 h zu sehen ist, hängt durch die Berechnung aus der *OUR* direkt mit dem Sauerstoffanteil im Ingas  $x_{O_{2in}}$  zusammen. Da dieser Datenpunkt nicht repräsentativ für das System ist, da der  $k_{La}$ -Wert nicht vom Sauerstoffgehalt des Ingases  $x_{O_{2in}}$  abhängt, wird dieser Datenpunkt als Ausreißer klassifiziert.

#### 4.1.5. Modellbildung zu den Daten der Referenzmethode über Van't Riet

Aus den Datenpunkten der dynamischen Methode während der Kultivierung wurde ebenfalls nach dem Ansatz von Van't Riet eine Gleichung zum beschreiben des Zusammenhangs zwischen den Prozessparametern und des  $k_L a$ -Wertes entwickelt. Dabei wurden die Gleichung einmal auf Basis aller Datenpunkte aus der dynamischen Methode bestimmt, die entwickelte Gleichung wird im weiteren Verlauf Van't Riet I genannt. Zusätzlich wurde eine weitere Gleichung ohne den oben beschriebenen Ausreißer entwickelt, diese wird im weiteren Verlauf Van't Riet II genannt.

Van't Riet I - Auf Basis aller Datenpunkte

$$k_L a = 3.64 \cdot \left( \frac{N_{St}(t)}{200.76 \text{ rpm}} \right)^{3 \cdot 0.7} \cdot \left( \frac{F_{nG}(t)}{60.65 \text{ L/h}} \right)^{0.25} \cdot \left( \frac{V_L}{8.06L} \right)^{-0.7} \quad (42)$$

Van't Riet II - Ohne den Datensatz des Ausreißers

$$k_L a = 2.04 \cdot \left( \frac{N_{St}(t)}{198 \text{ rpm}} \right)^{3 \cdot 0.27} \cdot \left( \frac{F_{nG}(t)}{60.65 \text{ L/h}} \right)^{0.62} \cdot \left( \frac{V_L}{8.06L} \right)^{-0.27} \quad (43)$$

Im Vergleich dieser beiden Gleichungen fällt auf, dass sich die empirischen Parameter  $\alpha$  und  $\beta$  nahezu vertauscht haben. Das bedeutet, dass für die Gleichung Van't Riet II der Einfluss der Begasungsrate  $F_{nG}$  stärker berücksichtigt wird, als der Einfluss der Drehzahl  $N_{St}$ . Bei der Gleichung Van't Riet I wird der Einfluss der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  mehr gewichtet als der Einfluss der Begasungsrate  $F_{nG}$ . Im Vergleich zu den Parametern der Van't Riet Gleichung aus den Vorversuchen sind die empirischen Parameter der Gleichung Van't Riet EP ähnlich groß wie die von Van't Riet II (vgl. Tabelle 5). Die Parameter der Van't Riet Max Gleichung haben keine Vergleichbarkeit zu den anderen Modellen, nur dass  $\beta$  größer ist als  $\alpha$  wie bei der Van't Riet EP und Van't Riet II.

Tabelle 5 - Vergleich der Parameter der Van't Rietgleichung auf Basis der Vorversuche und der Referenzdaten der dynamischen Methode

Gleichung	$k_L a_{EP} [h^{-1}]$	$\alpha$	$\beta$	$\beta/\alpha$
Van't Riet Max	11.21	0.43	1.83	4.2
Van't Riet EP	2.8	0.2	0.42	2.1
Van't Riet I	3.64	0.7	0.25	0.35
Van't Riet II	2.04	0.27	0.62	2.2

In Abb. 29 sind die aus der Kultivierung ermittelten  $k_L a$  -Werte gegenüber den Modellwerten aus Van't Riet Modells I dargestellt. Die berechneten  $k_L a$ -Werte im oberen und unteren Wertebereich sind in etwa so groß wie die Daten auf denen sie entwickelt wurden. Der Abstand im mittleren Wertebereich von den berechneten Daten zu den Entwicklungsdaten ist jedoch zu groß.

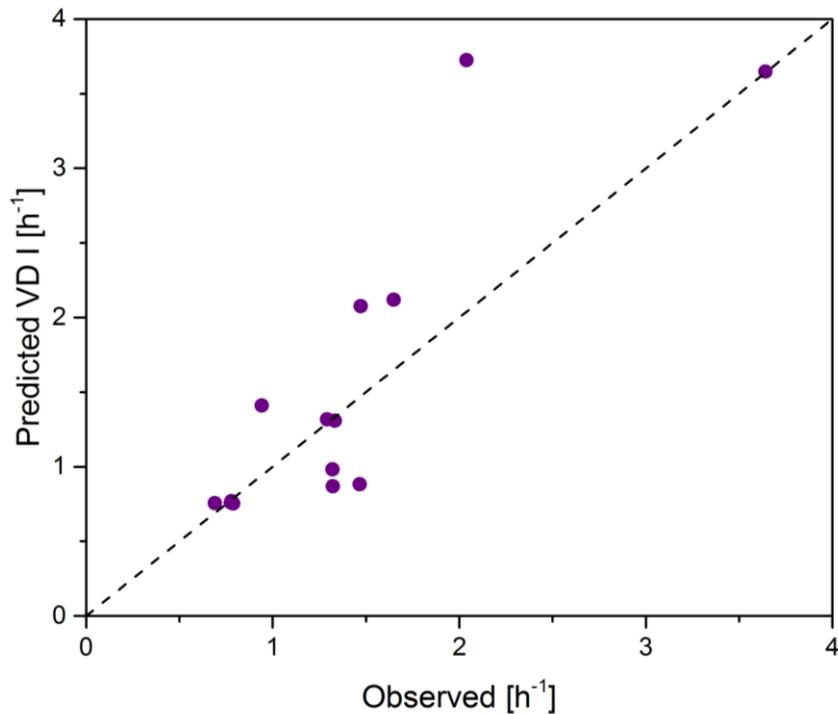


Abb. 29 - Gegenüberstellung der Datenpunkte der  $k_L a$ -Wert Bestimmung aus der dynamischen während der Kultivierung mit den Berechneten  $k_L a$ -Daten aus dem daraus gefolgerten Van't Riet Modell entwickelt über diese Datenpunkte mit dem Ausreißer

In Abb. 30 sind die aus der Kultivierung ermittelten  $k_L a$  -Werte gegenüber denen berechneten Modellwerten aus Van't Riet Modells II dargestellt. Die berechneten  $k_L a$  -Werte passen nur für den Ausreißer nicht zu den gemessenen Werten. Die übrigen Werte, aus denen das Modell entwickelt wurde, werden gut abgebildet.

Aus der Referenzmessung ist somit ein mathematischer Zusammenhang zwischen den Prozessparametern und dem  $k_L a$ -Wertes für die Kultivierung entwickelt worden. Dieser Zusammenhang sollte auch für weitere CHO-Kultivierungen gültig sein, sodass die Entwicklung der Modellgleichung nicht bei jeder Kultivierung durchgeführt werden muss.

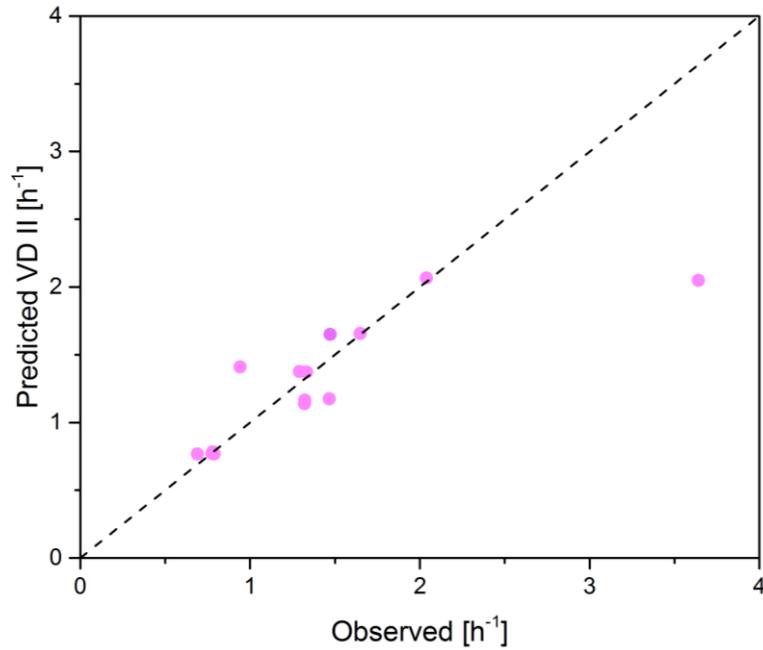


Abb. 30 - Gegenüberstellung der Datenpunkte der  $k_L a$ -Wert Bestimmung aus der dynamischen während der Kultivierung mit den Berechneten  $k_L a$ -Daten aus dem daraus gefolgerten Van't Riet Modell entwickelt über diese Datenpunkte ohne den Ausreißer

#### 4.2. Vergleich der Modelle

Der Verlauf des  $k_L a$  -Werts über die unterschiedlichen Berechnungsarten in der Kultivierung ist in Abb. 31 und Abb. 32 gezeigt. In Abb. 31 sind die Modelle, die auf der Basis der Vorversuche entstanden sind, gezeigt. In Abb. 32 sind die Modelle abgebildet, die auf der Basis der Daten aus der dynamischen Methode entwickelten wurden. In beiden Abbildungen sind die Datenpunkte der dynamischen Methode als Referenz mit abgebildet.

Aus Abb. 31 ist zu erkennen, dass die Modelle auf Basis der Vorversuche zwar den Verlauf des  $k_L a$ -Wertes während der Kultivierung abbilden, aber die Größenordnung viel zu hoch ist. Die Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes über das Modellsystem PBS ist somit nicht ohne Weiteres auf die Bedingungen einer Kultivierung im Medium übertragbar. PBS scheint daher das falsche Modellsystem für diese Versuche zu sein.

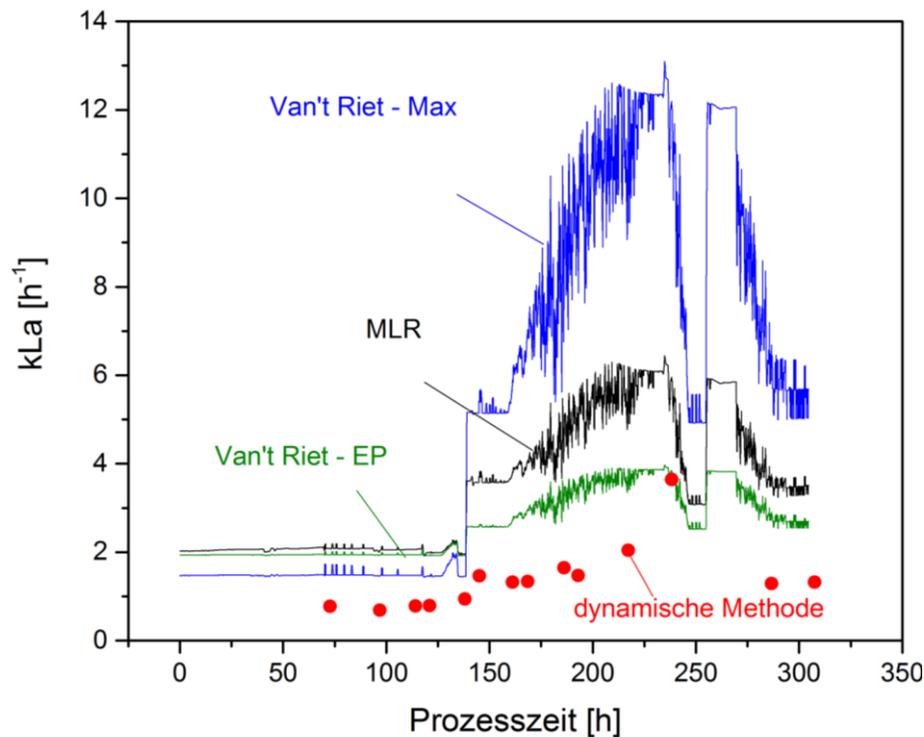


Abb. 31- Gegenüberstellung der Berechnungsmodelle auf der Basis der Vorversuche mit den Datenpunkten aus der Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes über die dynamische Methode über den Verlauf der Kultivierung

Aus Abb. 32 lässt sich erkennen, dass das Van't Riet Modell II – ohne Berücksichtigung des Ausreißers- den Referenzwerten am nächsten ist. Die Parameter des Van't-Riet-Modells I (mit Ausreißer) und II sind antisymmetrisch. So ist der  $\alpha$ -Parameter des Van't Riet Modells I in der gleichen Größenordnung wie der  $\beta$ -Parameter des Van't-Riet-Modells II. Die Gewichtung des Einflusses der Drehzahl  $N_{st}$  und der Begasungsrate  $F_{nG}$  wird dadurch verschoben. Zu sehen ist dies in Abb. 32 zur Prozesszeit 125 h, wo der Anstieg der Kurve unterschiedlich hoch ist.

