



Application Note AN-PAN-1065

Inline-Überwachung von Fermentationsprozessen mit Raman-Spektroskopie

Fermentationsprozesse sind wichtige Bestandteile der biopharmazeutischen Industrie. Eine strenge Kontrolle dieser Prozesse ist notwendig, um eine optimale Zellviabilität erreichen und unerwünschte Reaktionen zu vermeiden.

Glukose ist für die Zellenergie unerlässlich, bei der Umwandlung in Energie durch Glykolyse entsteht jedoch auch Laktat. Die Anhäufung von Laktat führt zu einer Übersäuerung, die Zellstress und ein verringertes Zellwachstum verursacht. Manuelle Labormethoden können recht umständlich und aufgrund einer manuellen Probenahme fehleranfällig sein. Dies führt zu ungenauen Ergebnissen und im schlimmsten Fall zu einer Verunreinigung der Probe.

Zur Lösung dieser Probleme ist die Inline-Raman-Spektroskopie eine sehr gut geeignete Analysetechnik, da Ergebnisse ohne jegliche Probenahme oder manuellen Eingriff und ohne Einsatz von Reagenzien direkt im Prozess entstehen. In dieser Process Application Note wird eine Methode zur genauen Überwachung des Zellwachstums in einem Bioreaktor in "Echtzeit" mit dem 2060 Raman Analyzer von Metrohm Process Analytics vorgestellt. In diesem Fall ist ein Inline-Prozessanalysator die bevorzugte Lösung, um eine hohe Produktqualität zu gewährleisten und Kontaminationen durch Probenahme zu vermeiden.

EINFÜHRUNG

Die Zellkultivierung in einem Fermentationsprozess ist ein wesentlicher Schritt bei der Herstellung einer breiten Palette von Biopharmazeutika, darunter komplexe therapeutische Proteine, monoklonale Antikörper und Impfstoffe [1]. Bei diesem Verfahren werden Zellen in einer kontrollierten Umgebung, in der Regel in einem Bioreaktor, gezüchtet, um das gewünschte Produkt in vielen weiteren Schritten herzustellen.

Glucose ist ein wichtiger Bestandteil der Zellkultur, da sie die Zellen mit der Energie versorgt, die sie für ihr Wachstum, ihre Teilung und die Bildung des Endprodukts benötigen [2]. **Abbildung 1** veranschaulicht den grundlegenden Prozess der Umwandlung von Glukose in Energie innerhalb einer Zelle.

Die Umwandlung von Glucose in Energie (d. h. Glykolyse) führt zur Produktion von Laktat, der ionisierten Form von Milchsäure. Die Anreicherung von Laktat in Zellkulturmedien kann das Zellwachstum und die Produktivität beeinträchtigen. Da Laktat als Säure fungiert, kann seine Anreicherung im Kulturmedium den pH-Wert senken, zellulären Stress hervorrufen und die Wachstumsraten verringern [4].

Um eine Ansammlung von Laktat zu verhindern, müssen Hersteller die Zellkulturbedingungen überwachen und anpassen, um den Laktatspiegel in einem akzeptablen Bereich zu halten. Dies kann die kontinuierliche Analyse der Glukose- und Laktatkonzentration im Kulturmedium umfassen, wodurch eine präzise Nachdosierungen der Glukose ermöglicht und gleichzeitig eine Über- oder Unterdosierung verhindert wird.

Typischerweise werden solche Messungen manuell (offline) im Labor durchgeführt. Kontaminationsgefahr, Verlust von wertvollem Produkt durch die Extraktion von Probe und zeitverzögerte Ergebnisse sind die häufigsten Fehlerquellen.

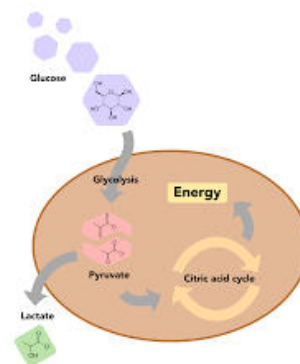


Abbildung 1. Überblick über den Glukose-Mechanismus in menschlichen Zellen. Entnommen aus [3].

Eine sicherere, effizientere und schnellere Methode zur gleichzeitigen Überwachung mehrerer Parameter in Bioreaktoren ist die Inline-Analyse mit reagenzienfreier Raman-Spektroskopie (**Abbildung 2**).

Es handelt sich um eine zerstörungsfreie und berührungslose Technik, die sich daher ideal für die Inline-Analyse direkt am Bioreaktor eignet (**Abbildung 2**, linke Seite).

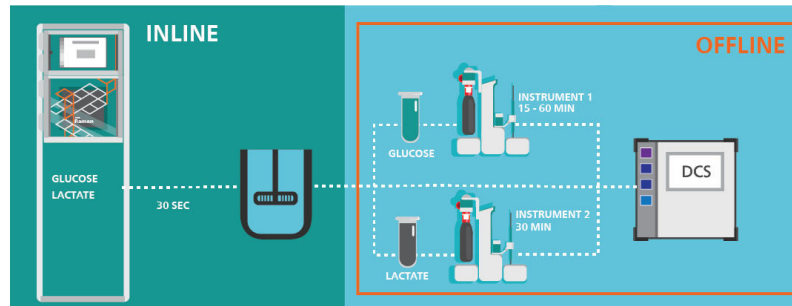


Abbildung 2. Schritte zur Messung von Glukose und Laktat in einem Bioreaktor durch Implementierung einer Inline- (links) oder Offline-Analyse (rechts).

