

ESPECTROSCOPIA DIELECTRICA COMO HERRAMIENTA PARA EL MONITOREO DE BIOPROCESOS

Adrián Díaz Pacheco¹, Víctor Eric López y López^{1*}

¹Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN, Tlaxcala),
Carretera Estatal Sta. Inés Tecuexcomac - Tepetitla km 1.5, Tlaxcala, México.

*E mail: vlopezyl@ipn.mx

RESUMEN

El cultivo de células en reactores es una de las etapas más importantes del bioproceso; durante esta se define la cantidad y calidad del producto de interés. Es por ello que gran número de trabajos se han enfocado en el empleo de diferentes herramientas y técnicas que permitan lograr un monitoreo y control más específico y detallado con la finalidad de mejorar la comprensión de los procesos. Una de estas técnicas es la espectroscopia dieléctrica, la cual debido a sus características permite diferenciar entre células vivas y muertas, proporcionando información en tiempo real del estado celular de manera no invasiva ni destructiva. Debido a esto, la espectroscopia dieléctrica se perfila como una Tecnología Analítica de Proceso (PAT) para su empleo en procesos industriales. En la presente revisión se abordarán los fundamentos de la técnica y algunas aplicaciones de interés en bioprocesos.

Palabras clave

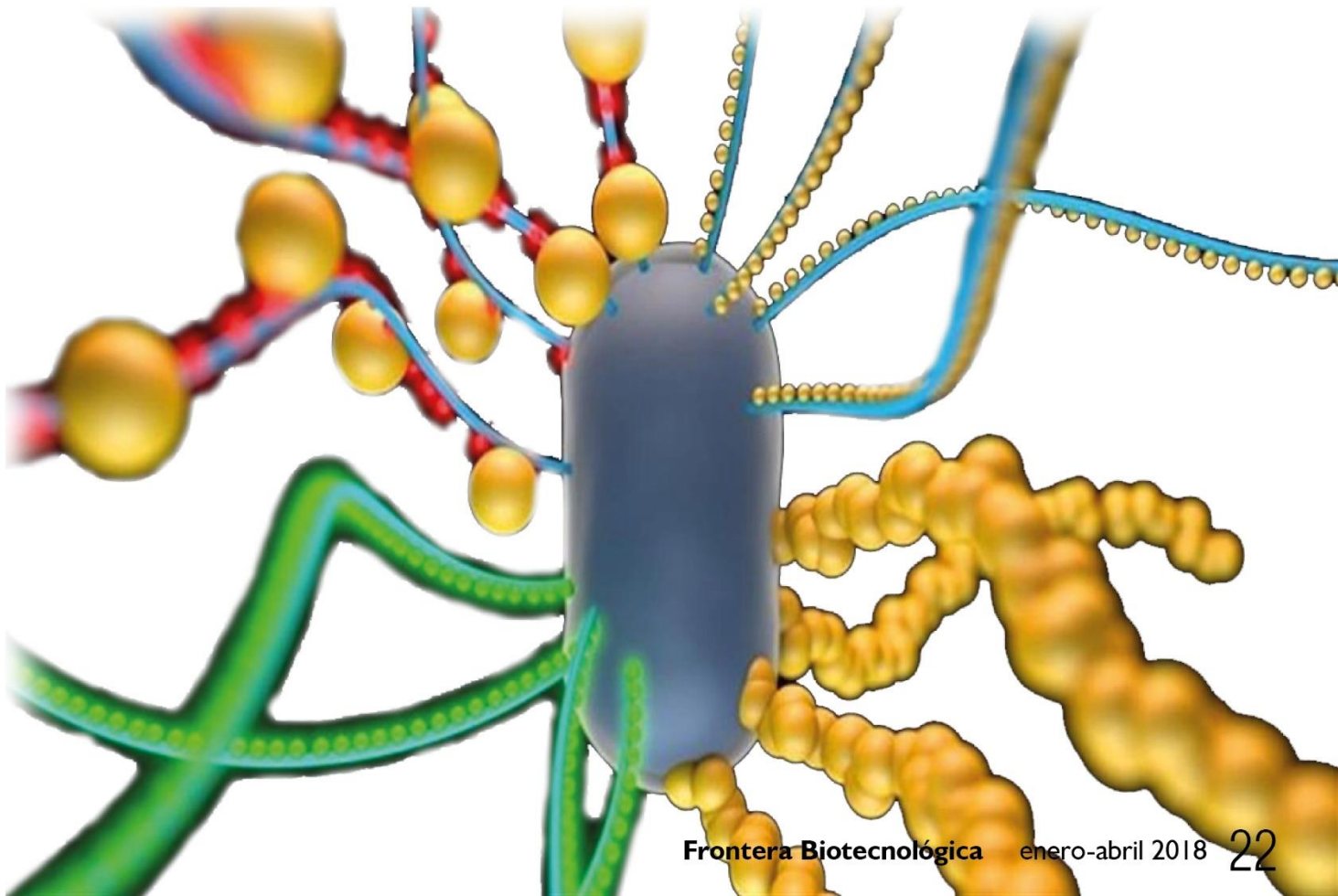
Espectroscopia dieléctrica, monitoreo, bioprocesos

