



## Bestimmung von Sauerstoffkonzentration und Temperatur durch ratiometrische Fluoreszenzmessung

A. Glindkamp<sup>1)</sup>, M. Fritzsche<sup>1)</sup>, S. Beutel<sup>1)</sup>, R. Baumfalk<sup>2)</sup>, T. Scheper<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover, Callinstr. 3, 30167 Hannover

<sup>2)</sup> Sartorius Stedim Biotech, August-Spindler-Straße 11, 37079 Göttingen, Germany

### Einleitung

Bei Kultivierungen ist die genaue Beobachtung von verschiedenen Prozessparametern unerlässlich, um eine gute Analyse und Regelung des Prozesses zu ermöglichen. Eine einfach anzuwendende, nicht-invasive Methode zur online-Beobachtung sind optische Sensoren.

Ein Messprinzip, das für optische Sensoren genutzt wird, basiert auf die Löschung von Lumineszenz durch den Analyten. Ein lumineszierender Farbstoff wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und das emittierte Licht mit einem Photomultiplier detektiert. Sowohl Lebenszeit als auch Intensität können genutzt werden, um die Analytkonzentration zu berechnen. Der Farbstoff wird an der Innenseite der Reaktorwand befestigt, die Anregung kann von außen durch die transparente Reaktorwand erfolgen. Da so das Infektionsrisiko minimiert wird, eignen sich optische Sensoren hervorragend für biotechnologische Anwendungen.

Ein Problem solcher Sensoren ist, dass die Lumineszenz aufgrund von Ausbleicheffekten abnimmt. Um ein stabiles Signal zu erhalten, sind schnelle Lebenszeitmessungen nötig. Ein neuer Ansatz ist die Messung eines internen Referenzsignals zusätzlich zum Messsignal. Das Referenzsignal muss unabhängig von dem Analyten sein oder eine andere Abhängigkeit als das Messsignal aufweisen. Die Analytkonzentration wird durch das Verhältnis der beiden Signal zueinander bestimmt. Ratiometrische Messungen sind unabhängig von der absoluten Lumineszenzintensität, so dass Ausbleicheffekte keinen Einfluss auf das Signal haben. Auch der Einfluss mechanischer Störungen ist geringer.

### Indikator

Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff ist eine Mischung aus zwei Octaethylporphyrin(OEP)-Komplexen, ZnOEP and PtOEP (Abb. 1). ZnOEP zeigt ein Lumineszenzsignal bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 410 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 580 \text{ nm}$ , PtOEP bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 650 \text{ nm}$ . Die Lumineszenz von PtOEP wird sowohl durch Sauerstoff als auch durch Temperatur stärker beeinflusst als die Lumineszenz von ZnOEP (Abb. 2).

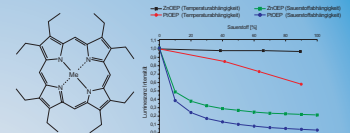


Abb. 1: OEP-Komplex Abb. 2: Sauerstoff- und Temperaturabhängigkeit von ZnOEP und PtOEP

#### Immobilisierung

##### 1. Sauerstoffmessung

Um Sauerstoff messen zu können, muss der Farbstoff in einer sauerstoffdurchlässigen Matrix immobilisiert werden. Hierfür wird der Farbstoff zusammen mit Polysulfon in Chloroform gelöst. Für eine bessere Porosität und damit kürzere Ansprechzeiten wird Ethanol hinzugegeben und die Lösung auf eine poröse Polyethylen/Polypropylen-Membran gegeben.

##### 2. Temperaturmessung

Um Löschungseffekte auszuschließen, die durch Sauerstoff verursacht werden, muss der Farbstoff in einer für Sauerstoff undurchlässigen Matrix immobilisiert werden. Hierfür wird der Farbstoff in Chloroform gelöst und die Lösung mit einem Zwei-Komponenten-Epoxidkleber vermischt. Wenn der Kleber ausgehärtet ist, kann der Sensor-Patch verwendet werden.

Es ist nicht möglich, bei den Sauerstoffmessungen Temperatureffekte zu vermeiden, aber durch eine gleichzeitige Messung der Temperatur wird die Messung von Sauerstoff bei variierender Temperatur möglich, ohne dass eine erneute Kalibration nötig ist.

### Die Optik des Sensors

Um ratiometrische Messungen mit nur einem Detektor durchführen zu können wird ausgenutzt, dass die beiden Signale bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden. Durch abwechselnde Anregung mit Licht dieser Wellenlängen können die Signale zeitlich voneinander getrennt werden.

Wie in Abbildung 3 gezeigt, werden zwei LEDs (blau und grün) als Lichtquelle genutzt. Das LED-Licht wird Interferenzfiltern mit einer Halbwertsbreite von 10 nm. Das Anregungslicht wird durch dichroitisch e Spiegel reflektiert. Das emittierte Licht passiert diese Spiegel und wird von einem Photomultiplier (PMT) detektiert. Vor dem PMT ist ein weiterer Filter angebracht, der störendes Streulicht abhalten soll.