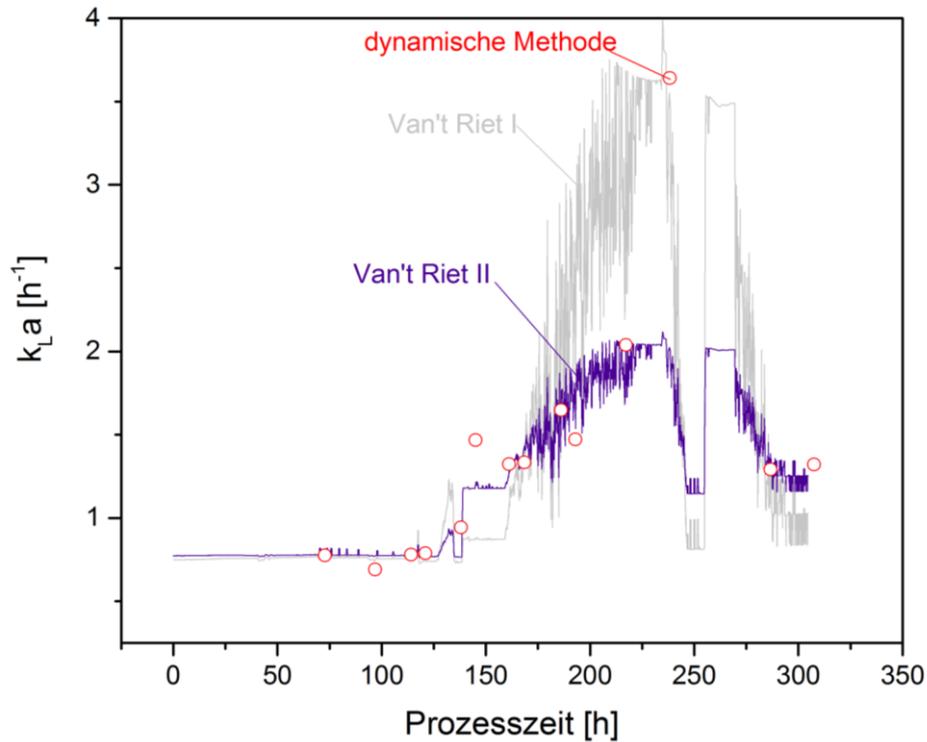


Abb. 32 - Gegenüberstellung der Berechnungsmodelle auf der Basis der Vorversuche mit den Datenpunkten aus der Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes über die dynamische Methode über den Verlauf der Kultivierung

In Abb. 33 sind noch einmal beide Modelle von Van't Riet I und II zusehen, zusammen mit den Verläufen der Rührerdrehzahl  $N_{St}$ , der Begasungsrate  $F_{nG}$  und des Flüssigkeitsvolumens  $V_L$  in der gemittelten Form über 30 min. In lila gefärbten Verlauf des  $k_L a$ -Wertes nach dem Van't-Riet-Modell II ist der Sprung der Begasungsrate  $F_{nG}$  bei einer Prozesszeit von etwa 130h zu erkennen. Kurz davor in dem grau gefärbten Verlauf des Van't-Riet-Modells I der Anstieg der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  zu sehen. Die Änderung der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  und der Begasungsrate  $F_{nG}$  ist in beiden Modellen zu sehen, jedoch in entgegengesetzter Größenordnung. Die jeweils andere Prozessgröße ist deutlich schwächer zu erkennen. Die Einflussstärke der Begasungsrate  $F_{nG}$  und der Rührerdrehzahl  $N_{St}$  des Van't-Riet-Modell I steht dadurch entgegen der Aussage von den ermittelten Effekten aus der MLR Methode, bei der die die Begasungsrate  $F_{nG}$  den größeren Einfluss hat als die Rührerdrehzahl  $N_{St}$ .

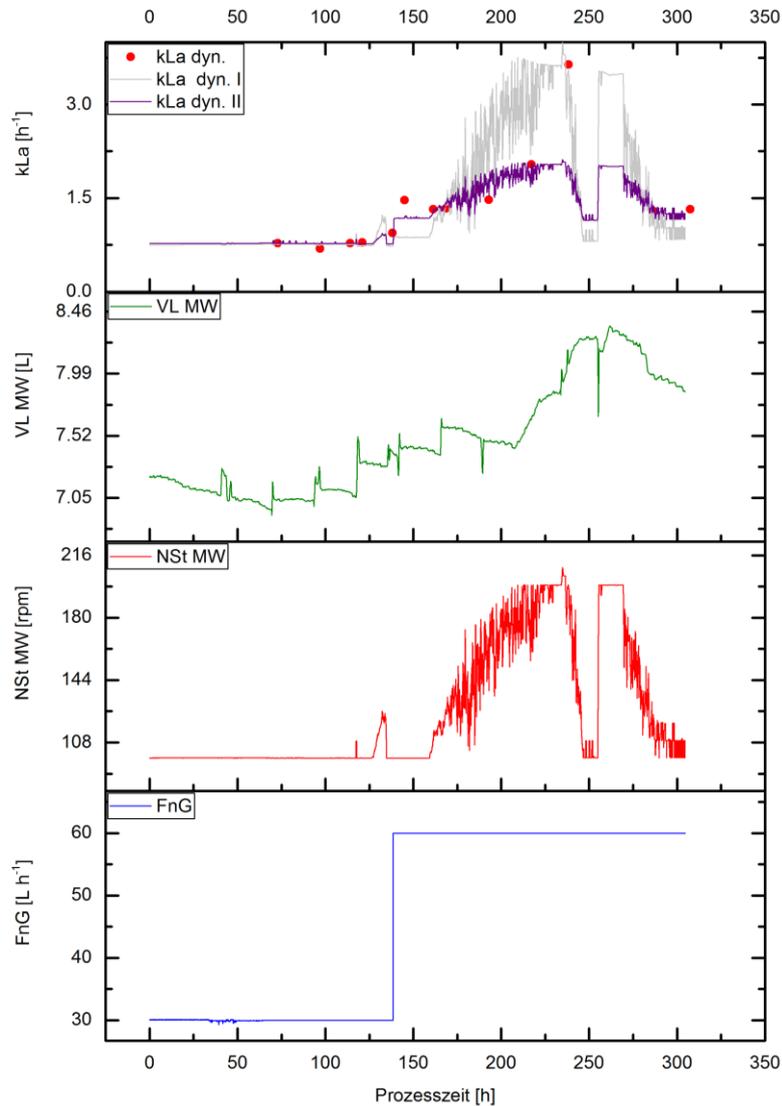


Abb. 33 - Verlauf des  $k_L a$ 's bestimmt aus den Modell Gleichungen Van't Riet I und II im Vergleich zu den Datenpunkt aus der dynamischen Methode und den Prozessgrößen  $N_{St}$ ,  $F_{nG}$  und  $V_L$

Auch wenn das Van't-Riet-Modell die Daten besser wiedergibt, so kann es nicht den Einfluss des Antischaummittels abbilden. Dies ist eine Schwäche des Van't-Riet-Modells, da die Vorversuche gezeigt haben, dass die Antischaumkonzentration einen Einfluss auf den  $k_L a$ -Wert hat. Da sich die Antischaumkonzentration während einer Kultivierung ändert, sollte dieser Faktor für eine zutreffende Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes auch berücksichtigt werden.

#### 4.3. Vergleich Modellsystem PBS mit dem Kultivierungsmedium

Um zu überprüfen, ob PBS das richtige Modellsystem für die Vorversuche ist, wurde die Osmolarität und die Leitfähigkeit von PBS und dem Kultivierungsmedium bestimmt. Des Weiteren wurde die Leitfähigkeit und Osmolarität für Reinstwasser gemessen. Da der Henry-Koeffizienten auf Basis von Reinstwasser berechnet wurde und eine Abhängigkeit des Henry-Koeffizient zum Ionengehalt besteht, kann über die Leitfähigkeit ein Zusammenhang zu einem passenden oder unpassenden Henry-Koeffizienten für das Kultivierungsmedium abgeleitet werden. Die Ergebnisse der Messung sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6 – Messungen der Leitfähigkeit und Osmolarität der Modellsysteme im Vergleich

Probeninhalt	$\vartheta$ [°C]	Leitfähigkeit $\left[\frac{\text{mS}}{\text{cm}}\right]$	Osmolarität $\left[\frac{\text{mOsmol}}{\text{kg}}\right]$
PBS	37	15.37	260
PBS mit $c_{AF} = 0,2\%$	37	15.31	257
PBS mit $c_{AF} = 0,4\%$	37	15.82	269
Reinstwasser	37	0.001	9
Kultivierungsprobe mit Zellen	33.1	10.7	298
Kultivierungsmedium	31.8	10.08	284
Feed-Medium	32.3	6.92	578

Die Leitfähigkeit und auch die Osmolarität von PBS und dem Fermentationsmedium liegen in der gleichen Größenordnung. Die Leitfähigkeit und die Osmolarität von Reinstwasser weichen stark von denen des Kultivierungsmedium ab.

Daher wurde ein Teil der DoE Versuche aus dem Versuchsplan mit Fermentationsmedium durchgeführt. Eine Gegenüberstellung der Aufladekurven von PBS und Medium ist in Abb. 34 dargestellt.

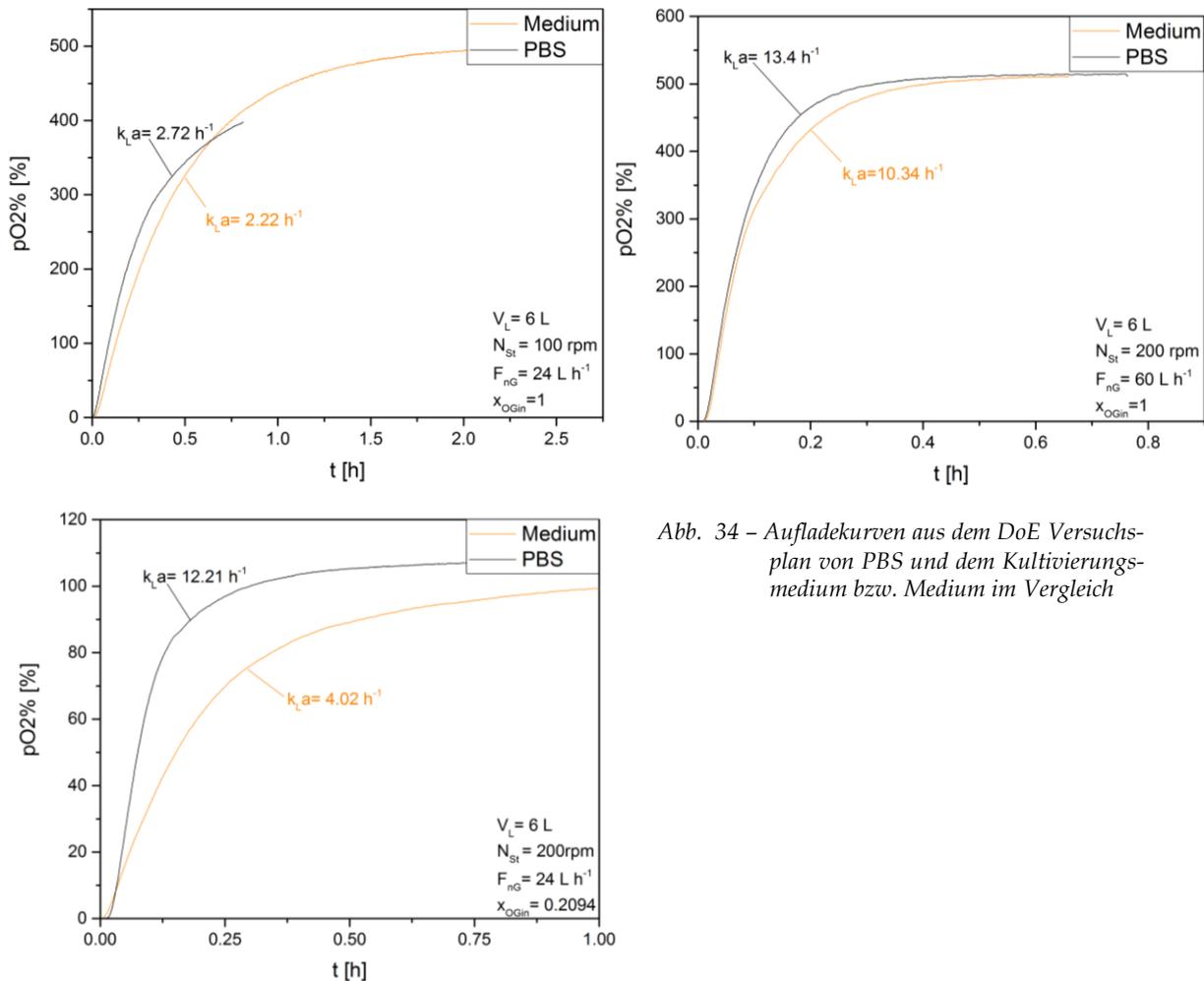


Abb. 34 – Aufladekurven aus dem DoE Versuchsplan von PBS und dem Kultivierungsmedium bzw. Medium im Vergleich

Aus Abb. 34 lässt sich ein Unterschied im Systemverhalten zwischen PBS und Kultivierungsmedium erkennen. Das Kultivierungsmedium weist generell einen schlechteren Sauerstofftransport als das PBS-System auf. Dies lässt sich in einem niedrigeren  $k_L a$  - Wert des Kultivierungsmedium im Vergleich zum PBS-System in allen drei Versuchen beobachten. Die Abweichung des Transportkoeffizienten ist dabei nicht konstant. Ein Zusammenhang zwischen weiteren Parametern wie der Begasungsrate  $F_{nG}$  scheinen die Transporteigenschaften zu reduzieren. Weitere Versuchen zur Analyse des Verhalten vom Kultivierungsmedium sollten daher durchgeführt werden.

#### 4.4. Online Bestimmung der OUR und qOUR

Die *OUR*-Referenzwerte wurden über die dynamische Methode während der Kultivierung bestimmt. Zusammen mit dem Signal der Zellzahl wurde daraus die *qOUR* berechnet. Über die Modelle zur Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes wurde aus den Prozesssignalen des Drucks  $p$  und des  $pO_2$ -Wertes die *OUR* berechnet und anschließend über das Zellzahlensignal die *qOUR* bestimmt. Zunächst wird der Verlauf der *OUR* und der *qOUR* aus den unterschiedlich berechneten  $k_L a$ -Modellen betrachtet. Anschließend wird der Verlauf der *OUR* und der *qOUR* aus den Messungen der dynamischen Methode betrachtet. Abschließend werden die gemessenen Daten denen der berechneten Ergebnisse gegenübergestellt.

##### 4.4.1. Bestimmung der OUR und qOUR aus den Modellen

In Abb. 35 ist der Verlauf der Kultivierung abgebildet, zusammen mit den berechneten Größen  $k_L a$ , *OUR* und *qOUR* aus den Modellen MLR, Van't Riet über den Entwicklungspunkt und über die Messwerte der dynamischen Methode II (Datenreihe ohne den Ausreißer).

Die *OUR* steigt zu nächst exponentiell an, bis sie bei etwa 130 h einbricht. Nachdem Einbruch steigt die *OUR* erneut exponentiell an. Ab einer Prozesszeit von etwa 230 h sinkt die *OUR* ab. Bei einer Prozesszeit von etwa 250 h steigt die *OUR* sprunghaft wieder an, bleibt vorerst konstant und beginnt bei 250 h zu sinken.

Die *qOUR* sinkt die ersten 30 h der Kultivierung. Anschließend bleibt sie konstant mit leichten Schwankungen bis zu einer Prozesszeit von etwa 230 h. Ein Peak ist bei einer Prozesszeit von 70 h zu beobachten. Ab einer Prozesszeit von 230 h sinkt die *qOUR* zunächst, steigt bei 250 h wieder sprunghaft an. Die *qOUR* bleibt bis 270 h Prozesszeit konstant und sinkt dann bis zum Ende der Kultivierung stetig ab.

Der oben beschriebene Verlauf der *OUR* und der *qOUR* ist in allen drei Modellen zu erkennen. Sie unterscheiden sich lediglich in der Größenordnung und der Ausprägung der Sprünge.

Die Sprünge und der absinkende Verlauf lassen sich auf den Verlauf des Sauerstoffanteils im Ingas  $x_{O_{2in}}$  zurückführen.