ABSTRACT

The cell culture in reactors is one of the most important stages of the bioprocess. During this phase the quantity and quality of the product of interest is defined. This is the reason why many investigations have been focused on the use of different tools and techniques to achieve more specific and detailed monitoring and control, in order to improve the understanding of the processes. One of these techniques is dielectric spectroscopy, which due to its characteristics allows to differentiate between living and dead cells, providing information in real time of the cellular state in a non-invasive or destructive way. Because of this, dielectric spectroscopy is emerging as an Analytical Process Technology (PAT) for its use in industrial processes. In the present review, the fundamentals of the technique and some applications of interest in bioprocesses will be addressed.

Key words

Dielectric spectroscopy, monitoring, bioprocess



1. INTRODUCCIÓN

El monitoreo y control de procesos es una herramienta indispensable para el desarrollo y optimización de los mismos (Ansoerge, et al, 2009). Su empleo permite la generación de productos de mayor calidad mediante la determinación, comprensión y control de los parámetros clave que afectan la producción (Pohlscheidt, et al, 2013). Actualmente, los parámetros más empleados en el cultivo celular y cuyo monitoreo y control es fundamental son: la temperatura, velocidad de agitación, formación de espuma, potenciales redox, pH y concentraciones de oxígeno disuelto y dióxido de carbono (Mulchandani y Bassi, 1995). Sin embargo, estos parámetros simplemente son empleados para mantener las condiciones de operación del proceso, sin que esto repercuta en una alta productividad del mismo (Czermak, et al, 2009). A pesar de la importancia de estos parámetros, el monitoreo de la biomasa a través de alguna de sus propiedades como la morfología, la concentración, la viabilidad o la actividad celular, puede proveer información de mayor relevancia como el estado del proceso (Riley, 2006). Debido a esto, la biomasa es considerada una de las variables cuyo monitoreo es primordial, la medición confiable de esta ha sido la meta por décadas y es por ello que gran variedad de métodos y sistemas han sido desarrollados para su monitoreo *in situ* (Kiviharju, et al, 2008). Sin embargo, debido a que los métodos actuales como: la densidad óptica, la calorimetría, la microscopía *in situ*, la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, la Velocidad de Consumo de Oxígeno y el Coeficiente Respiratorio, se basan en la determinación de al menos una de las propiedades de la biomasa (Biechele, et al, 2015; Bluma, et al, 2010; Beutel y Henkel, 2011), no pueden interrelacionarse entre si o aplicarse a todo tipo de procesos o cultivos, ya que difieren en los principios de medición o en la variable de interés correlacionada (Kiviharju, et al, 2007). Es por ello que se requiere el empleo de técnicas que permitan lograr un monitoreo *in situ* de biomasa en tiempo real y con posibilidad de aplicarse a todo tipo de procesos, esto con la finalidad de realizar un monitoreo de proceso más detallado, que cumpla con los requerimientos de Buenas Practicas de Fabricación (GMP por sus siglas en inglés) y con las iniciativas como la Tecnología Analítica de Proceso (PAT, por sus siglas en inglés), ambos propuestos por organismos regulatorios como la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea de Medicamentos (AEM), para la validación de procesos (FDA, 2004; Clementschitsch y Bayer, 2006; Glassey, et al, 2011; Pohlscheidt, et al, 2013). Una técnica que ha resultado útil para el monitoreo *in situ* y en tiempo real de cultivos celulares es la espectroscopia dieléctrica, debido a que permite el monitoreo de células vivas en suspensión e inmobilizadas de manera no invasiva, ni destructiva (Carvell y Dowd, 2006).