Der 2060 Raman Analyzer von Metrohm Process Analytics ermöglicht die automatische Vorhersage und Überwachung von Glukose und Laktat im Zellkulturbioreaktor über ein unverzichtbares, aber einfaches Kalibriermodell. Die "Echtzeit"-Spektraldaten aus dem Prozess wurden zuvor mit einer Referenzmethode (z.B. Titration, Ionenchromatographie, HPLC) korreliert und

Kalibreirmodelle erstellt, die anschließend automatisiert im Prozess eingesetzt werden. Die "Echtzeit"-Analyse des Zustands der Zellkultur hält die Glykolyse-Reaktion unter Kontrolle. Darüber hinaus kann die Inline-Analyse Informationen über den aktuellen Zustand weiterer Prozesse (z. B. Substratverbrauch, Kinetik, Produktausbeute) liefern.

Verwendeter Laser: 785 nm. Die Inline-Analyse ist mit einer von Metrohm Process Analytics entwickelten autoklavierbaren Tauchsonde möglich. Die Spektraldaten wurden mit einem 2060 Raman

Analyzer (**Abbildung 3**) unter Verwendung der Software IMPACT und Vision von Metrohm erfasst. Die Messungen wurden im Minutentakt erfasst.

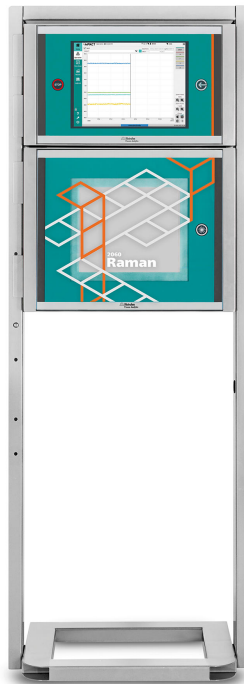


Abbildung 3. 2060 Raman Analyzer für die quantitative Analyse von Laktat und Glukose in einem Zellkultur-Bioreaktor.

Tabelle 1. Messbereich und Vorhersagegenauigkeit der gemessenen Parameter in einem Zellkultur-Bioreaktor, analysiert mit dem 2060 Raman Analyzer (Abbildung 3).

	Glucose	Laktat
Minimale Konzentration	0,1 g/L	0,0 g/L
Maximale Konzentration	40 g/L	5,0 g/L
Bias	-0.1349	-0.0849
SEP	0.2009	0.1166

FAZIT

Die Raman-Spektroskopie wird in vielen verschiedenen Anwendungen und Branchen eingesetzt, in denen hochwertige Daten unerlässlich sind. Der 2060 Raman Analyzer ist ein effizienter und leistungsstarker Raman-Prozessanalysator, der für Prozesse entwickelt wurde, die eine lückenlose und berührungslose Analyse erfordern, beispielsweise

biotechnologische Produktionen. Zusammen mit der Vision- und IMPACT-Software von Metrohm kann der 2060 Raman Analyzer zur Erfassung von Ergebnissen nahezu in Echtzeit eingesetzt werden, was zeitkritische Prozesse mit hohem Produktwert, wie die pharmazeutische Entwicklung, unterstützt.

VORTEILE FÜR RAMAN IN BEARBEITUNG

- Frühzeitige Erkennung qualitätsrelevanter Parameter während der Zellkultur.
- Mehrere Parameter mit einer einzigen Messung.
- Risikominimierung einer Probenkontamination durch berührungslose in-situ Technik.
- Einzigartige Raman-Spektren, die als spezifische Fingerabdrücke zur **Materialidentifikation** dienen.
- **Optimal** geeignet für Anwendungen in **wässrigen Medien** – eine ideale Ergänzung zu anderen Spektroskopietechniken.
- **Zerstörungsfrei** Technik, ideal für die Inline-Analyse.



REFERENZEN

1. *Cell Culture for Manufacturing*.
https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-for-manufacturing?gclid=Cj0KCOiA35urBhDCARlsAOU7QwnVfIHJBACARsDiW_HbgHGxW3Fs-69CzCg6ottMMj-nmakHFZ5QTrUaAt10EALw_wcB (abgerufen am 29.11.2023).
2. *Glucose in Cell Culture*.
<https://www.sigmaaldrich.com/NL/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/glucose> (abgerufen am 29.11.2023).
3. admin. The Circle of Lactate: How Cancer Cells Can Reuse Their Own Waste. *Science in the News*, 2018.
4. Li, Z.-M.; Fan, Z.-L.; Wang, X.-Y.; et al. Factors Affecting the Expression of Recombinant Protein and Improvement Strategies in Chinese Hamster Ovary Cells. *Front Bioeng Biotechnol* **2022**, *10*, 880155.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.880155>.

CONTACT

Metrohm Schweiz AG
Industriestrasse 13
4800 Zofingen

info@metrohm.ch

GERÄTEKONFIGURATION



2060 Raman Analyzer

Der **2060 Raman Analyzer** ist ein zerstörungsfreier Inline-Prozessanalysator, der die Raman-Spektroskopie für eine genaue Prozessüberwachung in Echtzeit nutzt. Dank seiner Selbstüberwachungsfunktionen, seines Spektrometers mit hohem Durchsatz und seiner dauerhaften Laserstabilität bietet er sofortige Erkenntnisse zur chemischen Zusammensetzung und ermöglicht rechtzeitige Anpassungen für eine optimale Prozesssteuerung, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten und die allgemeine Betriebseffizienz zu steigern.

An das Analysengerät können bis zu 5 Sonden und/oder Durchflusszellen angeschlossen werden. Mit Hilfe der integrierten proprietären Software können alle 5 Kanäle unabhängig voneinander konfiguriert werden.