Der Peak bei einer Prozesszeit von etwa 70 h ist sowohl in der *qOUR*, als auch in der *OUR* zu erkennen. Er scheint direkt in Verbindung mit dem Sprunghaften Anstieg gefolgt von einem direkten Abfall des Sauerstoffanteils im Ingas  $x_{O_{2in}}$  zu stehen (vgl. Abb. 35). Eine

ähnliche Verbindung zum Sauerstoffanteil im Ingas  $x_{OGin}$  lässt sich bei einer Prozesszeit von etwa 130 h erkennen. Hier sinkt der Sauerstoffanteil des Ingases  $x_{OGin}$  von 1 ab auf etwa 0.6. Ähnliche Verläufe sind bei der  $qOUR$  und der  $OUR$  zu beobachten. Die Korrelation der Größen  $x_{OGin}$  und  $qOUR$  bzw.  $OUR$  lässt sich erneut bei einer Prozesszeit von 230 h bis 250 h beobachten.

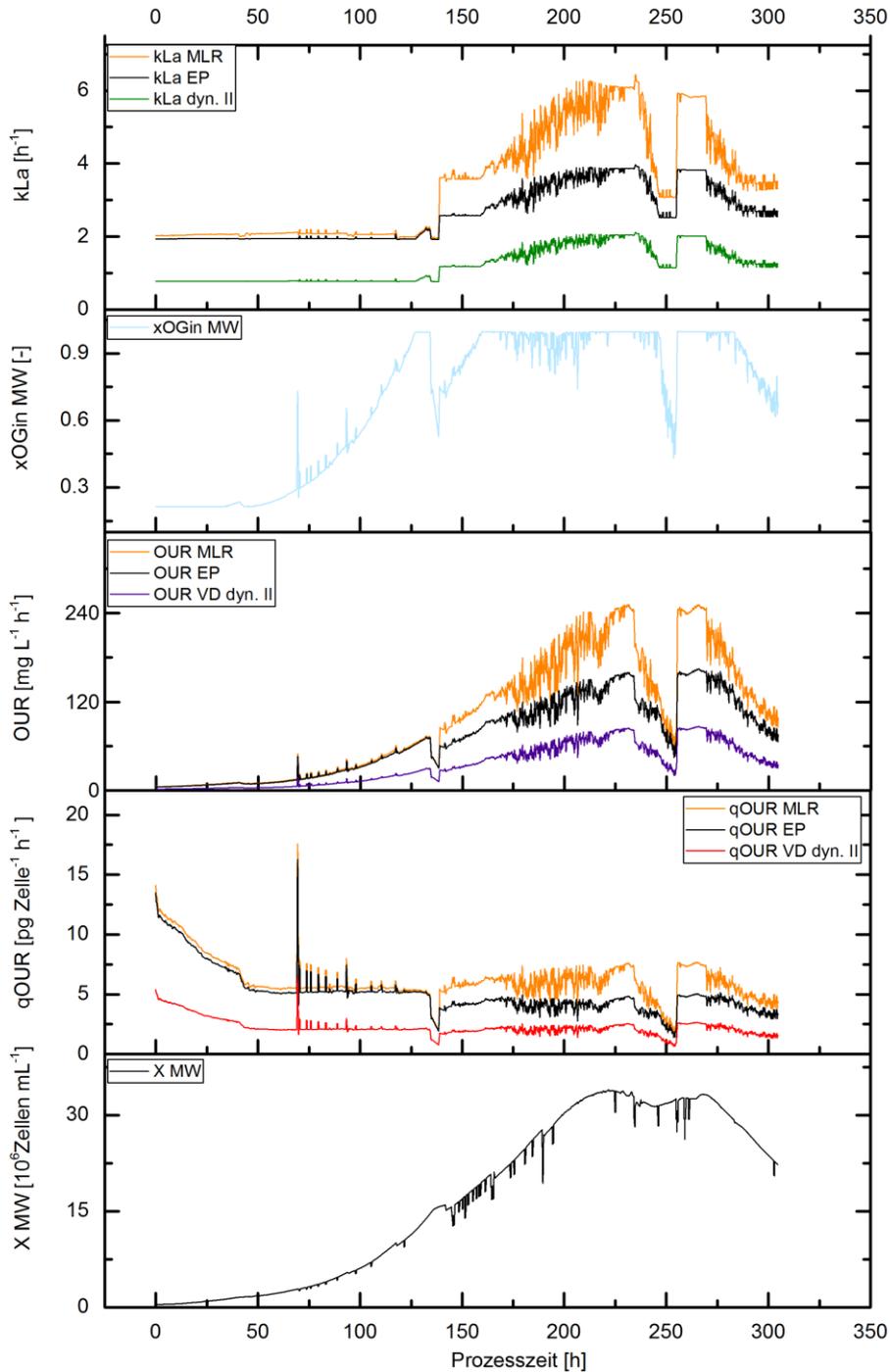


Abb. 35 - Vergleich der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden der Größen  $kLa$ ,  $OUR$  und  $qOUR$  im Vergleich zusammen mit den Prozessgrößen der Kultivierung

#### 4.4.2. OUR Bestimmung über die Dynamische Methode als Referenz

Während der Kultivierung wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten über die dynamische Methode die *OUR* und die *qOUR* bestimmt, diese sind in Abb. 36 dargestellt.

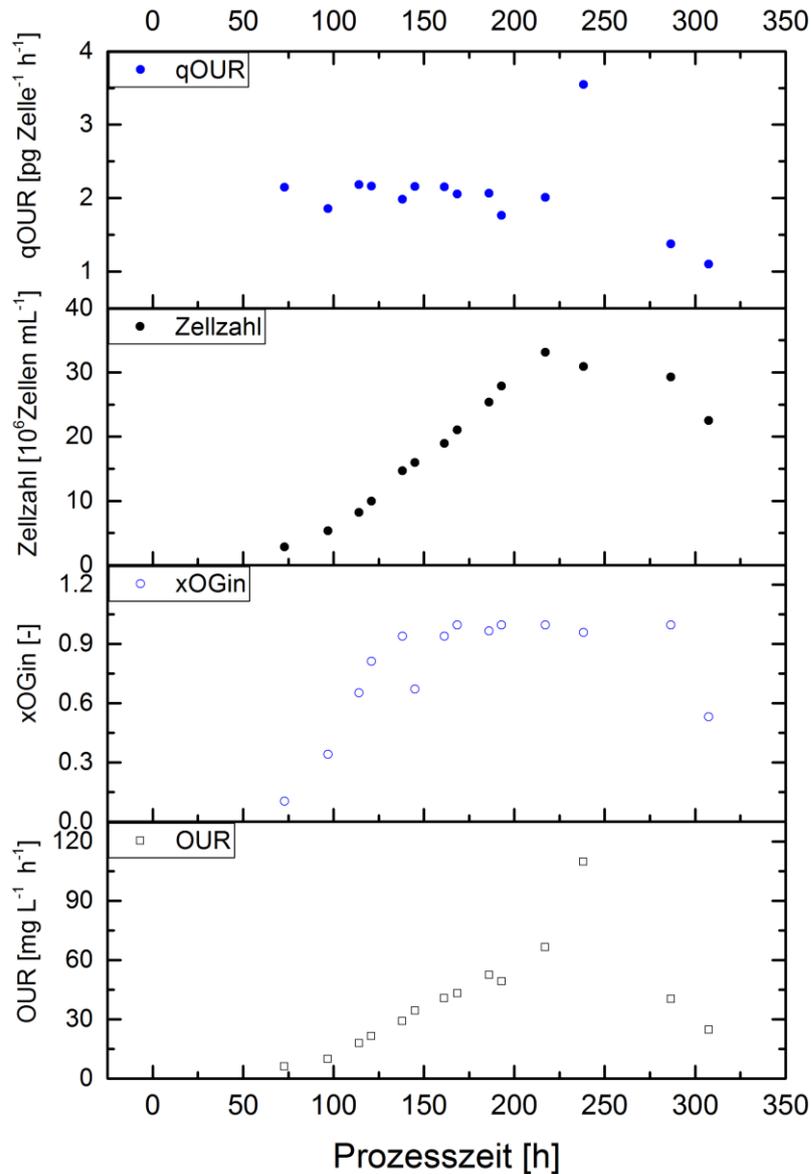


Abb. 36 - Verlauf zu den Messungen der dynamischen Methode zur Bestimmung der *OUR*

Wie erwartet steigt die *OUR* zunächst an. Bei einer Prozesszeit von etwa 250 h erreicht die *OUR* ein Maximum bei etwas über  $115 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und fällt dann unter  $30 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Die *qOUR* bleibt zunächst konstant bei etwa  $2 \text{ pg Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , steigt dann sprunghaft an auf etwa  $3.5 \text{ pg Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$  und fällt dann ab auf einen Wert unter  $1 \text{ pg Zelle}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### 4.4.3. Vergleich der online OUR Modelldaten mit Referenz Daten

In Abb. 37 sind die Modelle zur Berechnung der *OUR* gegenüber den Datenpunkten der Referenzmessung gezeigt. Abb. 38 zeigt die Modelle zur Berechnung der *qOUR*, zusammen mit den Datenpunkten der Referenzmessung. Die *OUR* wird aus den  $k_La$ -Werten berechnet, zusammen mit der Zellzahl wird daraus die *qOUR* berechnet. Für die Berechnung der *OUR* wurden die  $k_La$ -Modelle aus den Methode der MLR und Van't Riet basierend auf den Daten der Vorversuche genutzt. Als drittes  $k_La$ -Modell, wurde die Van't Riet II genutzt, die auf der Grundlage der Datenpunkte aus der dynamischen Messung ohne den Ausreißer Punkt entwickelt wurde. Der Verlauf während der Kultivierung wurde bereits in den beiden vorherigen Kapiteln beschrieben. Nun sollen die Modelle direkt verglichen werden.

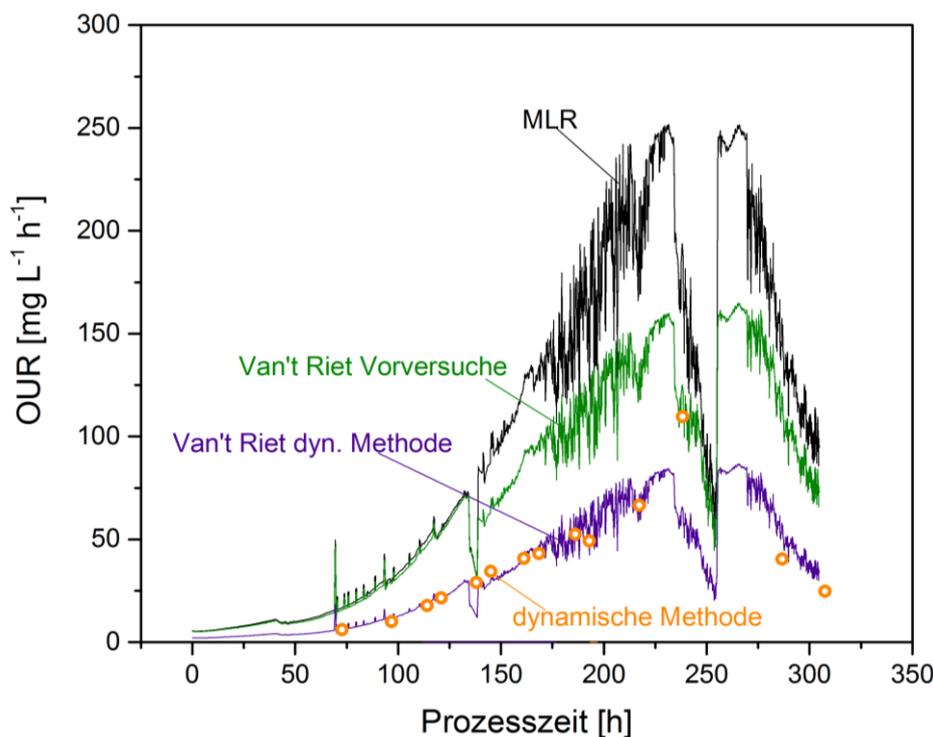


Abb. 37 - Vergleich der Modelle zur Berechnung der *OUR* mit den Ergebnissen der Referenzmethode

Schon zu Beginn der Kultivierung liegen nur die berechneten *OUR*-Werte nach der Gleichung von Van't Riet II nahe an den Messpunkten der dynamischen Methode. Mit fortschreitender Prozesszeit vergrößert sich der Abstand der anderen beiden Modelle Van't Riet EP und MLR zu den Referenzdatenpunkten. Es ist ein geringer Abstand des Verlaufs der berechneten *OUR* aus dem  $k_La$ -Werten der Van't Riet II Gleichung zu sehen. Die Abweichung wird ab einer Prozesszeit von 230 h größer. Ab diesem Zeitpunkt schwanken die Prozessparameter stark, sodass die Verlässlichkeit der Mittelwertbildung hinterfragt werden muss.

Die Modelle auf Basis der Vorversuche Van't Reit EP und MLR bilden das System nicht repräsentativ ab. Der Verlauf der  $OUR$  nach der Gleichung von Van't Riet II ist den Datenpunkten der Referenzmessung sehr nah.