2. ESPECTROSCOPIA

DIELÉCTRICA

La espectroscopia dieléctrica (ED) como técnica aplicada en sistemas biológicos tiene sus orígenes a principios del siglo XX, con los experimentos dieléctricos del médico Alemán Höber, los cuales tenían por objetivo investigar las propiedades dieléctricas de los eritrocitos a diferentes frecuencias (Höber, 1912; Pethig y Kell, 1987). A partir de su trabajo, surgieron muchos otros enfocados en la obtención de las propiedades dieléctricas de distintas células a través de modelos que permitieran explicar los espectros dieléctricos obtenidos, asentando de esta manera las bases de la ED (Sanchis, 2009).

2.1 Fundamento de la Espectroscopia Dieléctrica

Esta técnica se basa en la medición de las propiedades dieléctricas de una suspensión celular mediante la aplicación de un campo eléctrico de corriente alterna, el cual ocasionará el movimiento de los iones presentes en el medio intra y extra celular en dirección a los respectivos electrodos (Figura 1A) (Yardley, et al, 2000; Impe y E, 2002). Tal movimiento se verá restringido por las membranas celulares de naturaleza no conductora, resultando en la polarización de las mismas y ocasionando que cada célula actúe como un capacitor eléctrico (Figura 1B) (Horta, et al, 2015), el cual ocasionará un desfase entre la onda de corriente y la onda de voltaje, que puede ser medido, resultando en una lectura directa de la Impedancia de la suspensión celular (Senner, 1994; K'Owino y Sadik, 2005).

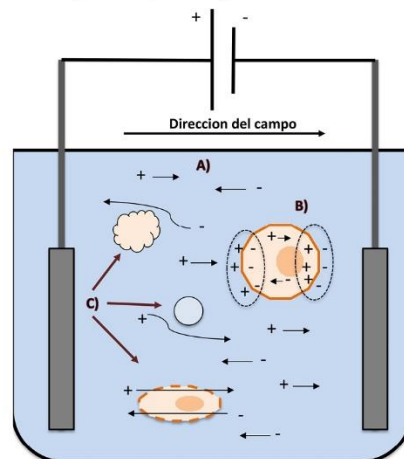


Figura 1. Efecto de la aplicación de un campo eléctrico de corriente alterna a una suspensión celular. A) Migración de iones presentes en el medio en dirección a sus respectivos electrodos. B) Polarización de las membranas celulares debido a la migración de iones intracelulares y extracelulares. C) Los sólidos en suspensión, las burbujas y las células muertas no presentan polarización, por lo cual sus propiedades dieléctricas son insignificantes en comparación con las células viables.

El grado de polarización de la membrana celular está en función de la frecuencia empleada y es independiente de la concentración celular, pero dependiente del tamaño de la célula (Figura 2) (Cannizzaro, et al, 2003; Opel, et al, 2010). A altas frecuencias la membrana se encuentra mínimamente polarizada, representando una resistencia mínima para el paso de la corriente, mientras que a bajas frecuencias la membrana se encuentra completamente polarizada (Figura 3), por lo que actúa como una resistencia (Reactancia capacitiva) que puede ser medida (Kim, et al, 2009; Tibayrenc, et al, 2011). Para la mayoría de las células, el intervalo de frecuencias bajo las cuales pueden actuar como capacitores se encuentra en una región llamada β -dispersión y comprende las frecuencias de 1 kHz a 10 MHz, siendo también el intervalo adecuado para la medición de la densidad celular viable (Schwan, 1957; Asami, 2002; Carvell y Dowd, 2006). Debido a que únicamente las células con membranas intactas se comportan como un capacitor en estas frecuencias, todos los demás elementos como las células muertas o las burbujas presentan valores de propiedades insignificantes en comparación a las células vivas, permitiendo únicamente el monitoreo de células viables (Figura 1C) (Fehrenbach, et al, 1992; Olgún-Sánchez, et al, 2009).