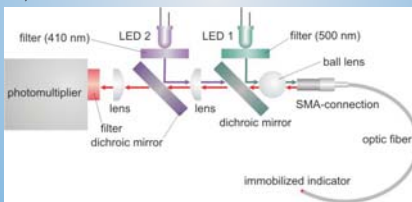


Abb. 3: Aufbau der Optik des Sensors

### Messung von Sauerstoff

Die Sauerstoffabhängigkeit der beiden Lumineszenzsignale von Farbstoffmischungen mit unterschiedlichen PtOEP:ZnOEP-Verhältnis wurde untersucht. Die Messungen wurden in der Gasphase durchgeführt. Die Ergebnisse der Messung mit einem Farbstoff, der 10 % ZnOEP enthält, sind in Abbildung 4 gezeigt. Das Messsignal (blaue Kurve) nimmt mit steigendem Sauerstoffpartialdruck ab. Bei geringen Sauerstoffpartialdrücken (bis 10 %) nimmt das Referenzsignal (grüne Kurve) mit steigendem Sauerstoffgehalt ab, bei höheren Partialdrücken bleibt es konstant. Der Verlauf ist für andere ZnOEP:PtOEP-Verhältnisse ähnlich. Die Ergebnisse unterscheiden sich bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff, also der Änderung des Quotienten der Messsignale im Verhältnis zur Änderung des Sauerstoffpartialdrucks. Bei kleinen Partialdrücken sind Farbstoffe mit einem hohen ZnOEP-Anteil empfindlicher, bei hohen Sauerstoffkonzentration sind Farbstoffe mit einem hohen PtOEP-Anteil empfindlicher. Der Farbstoff mit einem PtOEP:ZnOEP-Verhältnis von 7:3 zeigt eine hohe Sensitivität über den gesamten Konzentrationsbereich. (Abb. 5)

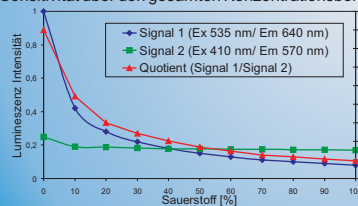


Abb. 4: O<sub>2</sub>-Abhängigkeit der Lumineszenzsignale bei einem Verhältnis von PtOEP:ZnOEP = 9:1

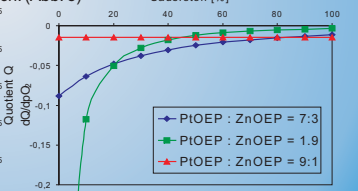


Abb. 5: Sauerstoffempfindlichkeit verschiedener Farbstoffe

### Messung der Temperatur

Auch die Temperaturabhängigkeit der beiden Lumineszenzsignale von Farbstoffen mit verschiedenen PtOEP:ZnOEP-Verhältnissen wurde in der Gasphase untersucht. Die Lumineszenzsignale der verschiedenen Farbstoffe zeigen ähnliche Abhängigkeiten, exemplarisch sind die Ergebnisse der Messung mit einem Farbstoff, der 10 % PtOEP enthält, gezeigt (Abb. 6). Während das Referenzsignal (blaue Kurve) nahezu unabhängig von der Temperatur ist, sinkt das Messsignal mit steigender Temperatur. In Abbildung 7 ist die Änderung des Signal-Quotienten im Verhältnis zur Temperatur gegen die Temperatur aufgetragen. Für alle getesteten Farbstoffe steigt die Empfindlichkeit mit steigender Temperatur. Die beste Empfindlichkeit wurde bei einem Farbstoff mit 60 % PtOEP gemessen (Abb. 7).

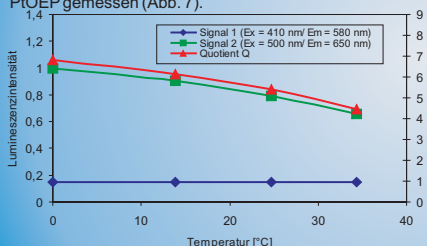


Abb. 6: Temperaturabhängigkeit der Lumineszenzsignale bei einem Verhältnis von PtOEP:ZnOEP = 1:9

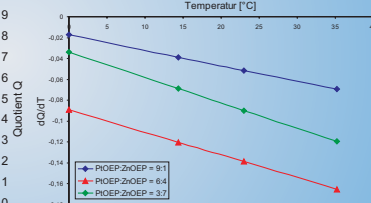


Abb. 7: Temperaturempfindlichkeit von verschiedenen Farbstoffen

### Zusammenfassung

Ein ratiometrischer optischer Sauerstoffsensor wurde getestet, verschiedene Mischungen von ZnOEP und PtOEP wurden als Indikator verwendet. Zwei zeitlich voneinander getrennte Lumineszenz-Signale wurden gemessen ( $\lambda_{\text{Ex}} = 410 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 580 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{Em}} = 650 \text{ nm}$ ). Da Referenz- und Messsignal verschiedene Abhängigkeiten sowohl gegenüber der Sauerstoffkonzentration als auch gegenüber der Temperatur aufweisen, sind ratiometrische Messungen beider Analyten mit demselben optischen System möglich, nur die Immobilisierungsmatrix des Indikators muss geändert werden. Durch die gleichzeitige Messung der Temperatur werden Sauerstoffmessungen bei variierender Temperatur ermöglicht.

Änderungen der Farbstoffzusammensetzung ändern auch die Empfindlichkeit des Sensors. Für Sauerstoffmessungen weist der Farbstoff mit 30 % ZnOEP eine gute Empfindlichkeit für alle Sauerstoffkonzentrationen auf. Für Messungen bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen führt ein höherer Anteil von PtOEP zu größerer Empfindlichkeit, während ein höherer Anteil von ZnOEP zu einer größeren Empfindlichkeit bei höheren Sauerstoffkonzentrationen führt.

Temperaturmessungen sind umso empfindlicher, je höher die Temperatur ist. Der Farbstoff mit einem ZnOEP-Anteil von 40 % weist die höchste Empfindlichkeit auf.