Der Verlauf der berechneten  $qOUR$  bewegt sich für keines der Modelle auf Basis der Vorversuche in der Größenordnung der gemessenen  $qOUR$  aus der dynamischen Methode. Der Verlauf der  $qOUR$  auf der Basis der Van't Riet II Gleichung ist den Datenpunkten der Referenzmessung sehr nah. Ähnlich wie bei der  $OUR$  ist eine Abweichung ab der Prozesszeit von 230 h zu den Referenzpunkten größer. Aus der Gleichung zur Be-

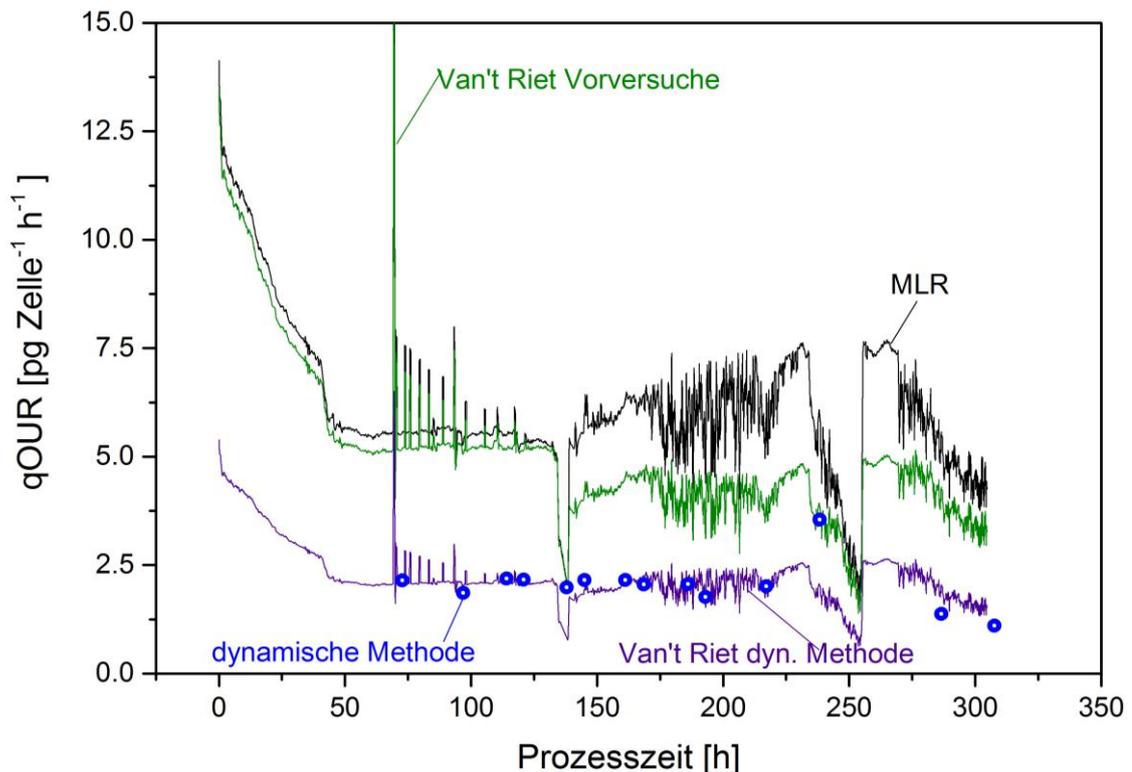


Abb. 38 - Vergleich der Modelle zur Berechnung der  $qOUR$  mit den Ergebnissen der Referenzmethode

rechnung des  $k_L a$ -Wertes nach der Van't Riet II, ermittelt aus den Datenpunkten der Referenzmethode, lassen sich sowohl die  $OUR$ , als auch die  $qOUR$  in einer repräsentativen Größenordnung berechnen. Nur bei starken Schwankungen der Prozessparameter kann das Systemverhalten nicht gut abgebildet werden. Die Gleichungen zur Berechnung des  $k_L a$ -Wertes auf der Basis der Vorversuche können das Systemverhalten, welches während der Kultivierung vorliegt, nicht abbilden. Diese Modelle sind ungeeignet für die Bestimmung der online Sauerstoffaufnahme  $OUR$ . Ein Rückschluss auf den Verlauf der metabolische Aktivität der Zellen über die  $qOUR$  lässt sich aus allen Modellen erkennen. Die wichtigsten Punkte sind trotz der Großen Abweichungen der Modelle auf Basis der Vorversuche sind gut zu erkennen.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur online Sauerstoffaufnahme  $OUR$  über einen Software-Sensor bei einer CHO-Zellkultivierung etabliert. Für die Bestimmung der  $OUR$  wurde zunächst eine Analyse des Systemverhaltens zur Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes gemacht. Für die Prozessparameter der Rührerdrehzahl  $N_{St}$ , Begasungsrate  $F_{nG}$ , Flüssigkeitsvolumen  $V_L$  und Antischaumkonzentration  $c_{AF}$  konnte ein Einfluss auf den  $k_L a$  nachgewiesen werden. Diese Prozessparameter werden für die Berechnung des  $k_L a$ -Wertes während der Kultivierung genutzt. Aus dem  $k_L a$ -Wert kann über das Signal des Sauerstoffpartialdrucks  $pO_2$ , des Drucks  $p$  und der Sauerstoffkonzentration im Ingas  $x_{O_{2in}}$  die  $OUR$  berechnet werden. Die zellspezifische Sauerstoffaufnahme  $qOUR$  kann anschließend über das Zellzahlsignal abgeleitet werden. Für die Berechnung des  $k_L a$ -Wertes wurden zwei Ansätze gewählt. Der Ansatz der Multilinearen Regression MLR und den nach Van't Riet. Über Vorversuche mit einem zellfreien Modellsystem PBS konnten über die Ausgasungsmethode zwei Gleichungen zur Berechnung des  $k_L a$ -Wertes ermittelt werden. Die Versuchsplangestaltung wurde im Rahmen einer teilfaktoriellen DoE Analyse durchgeführt. Die beiden daraus entwickelten Gleichungen bilden nicht die Größenordnung der Referenzmessung ab, die während der Kultivierung über die dynamische Methode gemacht wurden. Aus den Datenpunkten der Referenzmessungen wurden ebenfalls zwei Gleichungen nach dem Ansatz von Van't Riet zur Beschreibung des  $k_L a$ -Wertes entwickelt. Einer dieser beiden Gleichungen schafft es das System adäquat zu repräsentieren.

$$k_L a = k_{LaEP} \cdot \left( \frac{N_{St}(t)}{N_{StEP}} \right)^{3\alpha} \cdot \left( \frac{F_{nG}(t)}{F_{nGEP}} \right)^\beta \cdot \left( \frac{V_L}{V_{LEP}} \right)^{-\alpha} \quad (31)$$

Aus ihr lässt sich ein repräsentativer Wert der Sauerstoffaufnahme  $OUR$  und der zellspezifischen Sauerstoffaufnahme  $qOUR$  berechnen. Alle Gleichungen des Van't Riet Ansatzes beinhalten dabei nicht den Einfluss der Antischaumkonzentration  $c_{AF}$  auf das System. Gleichzeitig kann das System bei starker Schwankung der Prozessparameter nicht gut repräsentiert werden.

Aus den Ergebnissen der Leitfähigkeits- und Osmolaritätsmessung ist zu erkennen, dass die Eigenschaften von dem verwendeten Modellsystem PBS zur Bestimmung des  $k_L a$ -Wertes in einer Größenordnung mit der des Kultivierungsmedium liegen. Die Näherung für den Henry-Koeffizienten aus Reinstwasser verfälscht die Berechnungen der  $OUR$  aus dem  $k_L a$ -Wert. Eigenschaften von Reinstwasser in Bezug auf die Leitfähigkeit

und die Osmolarität sind nicht gleich denen des Kultivierungsmedium. Eine Berechnung des Henry-Koeffizienten auf der Grundlage von Reinwasser ist nicht repräsentativ für das System. Hier sollten weitere Nachforschungen angestellt werden, in dem andere Henry-Koeffizienten bestimmt werden oder weitere Versuche mit dem Kultivierungsmedium über die Ausgasungsmethode durchgeführt werden. Werden diese Versuche im Rahmen des bereits erstellen Versuchsplan durchgeführt, kann der Intervall der Einflussgröße des Flüssigkeitsvolumens  $V_L$  auf 6-8.5 L eingegrenzt werden. Gleichzeitig kann mit diesen Versuchen weiter analysiert werden ob die Gleichungen der Multilineare Regression oder die des Van't Riet-Ansatzes das Systemverhalten besser beschreiben. Eine Anpassung der Gleichung nach Van't Riet um die Antischaumkonzentration  $c_{AF}$  zu berücksichtigen müsste zusätzlich näher untersucht werden.

Viele der abgeleiteten Schlüsse aus den Vorversuchen der  $k_La$  - Bestimmung können nicht durch die durchgeführten Versuche belegt werden. Da ein teilfaktorieller Versuchsplan (Screening) genutzt wurde, wird nicht die Gesamtheit des Versuchsraums abgedeckt. Eine Erweiterung des Versuchsplan auf einen vollfaktorielles Design wäre daher sinnvoll um das Systemverhalten besser beschreiben zu können. Weitere Analysen zum Vergleich des zellfreien Modellsystems PBS mit dem Medium sollten dabei aus dem vollfaktoriellen Versuchsplan abgeleitet werden.

Die Annäherung des simulierten  $PT_3$ -Systemverhalten an die Systemantwort zur Bestimmung des  $k_La$  -Wertes wurde über den Algorithmus nach Nelder-Mead vorgenommen. Eine Analyse mit einem weiteren Optimierungsalgorithmus könnte die Modellbildung zusätzlich verbessern, da eventuell nur ein lokales und kein globales Minimum für die Parameteranpassung gefunden wurde.

In der aktuellen Version des Software Sensors wird die Antischaumkonzentration  $c_{AF}$  als konstanter Wert für die gesamte Kultivierung vorgegeben. Die Antischaumkonzentration  $c_{AF}$  kann sich bei Schaumbildung während der Kultivierung durch die Zugabe von Antischaummittel erhöhen. Eine Berechnung der dann vorliegenden Antischaumkonzentration  $c_{AF}$  kann über das Batch-Management System von MFCS-WiPro realisiert werden.

Um den Einfluss der Schwankung der Prozessgrößen auf die Berechnungen zu reduzieren, wäre zusätzlich die Etablierung eines Median-Filters oder die Berücksichtigung der Standardabweichungen möglich. Des Weiteren ist zu testen, ob sich die entwickelten Gleichungen auch für weitere Kultivierungen nutzen lassen und diese das Systemverhalten genauso gut wiedergeben können.



# Anhang

## Danksagung

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg und dem Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Herrn Thomas Scheper danke ich für das ermöglichen dieser Arbeit.

Frau Dr. Dörte Solle danke ich für vertiefende Diskussionen und einer allgemein vorbildlichen Betreuung.

Herrn Florian Aupert danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen, wertvollen Hinweisen und Ratschlägen und einer allgemein vorbildlichen Betreuung.

Der Firma Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin für das Bereitstellen ihrer Messsonde.

Zugleich danke ich Frau Chantal Brämer, Frau Lena Stuckenberg und Herrn Dirk Oehler für die Beratung und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

### 1. Material

#### 1.1. CHO Zell Kultivierung

#### 1.2. Material und Geräte

Tabelle 7 – Liste der in dieser Arbeit genutzten Materialien und Geräte

Bezeichnung	Produkt	Bezugsquelle
<b>pO<sub>2</sub>- Sonde</b>	Während der Kultivierung: Oxyferm FDA425 der	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst
	Während der Kultivierung und der Vorversuche: SE 706	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
<b>Reaktor</b>	BIOSTAT ®Cplus	Satorius Stedim Biotech, Göttingen
<b>Osmometer</b>	Osmoat 3000	Gonotec GmbH, Berlin
<b>Leitfähigkeits- sonde</b>	KLE 325	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim
<b>Zellzähler</b>	CEDEX	Roche Innovatis AG, Penzberg

Bezeichnung	Produkt	Bezugsquelle
	Futura	Aber Instruments Ltd, Aberystwyth UK
Abgasanalytik	BlueOne Cell	BlueSense gas sensor GmbH, Herten

### 1.3. Chemikalien und Kulturmedien

Tabella 8 – Lister der Chemikalien für den 1-fach PBS

Bezeichnung	Chemikalie	Konzentration	[g/L]	Hersteller
1 x PBS	Natriumchlorid (NaCl)	8,00		Fluka, Buchs, Schweiz
	Kaliumchlorid (KCl)	0,20		AppliChem, Darmstadt
	Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,42		Sigma-Aldrich, München
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,24		Sigma-Aldrich, München

Tabella 9- Liste der verwendeten Kultivierungskomponenten

Bezeichnung	Chemikalie	Hersteller
Antischaum	Pluronic F68	Thermo-Fisher
Kultivierungs-Medium	CHOMACS CD	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Feed-Medium	Basic Feed Medium	Xell AG, Bielefeld

Tabella 10 - Liste der sonstigen verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Natriumhydroxid, NaOH	Merck, Darmstadt
Glutamin	Biochrom, Berlin
Glucose	Sigma-Aldrich, München

## 1.4. Software

Tabelle 11 - Liste der in dieser Arbeit genutzten Software

Bezeichnung	Produkt	Bezugsquelle
Datenbank Software	Simatic Sipat	SIPAT, Siemens Inc, Brüssel Belgien
SCARDA Software	MFCS WiPro	Satorius Stedim System GmbH, Göttingen
Statistische Versuchsplanung	MODDE	Umetrics, Malmö, Schweden
pO <sub>2</sub> -Überwachung	Paraly SW 112	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin

## 2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 - Schematische Darstellung der Fütterungsstrategie des Benchmark Prozesses <sup>3</sup>	
Abb. 2 - Schematischer Verlauf der pO <sub>2</sub> - Regelung des Benchmark Prozesses.....	4
Abb. 3 - Veranschaulichung der Messcharakterisierung an einem beispielhaften Bioprozess [5], [8] .....	4
Abb. 4 - Aufbau einer Sauerstoffpartialdruck Sonde - nach dem Clark Messprinzip .	7
Abb. 5 - Gasblasen in Flüssigkeit mit Konzentrationsunterschied von Sauerstoff.....	9
Abb. 6 - Schematische Darstellung der Widerstände beim Durchlaufen des Sauerstoffs auf seinem Weg von der Gasblase zu den Zellen/Zellverbund [28].....	10
Abb. 7 Zweifilmtheorie - Schematische Darstellung der Sauerstoffkonzentration im Übergang von der Gas- in die Flüssigphase [4].....	11
Abb. 8 - Verlauf der Sauerstoffkonzentration von der Gasblase zu den Zellen über die Flüssigphase [4], [13] .....	16
Abb. 9 - schematischer Verlauf der Größen OUR, qOUR und c <sub>OL</sub> während einer batch-Kultivierung.....	16
Abb. 10 - Aufbau eines Reaktors zur Bestimmung der OUR über die Gasmassenbilanzierung [20].....	17
Abb. 11 - Darstellung der drei verschiedenen Versuchsplanmodelle teilfaktoriell, vollfaktoriell und zentral zusammensetzt für drei normierte physikalische Einflussfaktoren. Dabei stellen die Kreise die durchzuführenden Experimente da, das Kreuz in der Mitte steht für die Zentral Versuche (Center Points), in	

jedem Versuchsplan werden dafür drei oder mehr von den Center-Point- Versuchen durchgeführt.....	20
Abb. 12 - Grafische Darstellung zur Hilfe bei der Auswertung zur Normalverteilung. links nicht normalverteilt. rechts normalverteilt .....	20
Abb. 13 - Beispiel eines Koeffizienten Diagramms eines Interaktionsmodells zur Varianzanalyse vor der Eliminierung einzelner Regressionsfaktoren .....	22
Abb. 14 - Bestimmung des $k_{La}$ - Wertes im Zellfreien Modellsystem mit der Ausgasungsmethode [13].....	27
Abb. 15 - Analogie zwischen dem Sauerstoffübertragungsverhalten und dem Elektrotechnischen Ersatzschaltbild .....	28
Abb. 16 - Modellverlauf der dynamischen Methode zur Bestimmung der OUR und des $k_{La}$	
Abb. 17 - Darstellung der Softwarestruktur zur online Bestimmung der OUR während der Kultivierung .....	35
Abb. 18 - V12 - $N_{St}$ : 200 rpm $F_nG$ : 24 L/h.....	37
Abb. 19 - Histogramm vor und nach der Transformation zur Normalverteilung des $k_{La}$ - Wertes .....	39
Abb. 20 - Finale Koeffizienten der MLR Gleichung zu den über Matlab bestimmten $k_{La}$ Daten. ....	40
Abb. 21 - Effekte und deren Standardabweichungen im MLR Modell .....	40
Abb. 22 - Güteprüfungsgrößen der MLR-Gleichung zur $k_{La}$ -Wert Berechnung.....	41
Abb. 23 - Vergleich des Einflusses der Untersuchten Parameter im direkten Vergleich der $pO_2$ -Aufladepkurven einzelner Vorversuche.....	42
Abb. 24 - Gegenüberstellung der Analysierten $k_{La}$ Daten mit den Berechneten $k_{La}$ - Daten aus dem daraus gefolgerten MLR- Modell .....	43
Abb. 25 - Gegenüberstellung der Analysierten $k_{La}$ Daten mit den Berechneten $k_{La}$ - Daten aus dem daraus Van't Riet Modell entwickelt über die Center Points	44
Abb. 26 - Gegenüberstellung der Analysierten $k_{La}$ Daten mit den Berechneten $k_{La}$ - Daten aus dem daraus gefolgerten Van't Riet Modell entwickelt über die Maximalwerte der Vorversuche.....	45
Abb. 27 - Verlauf der einzelnen Parameter über den gesamten Verlauf der Kultivierung, gemittelt über 10 Wertepaare bzw. 30min.....	46
Abb. 28 - Einflussnehmende Prozessparameter auf den $k_{La}$ -Wert zusammen mit dem Verlauf des $k_{La}$ -Wertes aus der Kultivierung bestimmt über die dynamische Methode .....	48