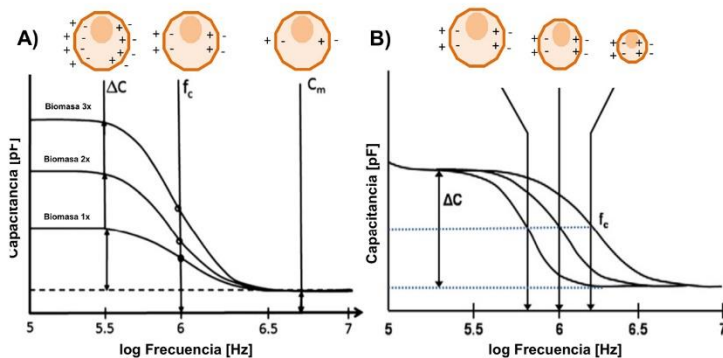


Figura 2. Espectros dieléctricos de capacitancia de una suspensión celular. Efecto de la concentración celular (A) y del diámetro celular (B) sobre los espectros dieléctricos (Adaptado de Cannizzaro, et al, 2003).

2.2 Aplicaciones en el monitoreo de bioprocesos

Numerosas aplicaciones se han desarrollado enfocadas en los campos de caracterización, análisis y monitoreo celular (Figura 4), tales aplicaciones van desde el desarrollo de sistemas de medición que permitan obtener las propiedades dieléctricas de una sola célula, hasta aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades. Sin embargo, una de las aplicaciones con más diversificación es la enfocada al monitoreo celular (Heileman, et al, 2013). Esto debido principalmente a su implicación en el monitoreo de los bioprocesos industriales.

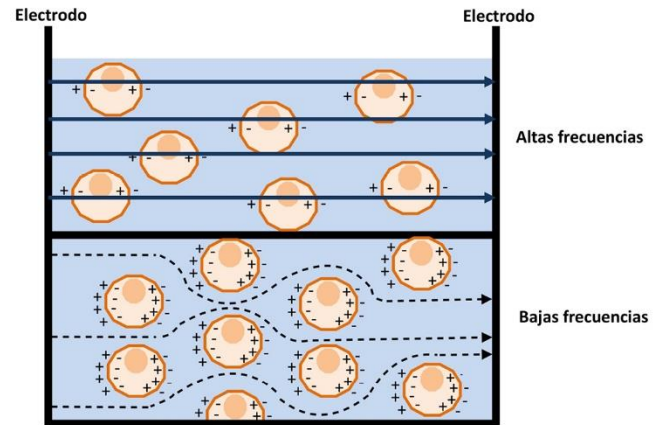


Figura 3. Diagrama del campo eléctrico aplicado entre dos electrodos a altas y bajas frecuencias. A altas frecuencias, las células se encuentran mínimamente polarizadas, por lo cual no representan una resistencia al paso de la corriente. A bajas frecuencias, las células se encuentran altamente polarizadas, por lo cual representan una resistencia al paso de la corriente que puede ser medida.

Actualmente la ED se ha empleado en el monitoreo de varios tipos de cultivos celulares. Algunos ejemplos destacables de su aplicación en cultivos de bacterias, hongos, células vegetales, células de insecto y células animales, se mencionan a continuación. En el cultivo de bacterias como *Bacillus* la

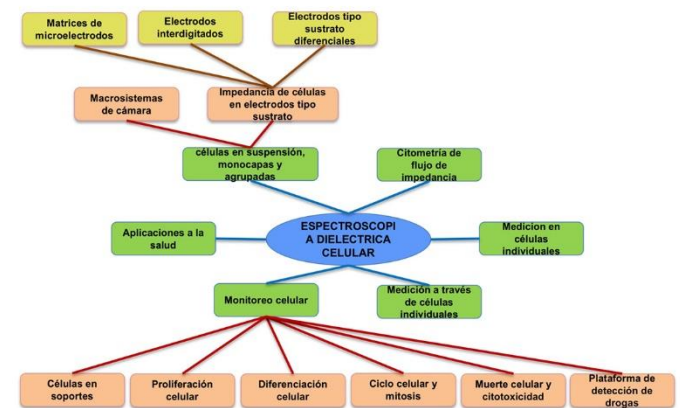


Figura 4. Aplicaciones de la espectroscopia dieléctrica asociadas a los campos de caracterización, análisis y monitoreo celular (Adaptado de Heileman, et al, 2013).

técnica ha permitido detectar en tiempo real los cambios fisiológicos ocurridos durante las fases de crecimiento (Sarrafzadeh, et al, 2005; Dinorín-Téllez-Girón, et al, 2015), siendo un paso importante para la caracterización de los procesos. En cultivos de hongos como las levaduras, la ED ha servido para estimar la concentración celular durante el proceso de fermentación (Harris, et al, 1987; Mishima, et al, 1991), siendo esta la meta de muchas otras técnicas de monitoreo. En el cultivo de células vegetales la técnica dieléctrica ha sido empleada en el monitoreo de los efectos de las condiciones de cultivo sobre las células, como la

sensibilidad a las fuerzas de corte debidas a la agitación (Markx, et al, 1991), permitiendo una rápida evaluación y replanteamiento de las condiciones de cultivo. En el cultivo de células de insecto la ED se ha empleado para la caracterización de algunos procesos como la producción de Vectores Adeno-Asociados, permitiendo la determinación del tiempo óptimo de cosecha, el cual es uno de los parámetros esenciales para el escalamiento de estos procesos (Negrete, et al, 2007). Y finalmente en el cultivo de células animales la técnica ha permitido obtener información de diversos procesos como el monitoreo en tiempo real de la diferenciación de células madre, el cual es crítico para el escalamiento de estas tecnologías (Bagnaninchi y Drummond, 2011). Otros procesos en que la técnica dieléctrica ha contribuido es en el monitoreo de biomasa en cultivos con células animales inmovilizadas, el cual es sumamente complicado empleando otras técnicas debido a que las células no se encuentra accesibles para su análisis, requiriendo primero el desprendimiento de estas de los sistemas de inmovilización (Noll y Biselli, 1998; Cole, et al, 2015). Una de las aplicaciones más destacables y recientes de la ED es en la producción de virus como el sarampión en cultivos de células cancerosas, ya que permitió la caracterización de las cinéticas de infección y la optimización de los tiempos de infección y cosecha (Grein, et al, 2017), parámetros necesarios para la producción de virus a mayor escala como tratamiento para el cáncer. Por estas y muchas otras aplicaciones la ED es considerada una herramienta prometedora para el monitoreo de bioprocesos, perfilándose como una PAT para su empleo en el monitoreo de procesos farmacéuticos y alimentarios a gran escala (Justice, et al, 2011; Teixeira, et al, 2009). Finalmente, en la Figura 5 se muestra un ejemplo de sistema empleado en el monitoreo dieléctrico de fermentaciones de *Bacillus*.



Figura 5. Ejemplo de sistema empleado para el monitoreo del cultivo por lote de *Bacillus* mediante espectroscopia dieléctrica.

3. CONCLUSIONES

Debido a que las propiedades dieléctricas de la membrana celular fungen como indicador de viabilidad, la espectroscopia

dieléctrica resulta una herramienta útil para el monitoreo de forma continua del estado y la concentración celular. Su empleo en cultivos celulares ha permitido obtener mayor información e incluso ha posibilitado la optimización de algunos procesos. Sin embargo, aún es necesaria la caracterización de muchos otros procesos mediante el empleo de esta técnica, por lo cual es preciso continuar con la investigación y aplicación de la técnica a diferentes tipos de procesos.