Abb. 29 - Gegenüberstellung der Datenpunkte der $k_{La}$ -Wert Bestimmung aus der dynamischen während der Kultivierung mit den Berechneten $k_{La}$ -Daten aus dem daraus gefolgerten Van't Riet Modell entwickelt über diese Datenpunkte mit dem Ausreißer .....	50
Abb. 30 - Gegenüberstellung der Datenpunkte der $k_{La}$ -Wert Bestimmung aus der dynamischen während der Kultivierung mit den Berechneten $k_{La}$ -Daten aus dem daraus gefolgerten Van't Riet Modell entwickelt über diese Datenpunkte ohne den Ausreißer.....	51
Abb. 31- Gegenüberstellung der Berechnungsmodelle auf der Basis der Vorversuche mit den Datenpunkten aus der Bestimmung des $k_{La}$ -Wertes über die dynamische Methode über den Verlauf der Kultivierung.....	52
Abb. 32 - Gegenüberstellung der Berechnungsmodelle auf der Basis der Vorversuche mit den Datenpunkten aus der Bestimmung des $k_{La}$ -Wertes über die dynamische Methode über den Verlauf der Kultivierung.....	53
Abb. 33 - Verlauf des $k_{La}$ 's bestimmt aus den Modell Gleichungen Van't Riet I und II im Vergleich zu den Datenpunkt aus der dynamischen Methode und den Prozessgrößen $N_{St}$ , $FnG$ und $V_L$ .....	54
Abb. 34 - Aufladekurven aus dem DoE Versuchsplan von PBS und dem Kultivierungsmedium bzw. Medium im Vergleich.....	56
Abb. 35 - Vergleich der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden der Größen $k_{La}$ , OUR und $qOUR$ im Vergleich zusammen mit den Prozessgrößen der Kultivierung.....	58
Abb. 36 - Verlauf zu den Messungen der dynamischen Methode zur Bestimmung der OUR.....	59
Abb. 37 - Vergleich der Modelle zur Berechnung der OUR mit den Ergebnissen der Referenzmethode .....	60
Abb. 38 - Vergleich der Modelle zur Berechnung der $qOUR$ mit den Ergebnissen der Referenzmethode .....	61
Abb. 39 - Elektronisches Ersatzschaltbild zur Sauerstoffübertragung von der Gas- in die Flüssigphase [29] .....	11
Abb. 40 - Elektrotechnisches Ersatzschaltbild zur Sauerstoffübertragung von der Gas- in die Flüssigphase[29] .....	14
Abb. 41 - PT3- Übertragungsverhalten der gesamten Messstrecke von Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigkeitsphase in das Messsystem der $pO_2$ - Sonde.....	15

Abb. 42 - Beispiel für die Ergebnisse des $k_{La}$ -fits über die Solverfunktion von Excel 365, in blau mit durchgezogener Linie $pO_2$ - Messdaten, Ergebnis-Kurve 1 und 2 des Solvers für das Kurvenmodell mit zu großer Fehlerquadrat-Summe, Kurve 3 ist die Lösung mit der kleinsten Fehlerquadrat-Summe .....	20
Abb. 43- gemessenen gegen berechnete $k_{La}$ -Werte der $k_{La}$ -fit Methode mit dem MLR Modell .....	22
Abb. 44 - Verlauf Änderung der Gelöstsauerstoffkonzentration über die Zeit zur Bestimmung des $k_{La}$ .....	23
Abb. 45- gemessenen gegen berechnete $k_{La}$ -Werte der $k_{La}$ -Ln Methode mit dem MLR Modell .....	25

### 3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Charakterisierung der Einflussgrößen des Sauerstoffübertragungskoeffizienten .....	14
Tabelle 2 - Grenzpunkte des Design Raums zum DoE zu Bestimmung des $k_{La}$ 's .....	26
Tabelle 3- Versuchsergebnisse der $k_{La}$ -Wert-Bestimmung aus den Vorversuchen über das Modellsystem PBS.....	37
Tabelle 4- Parameter zu den maximalen und minimalen $k_{La}$ -Wert des zellfreien Modellsystems PBS .....	38
Tabelle 5 - Vergleich der Parameter der Van't Rietgleichung auf Basis der Vorversuche und der Referenzdaten der dynamischen Methode.....	49
Tabelle 6 - Messungen der Leitfähigkeit und Osmolarität der Modellsysteme im Vergleich.....	55
Tabelle 7 - Liste der in dieser Arbeit genutzten Materialien und Geräte .....	1
Tabelle 8 - Lister der Chemikalien für den 1-fach PBS.....	2
Tabelle 9- Liste der verwendeten Kultivierungskomponenten .....	2
Tabelle 10 - Liste der sonstigen verwendeten Chemikalien.....	2
Tabelle 11 - Liste der in dieser Arbeit genutzten Software.....	3
Tabelle 12 - Versuchsplan, Reihen und Einstellungen für die Einflussfaktoren des DoE zur Ermittlung des $k_{La}$ 's.....	9
Tabelle 13 - Ergebnisse der Auswertungsmethode $k_{La}$ fit .....	20
Tabelle 14 - Coeffizienten der MLR Gleichung über die Daten von $k_{La}$ fit .....	21
Tabelle 15 - Ergebnisse der Auswertungsmethode $k_{La}$ Ln.....	23
Tabelle 16 Coeffizienten der MLR Gleichung über die Daten von $k_{La}$ Ln.....	24

#### 4. Literaturverzeichnis

- [1] G. J. Metcalf, "Heinz Küpper, Wörterbuch der deutschen Umgangssprache: Hamburg: Claassen Verlag, 1955. Pp. 421." Taylor & Francis, 1957.
- [2] F. M. Wurm, "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells," *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 11, p. 1393, 2004.
- [3] W. Storhas, *Bioverfahrensentwicklung*. John Wiley & Sons, 2013.
- [4] H. Chmiel, *Bioprozesstechnik*. Springer-Verlag, 2006.
- [5] R. W. Kessler, *Prozessanalytik: Strategien und Fallbeispiele aus der industriellen Praxis*. John Wiley & Sons, 2012.
- [6] P. Biechele, C. Busse, D. Solle, T. Scheper, and K. Reardon, "Sensor systems for bioprocess monitoring," *Eng. Life Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 469–488, 2015.
- [7] J. Claßen, F. Aupert, K. F. Reardon, D. Solle, and T. Scheper, "Spectroscopic sensors for in-line bioprocess monitoring in research and pharmaceutical industrial application," *Anal. Bioanal. Chem.*, pp. 1–16, 2017.
- [8] G. Cornelissen, "Integration of analytical measurement methods," 2016.
- [9] W. Beyeler *et al.*, *History of Modern Biotechnology II*, vol. 70. Springer, 2003.
- [10] E. K. Springer, "Dissolved Oxygen Measurement Theory Practice," Höchst.
- [11] J. Kemper, "Kinetik und Stoffübertragung bei der reaktiven  $CO_2$ -Absorption/Desorption in speziellen Amin-Blends," Ruh-Universität Bochum, 2012.
- [12] F. Garcia-Ochoa and E. Gomez, "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 2, pp. 153–176, 2009.
- [13] V. C. Hass and R. Pörtner, *Praxis der Bioprozesstechnik: mit virtuellem Praktikum*. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag, 2011.
- [14] R. Sander, "Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent," *Atmos. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 8, 2015.

- [15] A. Moser, *Bioprozesstechnik: Berechnungsgrundlagen d. Reaktionstechnik biokatalyt. Prozesse*. Springer, 1981.
- [16] Y.-S. Kyung, M. V Peshwa, D. M. Gryte, and W.-S. Hu, "High density culture of mammalian cells with dynamic perfusion based on on-line oxygen uptake rate measurements," *Cytotechnology*, vol. 14, no. 3, pp. 183–190, 1994.
- [17] R. R. Deshpande and E. Heinzle, "On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors," *Biotechnol. Lett.*, vol. 26, no. 9, pp. 763–767, 2004.
- [18] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, V. E. Santos, and J. C. Merchuk, "Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview," *Biochem. Eng. J.*, vol. 49, no. 3, pp. 289–307, 2010.
- [19] L. A. Palomares and O. T. Ramirez, "The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture," *Cytotechnology*, vol. 22, no. 1–3, pp. 225–237, 1996.
- [20] S. Yoon and K. B. Konstantinov, "Continuous, real-time monitoring of the oxygen uptake rate (OUR) in animal cell bioreactors," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 44, no. 8, pp. 983–990, 1994.
- [21] A. A. Kamen, C. Bédard, R. Tom, S. Perret, and B. Jardin, "On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 50, no. 1, pp. 36–48, 1996.
- [22] E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikstrom, S. Wold, and L. Ericksson, "Design of Experiments, Principles and Applications," *Umetrics Acad. Umeå*, 2000.
- [23] K. A. Bakeev, *Process analytical technology: spectroscopic tools and implementation strategies for the chemical and pharmaceutical industries*. John Wiley & Sons, 2010.
- [24] G. Cornelissen, "Pharmaceutical Biochemical Engineering - Process Sheet Off-gas balance 1," Hamburg, 2016.
- [25] P. M. Doran, *Bioprocess engineering principles*. Academic press, 1995.
- [26] R. Luttmann, "Vorlesung Bioprozess Automatisierung," Hamburg, 2016.
- [27] P.-A. Ruffieux, U. von Stockar, and I. W. Marison, "Measurement of volumetric (OUR) and determination of specific (qO<sub>2</sub>) oxygen uptake rates in animal cell

cultures," *J. Biotechnol.*, vol. 63, no. 2, pp. 85–95, 1998.

[28] J. E. Bailey and D. F. Ollis, "Biochemical engineering fundamentals.," *Chem. Eng. Educ.*, 1976.

[29] R. Luttmann, "Experimental and theoretical determination of the  $k_{La}$  value," Hamburg, 2013.

## 5. Versuchsplan für die $k_{La}$ -Wert Bestimmung

Tabelle 12 – Versuchsplan, Reihen und Einstellungen für die Einflussfaktoren des DoE zur Ermittlung des  $k_{La}$ 's

Versuchsnr.	Reihenfolge	$N_{St}$ [rpm]	$F_{nG}$ [L/min]	$r$ [-]	$V_L$ [L]	$c_{AF}$ [%]
18	1	100	0.40	1.00	10	0.00
33 - CP	2	150	0.70	0.50	8	0.20
20	3	100	0.40	1.00	10	0.40
23	4	100	1.00	1.00	6	0.40
27	5	200	0.40	1.00	6	0.40
5	6	100	1.00	0.00	6	0.00
34 - CP	7	150	0.70	0.50	8	0.20
8	8	100	1.00	0.00	10	0.40
29	9	200	1.00	1.00	6	0.00
17	10	100	0.40	1.00	6	0.00
32	11	200	1.00	1.00	10	0.40
2	12	100	0.40	0.00	10	0.00
12	13	200	0.40	0.00	10	0.40
14	14	200	1.00	0.00	10	0.00
35 - CP	15	150	0.70	0.50	8	0.20
9	16	200	0.40	0.00	6	0.00
3	17	100	0.40	0.00	6	0.40
15	18	200	1.00	0.00	6	0.40
26	19	200	0.40	1.00	10	0.00

## 6. Berechnung des Henry-Koeffizienten über die Formel der Temperaturabhängigkeit

$$H(T) = H^\theta \cdot e^{\left(\frac{-\Delta_{sol}H}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^\theta}\right)\right)} \quad (44)$$

$H^\theta$	-	Henry-Koeffizient basierend auf Standard Bedingungen bei der Temperatur $T^\theta$	$\left[\frac{\text{mol}}{\text{L atm}}\right]$
$T^\theta$	-	Referenztemperatur $T^\theta = 298,15 \text{ K} \cong 25^\circ\text{C}$	[K]
$-\Delta_{sol}H$	-	Enthalpie während des Verlaufs einer Liquidation	$\left[\frac{\text{J}}{\text{mol}}\right]$
$R$	-	Allgemeine Gaskonstante	$\left[\frac{\text{J}}{\text{mol K}}\right]$

Mit den folgenden Tabellendaten bzw. den Prozessbedingungen ergibt sich daraus der folgende Henry-Koeffizient:

$$H(T) = H^\theta \cdot e^{\left(\frac{-\Delta_{sol}H}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^\theta}\right)\right)}$$

$$= 1.3 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \text{ Pa}} \cdot e^{\left(1500 \text{ K} \cdot \left(\frac{1}{310.15 \text{ K}} - \frac{1}{298.15 \text{ K}}\right)\right)} = 1.0763 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \text{ Pa}}$$

$H^\theta$	-	Tabellenwert für den Henry-Koeffizient basierend auf Standard Bedingungen bei der Temperatur $T^\theta$ für Sauerstoff in Wasser.	$1.3 \times 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \text{ Pa}}$
$T^\theta$	-	Referenztemperatur $T^\theta = 298.15 \text{ K} \cong 25^\circ\text{C}$	[K]
$T$	-	Kultivierungstemperatur $T = 310.15 \text{ K} \cong 37^\circ\text{C}$	[K]
$\frac{-\Delta_{sol}H}{R}$	-	Tabellenwert für Sauerstoff in Wasser	1500 K

[14]

Nach dem Umformen dieses Henry-Koeffizienten in die Einheit Nm/kg folgt daraus der folgende Henry-Koeffizient:

$$H(37^\circ\text{C}) = 2.9034 \times 10^6 \frac{\text{Nm}}{\text{kg}} = 29.034 \frac{\text{L bar}}{\text{g}}$$

## 7. Herleitung der Analogie des Sauerstoffübertragungsverhalten über ein Elektrotechnisches Ersatzschaltbild

Zur Betrachtung des Sauerstoffübergangs von der Gas- in die Flüssigphase kann ein Elektrotechnisches Ersatzschaltbild genutzt werden, siehe Abb. 39. Mit diesem Ersatzschaltbild lassen sich die komplexen Zusammenhänge besser sinnbildlich betrachten

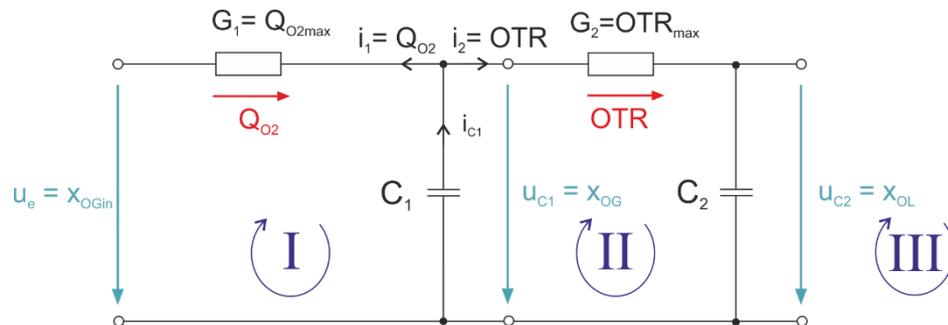


Abb. 39 - Elektronisches Ersatzschaltbild zur Sauerstoffübertragung von der Gas- in die Flüssigphase [29]

und analysieren.