REFERENCIAS

- Ansorge, S., Esteban, G., and Schmid, G. 2009. Multifrequency permittivity measurements enable on-line monitoring of changes in intracellular conductivity due to nutrient limitations during batch cultivations of CHO cells. *Biotechnology Progress*. 26(1): 272-283. <http://doi.org/10.1002/btpr.347>
- Asami, K. 2002. Characterization of biological cells by dielectric spectroscopy. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 305: 268-277.
- Bagnaninchi, P. O., and Drummond, N. 2011. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(16): 6462-6467. <http://doi.org/10.1073/pnas.1018260108>
- Beutel, S., and Henkel, S. 2011. In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(6): 1493-1505. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3470-5>
- Biechele, P., Busse, C., Solle, D., Scheper, T., and Reardon, K. 2015. Sensor systems for bioprocess monitoring. *Engineering in Life Sciences*. 15(5): 469-488. <http://doi.org/10.1002/elsc.201500014>
- Bluma, A., Höpfner, T., Lindner, P., Rehbock, C., Beutel, S., Riechers, D., Scheper, T. 2010. In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398(6): 2429-2438. <http://doi.org/10.1007/s00216-010-4181-y>
- Cannizzaro, C., Güglerli, R., Marison, I., and von Stockar, U. 2003. On-line biomass monitoring of CHO perfusion culture with scanning dielectric spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*. 84(5): 597-610. <http://doi.org/10.1002/bit.10809>
- Carvell, J. P., and Dowd, J. E. 2006. On-line Measurements and Control of Viable Cell Density in Cell Culture Manufacturing Processes using Radio-frequency Impedance. *Cytotechnology*. 50(1-3): 35-48. <http://doi.org/10.1007/s10616-005-3974-x>
- Clementsitsch, F., and Bayer, K. 2006. Improvement of bioprocess monitoring: development of novel concepts. *Microbial Cell Factories*. 5(1): 19. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-5-19>
- Cole, H., Demont, A., and Marison, I. 2015. The Application of Dielectric Spectroscopy and Biocalorimetry for the Monitoring of Biomass in Immobilized Mammalian Cell Cultures. *Processes*. 3(2): 384-405. <http://doi.org/10.3390/pr3020384>
- Czermak, P., Pörtner, R., and Brix, A. 2009. Special Engineering Aspects. In *Cell and Tissue Reaction Engineering*. Edited by R. Eibl, D. Eibl, R. Pörtner, G. Catapano, and P. Czermak. Springer Berlin Heidelberg. pp. 83-172. http://doi.org/10.1007/978-3-540-68182-3_4
- Dinorín-Téllez-Girón, J., Delgado Macuil, R. J., Larralde Corona, C. P., Martínez Montes, F. J., de la Torre Martínez, M., and López-Y-López, V. E. 2015. Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(13): 5439-5450. <http://doi.org/10.1007/s00253-015-6562-9>