Für das in Abb. 39 gezeigt Ersatzschaltbild gelten folgende Analogien:

$$\begin{array}{lll}
 u_E = x_{OG\ in}(t) & u_{C1} = x_{OG}(t) & u_{C2} = x_{OL}(t) \\
 G_1 = Q_{O2\ max}(t) & G_2 = OTR_{max}(t) & i_1 = Q_{O2}(t) \\
 C_1 = c_{OL}^*_{max}(t) & C_2 = c_{OL\ max}(t) & i_2 = OTR(t) \\
 i_1 = Q_{O2} & i_2 = OTR & 
 \end{array}$$

Daraus folgt:

$$u_{R1}(t) = R_1 \cdot i_1 = \frac{1}{G_1} \cdot i_1 = \frac{Q_{O2}(t)}{Q_{O2\ max}(t)} \quad (45)$$

$$u_{C1}(t) = \frac{1}{C_1} \cdot i = \frac{1}{C_1} \cdot (i_1 + i_2) = \frac{Q_{O2}(t) + OTR(t)}{c_{OL}^*_{max}(t)} \quad (46)$$

$$u_{R2}(t) = R_2 \cdot i_2 = \frac{1}{G_2} \cdot i_2 = \frac{OTR(t)}{OTR_{max}(t)} \quad (47)$$

$$u_{C2}(t) = \frac{1}{C_2} \cdot i_2 = \frac{OTR(t)}{c_{OL\ max}(t)} \quad (48)$$

Für die Maschen I-III lassen sich folgende Maschengleichungen aufstellen:

$$I: \quad u_e(t) = u_{R1}(t) + u_{C1}(t) \quad (49)$$

$$II: \quad u_{C1}(t) = u_{R2}(t) + u_{C2}(t) \quad (50)$$

$$III: \quad u_a(t) = u_{C2}(t) \quad (51)$$

Für die Knotengleichung gilt:

$$i_1(t) = i_{C1}(t) + i_2(t) \quad (52)$$

Daraus folgt:

$$\begin{aligned} u_e(t) &= u_{R1}(t) + u_{C1}(t) \\ &= R_1 \cdot i_1 + u_{R2}(t) + u_{C2}(t) \\ &= R_1 \cdot i_1 + R_2 \cdot i_2 + u_a(t) \end{aligned}$$

Für die Ströme ergibt sich:

$$\begin{aligned} i_2 &= C_2 \cdot \dot{u}_{C2}(t) \\ i_{C1} &= C_1 \cdot \dot{u}_{C1}(t) \\ i_1 &= i_{C1} + i_2 \end{aligned}$$

Daraus folgt für die Eingangsspannung:

$$\begin{aligned} u_e(t) &= R_1 \cdot i_1 + R_2 \cdot i_2 + u_a(t) \\ &= R_1 \cdot (i_{C1} + i_2) + R_2 \cdot i_2 + u_a(t) \\ &= R_1 \cdot (C_1 \cdot \dot{u}_{C1}(t) + C_2 \cdot \dot{u}_{C2}(t)) + R_2 \cdot i_2 + u_a(t) \\ &= R_1 C_1 \cdot \dot{u}_{C1}(t) + R_1 C_2 \cdot \dot{u}_{C2}(t) + R_2 C_2 \cdot \dot{u}_{C2}(t) + u_a(t) \\ &= R_1 C_1 \cdot \dot{u}_{C1}(t) + (R_1 C_2 + R_2 C_2) \cdot \dot{u}_{C2}(t) + u_a(t) \end{aligned}$$

Mit  $u_{C1} = u_{R2} + u_{C2}$  und  $u_{C2} = u_a$  folgt:

$$u_e(t) = R_1 C_1 \cdot \frac{d}{dt} (u_{R2}(t) + u_a(t)) + (R_1 C_2 + R_2 C_2) \cdot \frac{du_a(t)}{dt} + u_a(t)$$

Mit  $u_{R2}(t) = R_2 \cdot i_2 = R_2 \cdot C_2 \cdot \dot{u}_{C2}(t) = R_2 \cdot C_2 \cdot \dot{u}_a(t)$  folgt:

$$\begin{aligned} u_e(t) &= R_1 C_1 \cdot \frac{d}{dt} (R_2 \cdot C_2 \cdot \dot{u}_a(t) + u_a(t)) + (R_1 C_2 + R_2 C_2) \cdot \frac{du_a(t)}{dt} + u_a(t) \\ &= R_1 R_2 C_1 C_2 \cdot \frac{d^2 u_a(t)}{dt^2} + R_1 C_1 \cdot \frac{du_a(t)}{dt} + (R_1 C_2 + R_2 C_2) \cdot \frac{du_a(t)}{dt} + u_a(t) \end{aligned}$$

$$= R_1 R_2 C_1 C_2 \cdot \frac{d^2 u_a(t)}{dt} + (R_1 C_1 + R_1 C_2 + R_2 C_2) \cdot \frac{du_a(t)}{dt} + u_a(t)$$

mit  $R_1 = G_1$  und  $R_2 = G_2$  folgt daraus:

$$u_e(t) = \frac{C_1 C_2}{G_1 G_2} \cdot \frac{d^2 u_a(t)}{dt} + \left( \frac{C_1}{G_1} + \frac{C_2}{G_1} + \frac{C_2}{G_2} \right) \cdot \frac{du_a(t)}{dt} + u_a(t)$$

Unter den oben festgelegten Bezügen kann daraus folgender Zusammenhang hergeleitet werden:

$$x_{OG\ in}(t) = \frac{c_{OL\ max}^* \cdot c_{OL\ max}}{Q_{O2\ max} \cdot OTR_{max}} \cdot \ddot{x}_{OL} + \left( \frac{c_{OL\ max}^*}{Q_{O2\ max}} + \frac{c_{OL\ max}}{Q_{O2\ max}} + \frac{c_{OL\ max}}{OTR_{max}} \right) \cdot \dot{x}_{OL} + x_{OL}$$

Aus diesem Zusammenhang lassen sich folgende Zeitkonstanten des Systems herleiten:

$$T_{11} = \frac{C_1}{G_1} = \frac{c_{OL\ max}^*}{Q_{O2\ max}} = \frac{p_{nG} \cdot V_{nM} \cdot V_G}{R \cdot T_G \cdot F_{nG}} = \frac{V_G}{F_{nG}} \quad \begin{array}{l} \text{Gasphasenkonstante, be-} \\ \text{schreibt die Verweilzeit des} \\ \text{Sauerstoffs in der Flüssig-} \\ \text{phase} \end{array} \quad (53)$$

$$T_{22} = \frac{C_2}{G_2} = \frac{c_{OL\ max}}{OTR_{max}} = \frac{1}{k_L a} \quad \text{Grenzflächentransferzeit} \quad (54)$$

$$T_{12} = \frac{C_2}{G_1} = \frac{c_{OL\ max}}{Q_{O2\ max}} \quad \begin{array}{l} \text{Rückwirkung aus der Gas-} \\ \text{und Flüssigphase} \rightarrow \text{parasi-} \\ \text{täre Zeitkonstante} \end{array} \quad (55)$$

Das Übertragungsverhalten lässt über ein nicht-rückwirkungsfreies PT<sub>2</sub>- System beschreiben. Das bedeutet, dass das System in seinem Verhalten einen proportional Faktor (P) hat und zwei Energiespeichersysteme beinhaltet, die in der Form von zwei zeitlichen Ableitungen (T<sub>2</sub>) mathematisch beschrieben werden können.

Für den Bildbereich ergibt sich daraus:

$$G_L(s) = \frac{x_{OL}(s)}{x_{OGin}(s)} = \frac{1}{T_{11} \cdot T_{22} \cdot s^2 + (T_{11} + T_{12} + T_{22}) \cdot s + 1} \quad (56)$$

Daraus sollen sich zwei entkoppelte Gleichungssysteme ableiten:

$$G_L(s) = \frac{1}{(1 + T_1 \cdot s) \cdot (1 + T_2 \cdot s)} \quad (57)$$

Das Lösen von Gleichung (57) führt zu folgender Lösung:

$$T_{1,2} = \frac{T_{11} + T_{12} + T_{22}}{2} \cdot \left( 1 \pm \sqrt{1 - \frac{4 \cdot T_{11} \cdot T_{22}}{[T_{12} + T_{11} + T_{22}]}} \right) \quad (58)$$

Diese Gleichung beschreibt das Systemverhalten vom Übergang des Sauerstoffs aus der Gas- in Flüssigkeitsphase.

Im Reaktorsystem kommt ein zusätzliches System hinzu: das Messsystem der  $pO_2$ -Sonde. Das elektrotechnische Ersatzschaltbild zum Gesamten Systemaufbau ist in Abb. 40 gezeigt. Das Ersatzschaltbild ist das gleiche wie in Abb. 39 gezeigt, nur an den Ausgangsklemmen wurde das Messsystem der  $pO_2$ -Sonde angehängt.

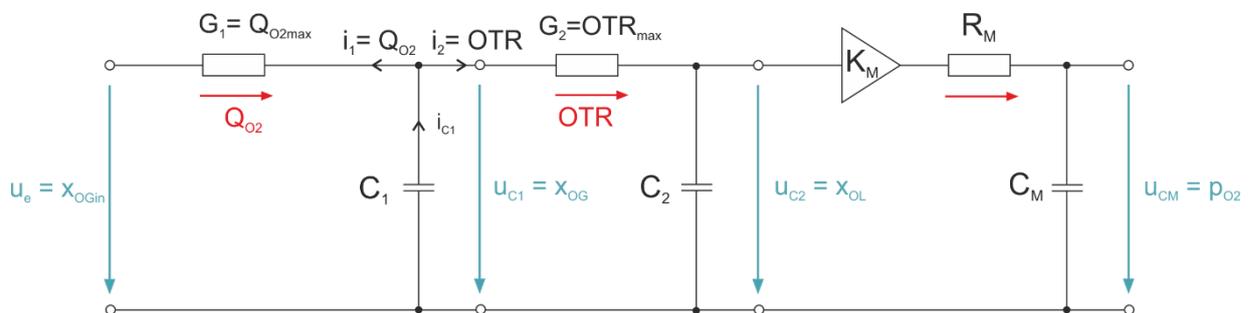


Abb. 40 - Elektrotechnisches Ersatzschaltbild zur Sauerstoffübertragung von der Gas- in die Flüssigphase[29]

Das Übertragungsverhalten der  $pO_2$ -Sonde lässt sich mit folgender Formel beschreiben:

$$pO_2(t) = \frac{c_{OL}(t)}{c_{OL\ 100}(t)} = \frac{c_{OL\ max}(t)}{c_{OL\ 100}(t)} \cdot x_{OL}(t) \quad (59)$$

Der Term  $\frac{c_{OL\ max}(t)}{c_{OL\ 100}(t)}$  lässt sich zu dem einem Proportionalitätsfaktor  $K_M$  zusammenfassen, für den gilt:

$$K_M = \frac{c_{OL\ max}(t)}{c_{OL\ 100}(t)} = \frac{p_G(t)}{p_{G\ cal} \cdot x_{OG\ cal}} \quad (60)$$

Der Druck im System beeinflusst den Verstärkungsfaktor im Messsystem. Ist dieser konstant, lässt sich daraus folgende Messcharakteristik für die  $pO_2$  Sonde herleiten:

$$T_M \cdot p\dot{O}_2(t) + pO_2(t) = K_M \cdot x_{OL}(t) \quad (61)$$

Die komplexe Übertragungsfunktion dazu lautet:

$$G(s) = \frac{pO_2(s)}{x_{OL}(s)} = \frac{K_M}{(1 + T_M \cdot s)} \quad (62)$$

Das Messverhalten der pO<sub>2</sub> Sonde stellt ein PT<sub>1</sub> System dar mit dem Proportionalitäts-

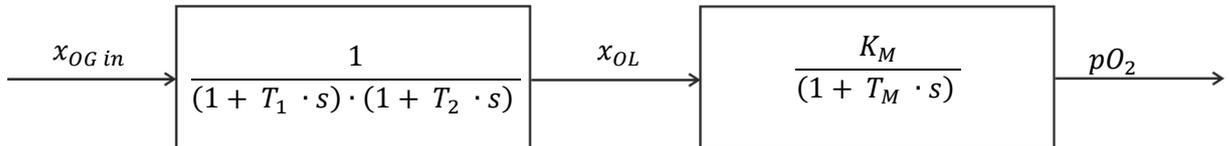


Abb. 41 - PT<sub>3</sub>- Übertragungsverhalten der gesamten Messstrecke von Sauerstoff aus der Gas- in die Flüssigkeitsphase in das Messsystem der pO<sub>2</sub>- Sonde

faktor  $K_M$ . Kombiniert man das PT<sub>2</sub>- System vom Sauerstoffübergang der Gas- in die Flüssigkeitsphase mit dem PT<sub>1</sub>- System des pO<sub>2</sub>- Messsystems ergibt sich daraus ein PT<sub>3</sub>- System. Beschrieben werden, kann dieses System mit der folgenden komplexen Übertragungsfunktion:

$$G(s) = \frac{pO_2(s)}{x_{OG in}(s)} = \frac{K_M}{(1 + T_1 \cdot s) \cdot (1 + T_2 \cdot s) \cdot (1 + T_M \cdot s)} \quad (63)$$

Zur Berechnung des Systemverhaltens auf eine Sprungfunktion wird ein energiefreies System mit  $pO_2(0) = x_{OL}(0) = x_{OG}(0) = 0$  vorausgesetzt. Dafür wird in der Versuchsdurchführung der Reaktor mit Stickstoff begast, bis der pO<sub>2</sub>-Wert auf 0 % gesunken ist und der Abgassensor einen Sauerstoffanteil von 0 anzeigt.

Die Sprungantwort wird mit der Laplace-Transformation beschrieben:

$$pO_2(t) = \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{G(s) \cdot x_{OG in}}{s} \right\} \quad (64)$$

Für die Eingangsgröße gilt:

$$x_{OG in}(t) = x_{OG in} \cdot \varphi(t) \quad (65)$$

$$x_{OG in}(t) = x_{OG in} \cdot \frac{1}{s}$$

Daraus folgt:

$$pO_2(s) = G(s) \cdot x_{OG in}(s) = \frac{G(s) \cdot x_{OG in}}{s}$$

$$\begin{aligned}
pO_2(s) &= \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{G(s) \cdot x_{OG \text{ in}}}{s} \right\} = x_{OG \text{ in}} \cdot \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{G(s)}{s} \right\} \\
&= x_{OG \text{ in}} \cdot \mathcal{L}^{-1} \left\{ \frac{K_M}{(1 + T_1 \cdot s) \cdot (1 + T_2 \cdot s) \cdot (1 + T_M \cdot s) \cdot s} \right\} \\
pO_2(t) &= K_M \cdot x_{OG \text{ in}} \cdot \left[ 1 - \frac{T_1^2 \cdot e^{-\frac{1}{T_1}}}{(T_1 - T_2) \cdot (T_1 - T_M)} + \frac{T_2^2 \cdot e^{-\frac{1}{T_2}}}{(T_2 - T_1) \cdot (T_2 - T_M)} + \frac{T_M^2 \cdot e^{-\frac{1}{T_M}}}{(T_M - T_1) \cdot (T_M - T_2)} \right] \quad (66)
\end{aligned}$$

Das Sauerstoffübertragungsverhalten wird mit einem nicht-rückwirkungsfreien PT<sub>3</sub>-System beschrieben.

Die Versuchsdaten, die über den DoE Versuchsplan aufgenommen wurden, werden über die Solver-Funktion auf der von Gleichung Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden gefittet. Änderbare Parameter sind dabei  $K_M$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  und  $T_M$ . Die Zeitkonstanten  $T_M$  werden anschließend mit dem pO<sub>2</sub>-Verlauf der Versuchs in ein MatLab file importiert. Hier werden die Daten auf Grundlage eines energiefreien Anfangszustandes mit einer minimalen Fehlerquadratsumme einer von MatLab generierten Funktion angenähert

## 8. Matlab Skripte

### 8.1. $k_{La}$ über PT<sub>3</sub> System

Verwendete Gleichungen und Erläuterung der Variablen:

$$Q_{O_2max}(t) = \frac{F_{nG}(t) \cdot M_{O_2}}{V_{nM} \cdot V_L(t)} \stackrel{!}{=} Q_{O_2max} \quad (67)$$

$F_{nG}$	- Begasungsrate bezogen auf Normalbedingungen ( $T = 273.15 \text{ K}$ , $p = 101325 \frac{\text{N}}{\text{m}^2}$ )	$\left[ \frac{\text{L}}{\text{h}} \right]$
$M_{O_2}$	- Molare Masse von Sauerstoff	$\left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$
$V_{nM}$	- Molares Volumen bezogen auf Normalbedingungen	$\left[ \frac{\text{L}}{\text{mol}} \right]$
$Q_{O_2max}$	-	

$$c_{OLmax}(t) = \frac{p_G(t)}{H_{O_2}(t)} \stackrel{!}{=} c_{OLmax} \quad (68)$$

$c_{OLmax}$  - Maximale gelöste Sauerstoffkonzentration im Sättigungs/Gleichgewichtszustand  $\left[\frac{g}{L}\right]$

$$OTR_{max}(t) = k_L a(t) \cdot c_{OLmax} \stackrel{!}{=} OTR_{max} \quad (69)$$

$OTR_{max}$  - Maximaler Sauerstofftransport  $\left[\frac{gL}{h}\right]$

$$K_M(t) = \frac{p_G(t) \cdot 100\%}{p_{Gcal} \cdot x_{OGcal}} \stackrel{!}{=} K_M \quad | p_{Gcal} = p_G ; x_{OGcal} = x_{OAIR} \quad (70)$$

mit  $K_M = \frac{100\%}{x_{OAIR}} \quad (71)$

$K_M$  - Verstärkungsfaktor der Messsonde  $[-]$

$p_{Gcal}$  - Druck zum Zeitpunkt der Kalibrierung  $\left[\frac{N}{m^2}\right]$

$x_{OGcal}$  - Sauerstoffanteil in der Zuluft zum Zeitpunkt der Kalibrierung  $[-]$

$x_{OAIR}$  - Sauerstoffanteil in der Luft: 0.20946  $[-]$

### 1. Differentialgleichung

Diese Differentialgleichung beschreibt das P-T<sub>1</sub>-System für den Übergang der Sauerstoffmoleküle aus der Gasphase:

$$\dot{x}_{OG}(t) = \frac{1}{T_{11}} \cdot \left[ (x_{OGin}(t) - x_{OG}(t)) - \frac{T_{12}}{T_{22}} \cdot (x_{OG}(t) - x_{OL}(t)) \right] \quad (72)$$

$\dot{x}_{OG}$  - Änderung des Sauerstoffanteils in der Gasphase  $[-]$

$T_{12}$  - Zeitkonstante über  $[ ]$

$T_{22}$  - Zeitkonstante über  $[ ]$

### 2. Differentialgleichung

Diese Differentialgleichung beschreibt das P-T<sub>1</sub>-System für das Eintreten der Sauerstoffmoleküle in die Flüssigphase:

$$\dot{x}_{OL}(t) = \frac{1}{T_{22}} \cdot [x_{OG}(t) - x_{OL}(t)] \quad (73)$$

$x_{OG}$  - Verlauf des Sauerstoffanteils in der Gasphase  $[-]$

$x_{OL}$  - Verlauf des Sauerstoffanteils in der Flüssigphase [-]

### 3. Differentialgleichung

Diese Differentialgleichung beschreibt die Änderung des  $pO_2$ -Signals

$$\dot{pO}_2(t) = \frac{1}{T_M} \cdot [K_M \cdot x_{OG}(t) - pO_2(t)] \quad (74)$$

$T_M$  - Zeitkonstante der  $pO_2$ -Sonde [h]

$K_M$  - Proportionalitätsfaktor der  $pO_2$ -Sonde [-]

$pO_2(t)$  - Messdaten aus der Versuchen [%]

Die Zeitkonstanten haben folgende Zusammenhänge:

$$T_{11} = \frac{V_G}{F_G} = \tau_G \quad (75)$$

$\tau_G$  - Verweilzeit des Gases in der Flüssigphase [h]

$V_G$  - Volumen der Gasphase [L]

$F_G$  - Begasungsrate  $\left[\frac{L}{h}\right]$

$$T_{22} = \frac{c_{OLmax}}{OTR_{max}} = \frac{1}{k_L a} \quad (76)$$

$c_{OLmax}$  - Maximal mögliche Konzentration von Sauerstoffs in der Flüssigphase  $\left[\frac{g}{L}\right]$

$OTR_{max}$  - Maximale Sauerstofftransferrate  $\left[\frac{g}{L h}\right]$

$$T_{12} = \frac{c_{OLmax}}{Q_{O2max}} \quad (77)$$

$Q_{O2max}$  - Maximale Sauerstoffeintragsrate  $\left[\frac{g}{L h}\right]$

#### 8.1.1. Code

##### 8.1.1.1. sim-file

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

##### 8.1.1.2. est-file

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

### 8.1.1.3. mod-file

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

## 8.2. Ermittlung der empirischen Parameter für Van't Riet-Gleichung

### 8.2.1. Code

#### 8.2.1.1. sim-file

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

#### 8.2.1.2. est-file

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

## 8.3. online OUR

### 8.3.1. DataPrep

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

### 8.3.2. kLaPrep

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

### 8.3.3. OUR\_final

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

### 8.3.4. OUR\_final\_VD

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

### 8.3.5. TextdateiIni

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

### 8.3.6. FunctionCall\_kLaPrep

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

## 9. Weitere Auswertungsmethoden zur $k_{La}$ -Wert Bestimmung

### 9.2. $k_{La}$ fit

#### 9.2.1. Methode

Der sigmoide Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration kann durch folgende Formel beschrieben werden:

$$pO_2\%(t) = pO_{2,max}\% - pO_{2,max}\% \cdot e^{-k_{La} \cdot t} \quad (78)$$

$pO_{2,max}\%$  - Maximaler Sättigungsanteil für Sauerstoff über den gesamten Messverlauf [%]

$pO_2\%$  - Sättigungsanteil des Sauerstoffpartialdrucks [%]

Über den Solver von Excel 365 wurde über ein „was-wäre-wenn“ Szenario der  $k_La$ -Wert gesucht, welcher die kleinste Summen-Fehlerquadrat(  $Summe_{FQS}$  vgl. Gleichung( 80 )) als Abweichung zur aufgenommenen Kurve ( $pO_{2,Messdaten}\%(t)$ ) darstellt.

$$FQS = \sqrt{(pO_{2,Messdaten}\%(t) - pO_{2,fitting\ Funktion}\%(t))^2} \quad (79)$$

$$Summe_{FQS} = \sum_{i=1}^n FQS_i \quad (80)$$

$pO_{2,Messdaten}\%$  - Messpunkte zum Zeitpunkt t [%]

$pO_{2,fitting\ Funktion}\%$  - Simulierter Messwert aus der Funktion ( 78 ) zum Zeitpunkt t [%]

Eine mögliche Solverfunktion ist in Abb. 42 gezeigt. Im weiteren Verlauf werden die Ergebnisse dieser Methode zur Bestimmung „ $kLa$ -fit“ genannt.

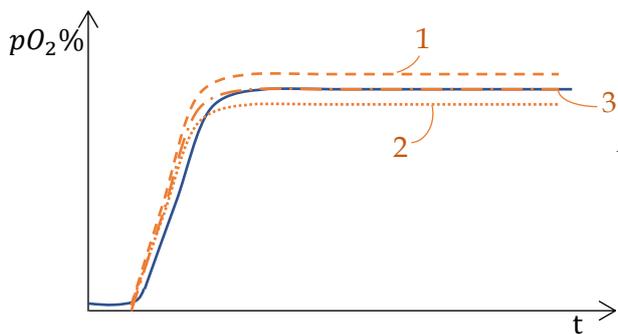


Abb. 42 - Beispiel für die Ergebnisse des  $kLa$ -fits über die Solverfunktion von Excel 365, in blau mit durchgezogener Linie  $pO_2$ - Messdaten, Ergebnis-Kurve 1 und 2 des Solvers für das Kurvenmodell mit zu großer Fehlerquadrat-Summe, Kurve 3 ist die Lösung mit der kleinsten Fehlerquadrat-Summe

### 9.2.2. Ergebnisse

Tabelle 13 – Ergebnisse der Auswertungsmethode  $kLa$ fit

Ver-suchsnr	$N_{St}$	$V_L$	$r$	$F_{nG}$	$c_{AF}$	$k_La$
	[rpm]	[L]	[-]	[L/h]	[%]	[1/h]
2	100	10	0	24	0	1.60
3	100	6	0	24	0.4	2.29
5	100	6	0	60	0	5.56
8	100	10	0	60	0.4	2.68
9	200	6	0	60	0	11.77
12	200	10	0	24	0.4	3.00
14	200	10	0	60	0	7.80
15	100	10	1	60	0	3.23

Ver- suchsnr	N <sub>St</sub>	V <sub>L</sub>	r	F <sub>nG</sub>	c <sub>AF</sub>	k <sub>La</sub>
	[rpm]	[L]	[-]	[L/h]	[%]	[1/h]
17	100	6	1	24	0	3.94
18	100	10	1	24	0	1.90
20	100	10	1	24	0.4	1.47
23	100	6	1	60	0.4	6.17
26	200	10	1	24	0	3.89
27	200	6	1	24	0.4	4.73
29	200	6	1	60	0	12.98
32	200	10	1	60	0.4	4.65
33	150	8	0.5	42	0.2	3.58
34	150	8	0.5	42	0.2	3.18
35	150	8	0.5	42	0.2	3.16

### 9.2.3. Modell

Tabelle 14 – Coeffizienten der MLR Gleichung über die Daten von k<sub>La</sub>fit

k <sub>La</sub> fit~	Coeff.	Std. Err.	P	Conf. int(±)
Constant	0.482494	--	--	--
Drehzahl	0.00334641	--	--	--
Begasungsrate	0.00870082	--	--	--
Flüssigvolmen	-0.0737946	--	--	--
Antischaumanteil	-0.318387	--	--	--
N = 19	Q2 =	0.904	Cond. no. =	1,316
DF = 14	R2 =	0.946	RSD =	0.07749
	R2 adj. =	0.931	Confidence =	0.95

k <sub>La</sub> fit~	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
Constant	0.695857	0.0181416	1.39E-10	0.0389102
Drehzahl	0.167321	0.0196668	6.64E-02	0.0421814
Begasungsrate	0.156615	0.019846	1.60E-01	0.0425658
Flüssigvolmen	-0.147589	0.0196668	2.86E-01	0.0421814

**Antischaumanteil**

-0.0636773	0.0196582	0.00593862	0.042163
N = 19	Q2 =	0.904	Cond. no. = 1,316
DF = 14	R2 =	0.946	RSD = 0.07749
	R2 adj. =	0.931	
	Confidence =		0.95