- FDA. 2004. Guidance for Industry PAT: A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. FDA Official Document, (September), 16. <http://doi.org/http://www.fda.gov/CDER/guidance/6419fnl.pdf>
- Fehrenbach, R., Comberbach, M., and Pêtre, J. O. 1992. On-line biomass monitoring by capacitance measurement. *Journal of Biotechnology*. 23(3): 303–314. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90077-M](http://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90077-M)
- Glasse, J., Gernaey, K. V., Clemens, C., Schulz, T. W., Oliveira, R., Striedner, G., and Mandenius, C.-F. 2011. Process analytical technology (PAT) for biopharmaceuticals. *Biotechnology Journal*. 6(4): 369–377. <http://doi.org/10.1002/biot.201000356>
- Grein, T. A., Schwebel, F., Kress, M., Loewe, D., Dieken, H., Salzig, D., Czermak, P. 2017. Screening different host cell lines for the dynamic production of measles virus. *Biotechnology Progress*. 33(4): 989–997. <http://doi.org/10.1002/btpr.2432>
- Harris, C. M., Todd, R. W., Bungard, S. J., Lovitt, R. W., Morris, J. G., and Kell, D. B. 1987. Dielectric permittivity of microbial suspensions at radio frequencies: a novel method for the real-time estimation of microbial biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 9(3): 181–186. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(87\)90075-5](http://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90075-5)
- Heileman, K., Daoud, J., and Tabrizian, M. 2013. Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis. *Biosensors and Bioelectronics*. 49: 348–359. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.017>
- Höber, R. 1912. Ein zweites Verfahren, die Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen. *Pflüger's Archiv Für Die Gesamte Physiologie Des Menschen Und Der Tiere*. 148(4–5): 189–221. <http://doi.org/10.1007/BF01680784>
- Horta, A. C. L., Silva, A. J. da, Sargo, C. R., Cavalcanti-Montaño, I. D., Galeano-Suarez, I. D., Velez, A. M., Zangirolami, T. C. 2015. On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: assessing the methodology for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 32(4): 821–829. <http://doi.org/10.1590/0104-6632.20150324s00003534>
- Impe, J. Van, and E., N. 2002. The tuning of a model-based estimator for the specific growth rate of *Candida utilis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 25(1): 1–12. <http://doi.org/10.1007/s004490100239>
- K'Owino, I. O., and Sadik, O. A. 2005. Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring. *Electroanalysis*. 17(23): 2101–2113. <http://doi.org/10.1002/elan.200503371>
- Kim, Y.-H., Park, J.-S., and Jung, H.-I. 2009. An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growth in a microbial fermentor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 138(1): 270–277. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2009.01.034>
- Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., and Eerikäinen, T. 2008. Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35(7): 657–665. <http://doi.org/10.1007/s10295-008-0346-5>
- Kiviharju, K., Salonen, K., Moilanen, U., Meskanen, E., Leisola, M., and Eerikäinen, T. 2007. On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 34(8): 561–566. <http://doi.org/10.1007/s10295-007-0233-5>
- Markx, G. H., ten Hoopen, H. J. G., Meijer, J. J., and Vinke, K. L. 1991. Dielectric spectroscopy as a novel and convenient tool for the study of the shear sensitivity of plant cells in suspension culture. *Journal of Biotechnology*. 19(2–3): 145–157. [http://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90055-Z](http://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90055-Z)
- Mishima, K., Mimura, A., Takahara, Y., Asami, K., and Hanai, T. 1991. On-line monitoring of cell concentrations by dielectric measurements. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 72(4): 291–295. [http://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90166-E](http://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90166-E)
- Mulchandani, A., and Bassi, A. S. 1995. Principles and Applications of Biosensors for Bioprocess Monitoring and Control. *Critical Reviews in Biotechnology*. 15(2): 105–124. <http://doi.org/10.3109/07388559509147402>
- Negrete, A., Esteban, G., and Kotin, R. M. 2007. Process optimization of large-scale production of recombinant adeno-associated vectors using dielectric spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(4): 761–772. <http://doi.org/10.1007/s00253-007-1030-9>
- Noll, T., and Biselli, M. 1998. Dielectric spectroscopy in the cultivation of suspended and immobilized hybridoma cells. *Journal of Biotechnology*. 63(3): 187–198. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00080-7](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00080-7)
- Olguín-Sánchez, R. A., Rojas-Rendón, J. A., Díaz-Campillo, M. J., and Salazar, Y. 2009. Monitorización del crecimiento de microorganismos en sistemas cerrados utilizando espectroscopia de impedancia eléctrica. (Spanish). *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 30(2): 98–108.
- Opel, C. F., Li, J., and Amanullah, A. 2010. Quantitative modeling of viable cell density, cell size, intracellular conductivity, and membrane capacitance in batch and fed-batch CHO processes using dielectric spectroscopy. *Biotechnology Progress*. 1187–1199. <http://doi.org/10.1002/btpr.425>
- Pethig, R., and Kell, D. B. 1987. The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Physics in Medicine and Biology*. 32(8): 933–70.
- Pohlscheidt, M., Charaniya, S., Bork, C., Jenzsch, M., Noetzel, T. L., and Luebbert, A. 2013. Bioprocess and Fermentation Monitoring. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. Edited by Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons, Inc. pp. 1471–1473. <http://doi.org/10.1002/9780470054581.eib606.pub2>
- Riley, M. 2006. Instrumentation and Process Control. In *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies (Biotechnology and Bioprocessing)*. Edited by O. Sadettin and H. Wei-Shou. CRC Press. 1st ed. pp. 249–298.
- Sanchis, A. 2009. Aplicación de la dielectroforesis a la caracterización dieléctrica de células. Universidad Complutense de Madrid.
- Sarrafzadeh, M. H., Belloy, L., Esteban, G., Navarro, J. M., and Ghommidh, C. 2005. Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*. 27(7): 511–517. <http://doi.org/10.1007/s10529-005-2543-x>
- Schwan, H. P. 1957. Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions. In *Advances in biological and Medical Physics*. Edited by J. Lawrence and C. Tobias. Academic Press Inc. pp. 147–209. <http://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3111-2.50008-0>
- Senner, A. 1994. Fundamentos de corriente alterna. In *Principios de electrotecnia*. Barcelona: Reverté. pp. 124–157.
- Teixeira, A. P., Oliveira, R., Alves, P. M., and Carrondo, M. J. T. 2009. Advances in on-line monitoring and control of mammalian cell cultures: Supporting the PAT initiative. *Biotechnology Advances*. 27(6): 726–732. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.003>
- Tibayrenc, P., Preziosi-Belloy, L., and Ghommidh, C. 2011. On-line monitoring of dielectrical properties of yeast cells during a stress-model alcoholic fermentation. *Process Biochemistry*. 46(1): 193–201. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.007>
- Yardley, J. E., Kell, D. B., Barrett, J., and Davey, C. L. 2000. On-Line, Real-Time Measurements of Cellular Biomass using Dielectric Spectroscopy. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 17(1): 3–36. <http://doi.org/10.1080/02648725.2000.10647986>