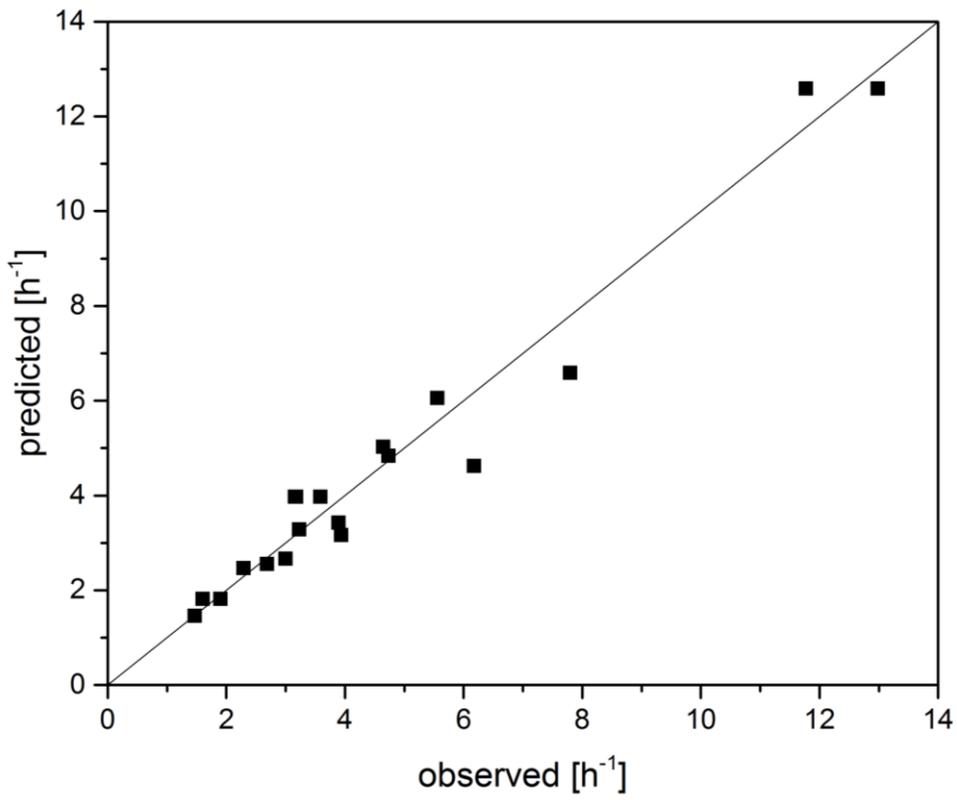


Abb. 43- gemessenen gegen berechnete  $k_{La}$ -Werte der  $kLa$ -fit Methode mit dem MLR Modell

9.3.  $kLa$  Ln

9.3.1. Methode - Trendlinie der logarithmischen Funktion

Da es sich um ein zellfreies System handelt, ist die Sauerstoffverbrauchsrate bzw. die Sauerstoffaufnahmerate OUR gleich null. Dadurch ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$V \frac{dc_{O_2}}{dt} = V \cdot \dot{n}_{O_2} - V \cdot qOUR \tag{81}$$

$V \cdot qOUR$  - Integrale Sauerstoffaufnahmerate pro Zelle  $\left[ \frac{L}{h} \right]$

Zellfreies Modellsystem =>  $qOUR = 0$

$$\frac{dc_{OL}}{dt} = \dot{n}_{O_2} = k_L a \cdot (c_{OL}^* - c_{OL})$$

Umstellen und integrieren:

$$k_L a \cdot t = \ln \left( \frac{c_{OL}^*}{c_{OL}^* - c_{OL}(t)} \right) \quad (82)$$

Die Steigung des Verlaufs von Gleichung ( 82 ) über die Zeit ergibt somit den  $k_L a$ . Da  $pO_2\%(t)$  und  $c_{OL}(t)$  direkt proportional zueinander sind, können sie für die Auswertung direkt gegeneinander ausgetauscht werden, was somit eine Auswertung der direkten Prozessdaten ermöglicht, vgl. Abb. 14.

$$k_L a \cdot t = \ln \left( \frac{100\%}{100\% - pO_2(t)} \right) \quad (83)$$

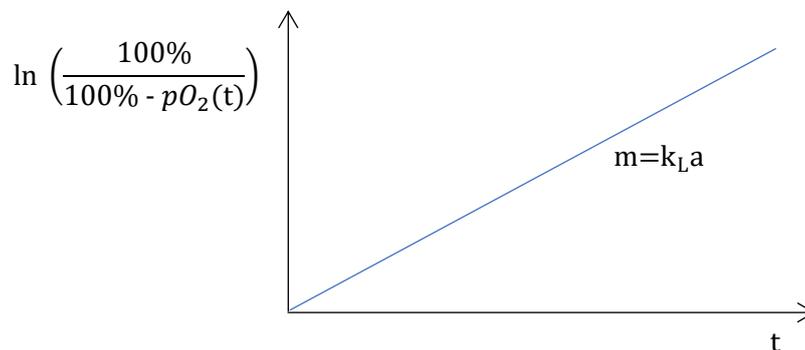


Abb. 44 - Verlauf Änderung der Gelöstsauerstoffkonzentration über die Zeit zur Bestimmung des  $k_L a$

[13]

### 9.3.2. Ergebnisse

Tabelle 15 - Ergebnisse der Auswertungsmethode  $k_L a \ln$

Ver- suchsnr	N <sub>st</sub>	V <sub>L</sub>	r	F <sub>nG</sub>	c <sub>AF</sub>	k <sub>L</sub> a
	[rpm]	[L]	[-]	[L/h]	[%]	[1/h]
2	100	10	0	24	0	1.60
3	100	6	0	24	0.4	2.26
5	100	6	0	60	0	5.55
8	100	10	0	60	0.4	2.68
9	200	6	0	60	0	10.37

Ver- suchsnr	N <sub>St</sub>	V <sub>L</sub>	r	F <sub>nG</sub>	c <sub>AF</sub>	k <sub>La</sub>
	[rpm]	[L]	[-]	[L/h]	[%]	[1/h]
12	200	10	0	24	0.4	2.97
14	200	10	0	60	0	7.78
15	100	10	1	60	0	3.46
17	100	6	1	24	0	3.89
18	100	10	1	24	0	1.89
20	100	10	1	24	0.4	1.56
23	100	6	1	60	0.4	6.41
26	200	10	1	24	0	4.02
27	200	6	1	24	0.4	3.83
29	200	6	1	60	0	13.21
32	200	10	1	60	0.4	5.03
33	150	8	0.5	42	0.2	3.70
34	150	8	0.5	42	0.2	3.29
35	150	8	0.5	42	0.2	3.39

### 9.3.3. Modell

Tabelle 16 Coeffizienten der MLR Gleichung über die Daten von k<sub>La</sub>n

k <sub>La</sub> n~	Coeff.	Std. Err.	P	Conf. int(±)
Constant	0.874599	--	--	--
Drehzahl	-4.39E-05	--	--	--
Begasungsrate	0.00932997	--	--	--
Flüssigvolmen	-0.119359	--	--	--
Antischauman- teil	-0.340802	--	--	--
N <sub>St</sub> *V <sub>L</sub>	0.00038012	--	--	--

N = 19      Q2 =      0.898      Cond. no. =      1,398  
 =  
 DF = 13      R2 =      0.953      RSD =      0.07274  
 R2 adj. =      0.936

Con-  
fidence =      0.95

<b>kLaLn~</b>	<b>Coeff. SC</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>P</b>	<b>Conf. int(±)</b>
<b>Constant</b>	0.692988	0.0170468	4.35E-10	0.0368274
<b>Drehzahl</b>	0.149853	0.0186251	2.10E-01	0.0402372
<b>Begasungsrate</b>	0.167939	0.0186319	5.92E-02	0.0402519
<b>Flüssigvolmen</b>	-0.124682	0.0186251	1.48E+00	0.0402372
<b>Antischauman- teil</b>	-0.0681604	0.0186068	0.0028642	0.0401975
<b>NSt*VL</b>	0.0380117	0.0186487	<b>0.0623981</b>	0.0402881

N = 19      Q2 =      0.898      Cond. no. =      1,398  
 DF = 13      R2 =      0.953      RSD =      0.07274  
                  R2 adj. =      0.936  
                                          Con-  
                                          fidence =      0.95

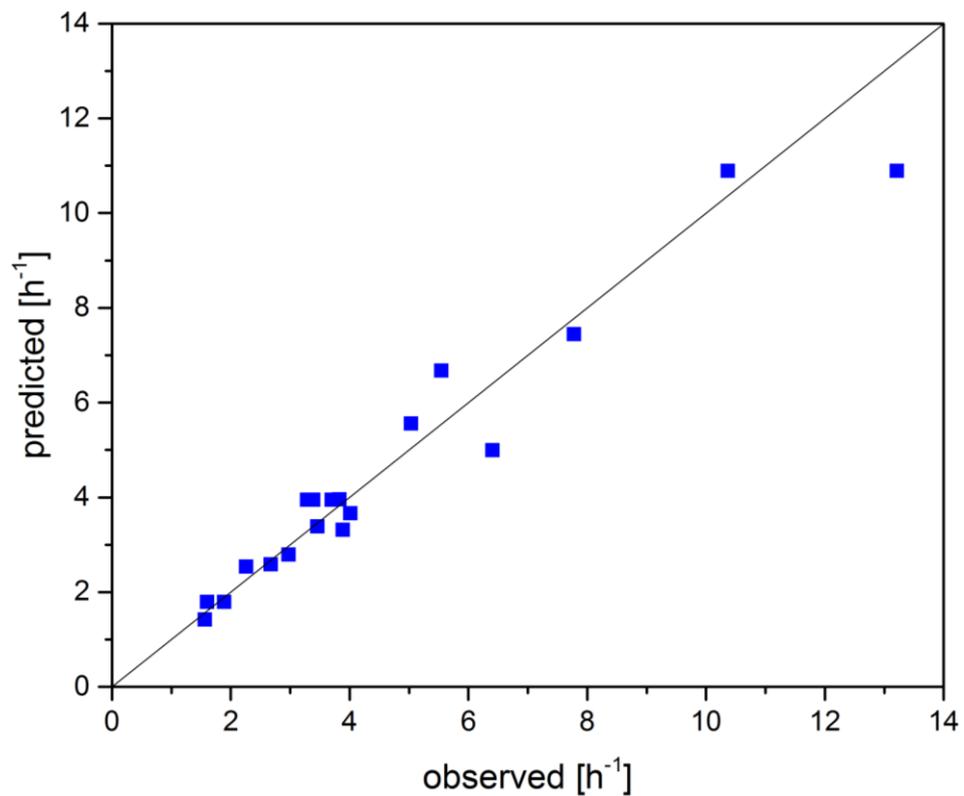


Abb. 45- gemessenen gegen berechnete  $k_{La}$ -Werte der  $k_{La}$ -Ln Methode mit dem MLR Modell

## 10. Ergebnisse zur Bestimmung der Zeitkonstante $T_M$ der pO<sub>2</sub>- Sonde

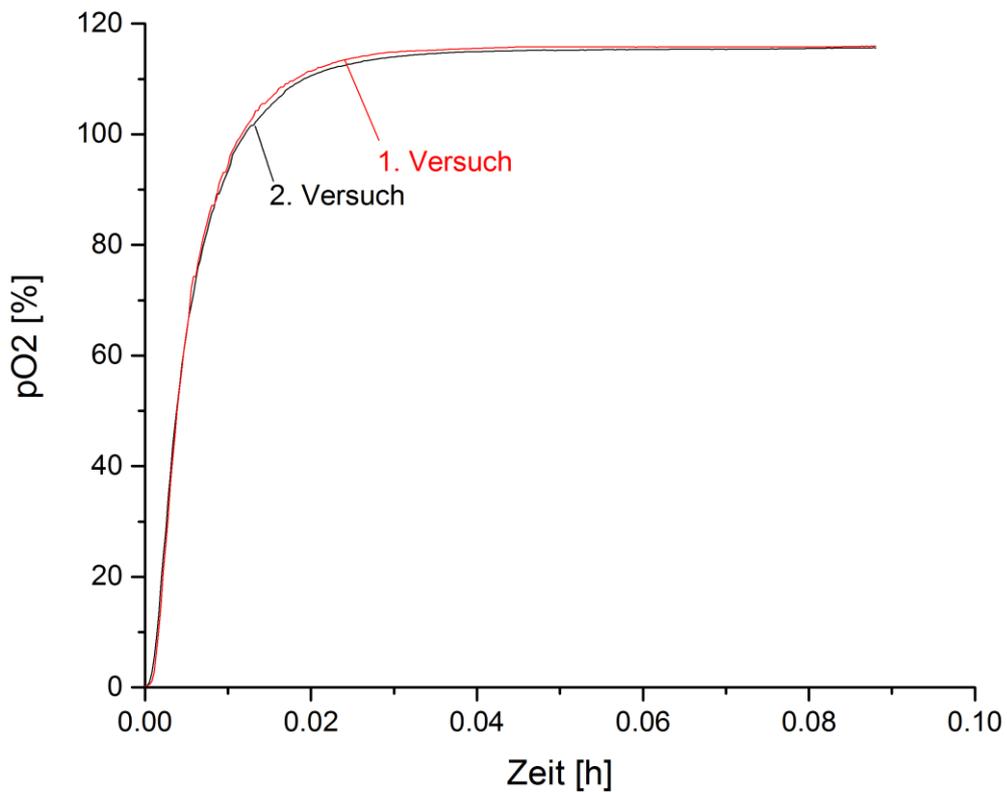


Tabelle 17 -Ergebnisse der  $T_M$ -Bestimmung

	TM [h]	TM[s]
Auf 1	0.00607952	21.8862557
Auf 2	0.0057451	20.6823447
Mittelwert	0.00591231	21.2843002

## 11. Ergebnisse der $k_{La}$ -Werte Bestimmung durch Annäherung an das PT<sub>3</sub>-Übertragungssystem

Befindet sich auf dem beigelegten Datenträger.

12. Koeffizienten des MLR Modells aus den  $k_{La}$  Werte der Näherung über  
das PT<sub>3</sub>-System

<b>kLaMatlab~</b>	<b>Coeff. SC</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>P</b>	<b>Conf. int(±)</b>	<b>Coeff.</b>
<b>Constant</b>	0.594318	0.0163386	1.82E-09	0.0352974	0.882517
<b>Drehzahl</b>	0.150239	0.0178514	1.28E-01	0.0385655	- 0.00083776
<b>Begasungsrate</b>	0.18903	0.0178579	9.26E-03	0.0385797	0.0105017
<b>Flüssigvolumen</b>	-0.13207	0.0178514	5.21E-01	0.0385655	-0.138082
<b>Antischaumanteil</b>	-0.0753256	0.0178338	0.00099456	0.0385275	-0.376628
<b>NSt*VL</b>	0.0480317	0.017874	0.0186419	0.0386144	0.00048032

N = 19      Q2 =      0.923      Cond. no. =      1,398  
 DF = 13      R2 =      0.963      RSD =      0.06972  
                  R2 adj. =      0.949  
                                          Confidence =      0.95  
                                          =

C1

1.4 C2

-0.6