



## Online und In-situ Überwachung von Biotechnologischen Prozessen

Thomas Brückerhoff<sup>1</sup>, Jan-Gerd Frerichs<sup>1</sup>, Klaus Joeris<sup>2</sup>, Konstantin Konstantinov<sup>2</sup>, Thomas Scheper<sup>1</sup>

1) Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, Callinstr. 3, 30167 Hannover

2) Bayer Corporation, Dept. Of Cell Culture and Bioprocess Engineering, 800 Dwight Way, Berkeley, CA 94701, USA

### Konzept

Mikroskopische Methoden werden seit langem zur Überwachung von Fermentationsprozessen eingesetzt. Es wird eine Probe gezogen und anschließend werden Kultivierungsparameter wie z.B. Zellzahl und Zellvitalität offline bestimmt. Mit dem In-situ Mikroskop kann der Kultivierungsprozess direkt im Reaktor beobachtet werden. Eine in das In-situ Mikroskopie System integrierte Bildverarbeitung erlaubt es, in-situ aufgenommene Bilder mit minimaler Zeitverzögerung auszuwerten und Prozessparameter wie z.B. die Zellzahl online zu bestimmen. Die Prozessparameter können von einer Prozessregelung ohne Zeitverzögerung abgerufen werden.

Das In-situ Mikroskopie System besteht aus dem In-situ Mikroskop, einem Mikrocontroller, einem PC mit Framegrabber, einer Bildverarbeitungssoftware und einer Steuerungssoftware für die Ansteuerung des Mikroskops (Abbildung 1). Zusammen mit dem Framegrabber und einer CCD-Kamera bildet das In-situ Mikroskop die Bildaufnahmeeinheit. Der Framegrabber digitalisiert das analoge Signal der CCD-Kamera und die digitalisierten Daten werden dann von der Bildverarbeitung ausgewertet.



Abbildung 1: In-situ Mikroskop und Zubehör

Das In-situ Mikroskop wird in einem 25 mm Standard-Port am Bioreaktor eingesetzt. Die optischen Komponenten des Mikroskops werden vor dem Autoklavieren entfernt und anschließend wieder in das System integriert. Die Sterilität des Bioprozesses wird durch diesen Vorgang nicht beeinträchtigt. Das Objektiv befindet sich in dem inneren Tubus des In-situ Mikroskops (Abbildung 3).

Ein spezieller Rückziehmehanismus erlaubt es das Mikroskop soweit aus dem Reaktor zu entfernen, dass ein Austausch des Objektivs während der Kultivierung durchgeführt werden kann. Das Beleuchtungssystem des In-situ Mikroskops ist hinter dem Objektivträger untergebracht (Abbildung 3). Durch die Anordnung von LED und Kondensator ist eine homogene Bildausleuchtung realisiert. Die Abbildung 2 zeigt zwei mit unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommene in-situ Bilder von Tierzellen.

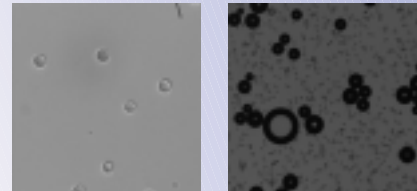


Abbildung 2: In-situ Aufnahmen von CHO Zellen, links 400x Vergrößerung, rechts 80x Vergrößerung. Die schwarz umrandeten Bereiche sind Luftblasen.

### Die Probenahmezone

Eine optimale Bildqualität ist durch eine neu entwickelte variable Durchflussprobenahmezone realisiert worden (Abbildung 3). Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger wird über einen Schrittmotor eingestellt, der mit dem äußeren Tubus verbunden ist. Über einen zweiten Schrittmotor wird der innere Tubus mit integriertem Objektiv bewegt.

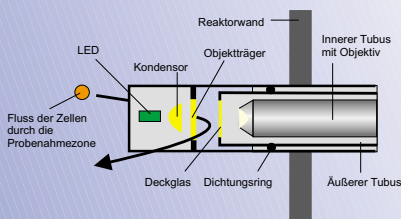


Abbildung 3: Die Probenahmezone des In-situ Mikroskops

### Bildverarbeitung

Die Abbildung 4 veranschaulicht die Bildverarbeitung für Hefezellen und die Integration dieser in die Prozessregelung. Zunächst werden mit einer Filter-Operation die Helligkeitsmaxima des defokussiert aufgenommenen Ursprungsbildes verstärkt. Mit einem Maximum Likelihood Verfahren wird nun der optimale Schwellwert des Bildes ermittelt. Anhand dieses Schwellwertes wird das Bild in zwei Typen von Pixeln unterteilt: 0 = schwarz; 255 = weiß. Im nächsten Schritt (region growing) werden benachbarte Pixel mit dem gleichen Grauwert zu globalen Regionen zusammengefasst. Die globalen Regionen werden gelabelt und anschließend bezüglich Größe und Form separat untersucht. Artefakte werden eliminiert. Das Ergebnisbild wird mit dem Ursprungsbild verglichen und als Resultat werden Anzahl der Einzelzellen, Doppelzellen, Zellcluster ausgegeben. Anhand dieser Informationen werden Kultivierungsparameter wie z.B. Biotrockenmasse und Zellgrößenverteilung online zugänglich. Über eine Regeleinheit werden die Kultivierungsparameter wie z.B. Substratkonzentration optimiert.

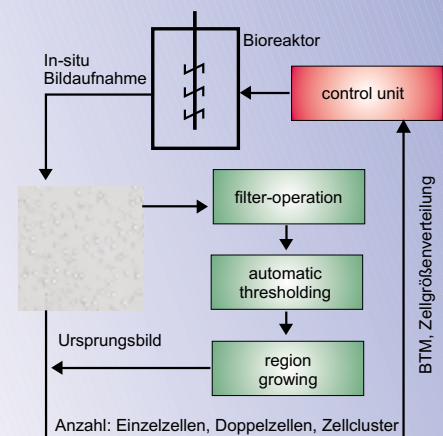


Abbildung 4: Integration der Bildverarbeitung für Hefezellen in die Prozessregelung

### Experimentelles

In einem 3 L Bioreaktor wurde die Hefekonzentration in definierten Schritten erhöht. Abbildung 5 zeigt den linearen Zusammenhang zwischen den In-situ Mikroskop Werten (Zellen pro Bild) und der Zellzahl ermittelt mit der Neubauer-Kammer. Das In-situ Mikroskop wurde weiter zur Überwachung einer CHO Kultivierung in einem 5 L Perfusionsreaktor eingesetzt. Die Zellzahlen bestimmt mit dem In-situ Mikroskop und mit dem Cedex-System (Innovatis, Bielefeld) als Referenz korrelieren sehr gut.

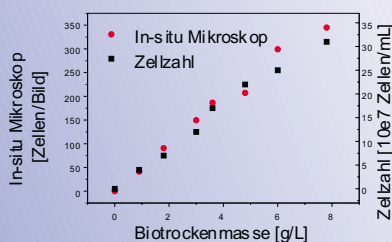


Abbildung 5: Linearer Zusammenhang Neubauer-Kammer und In-situ Mikroskopie

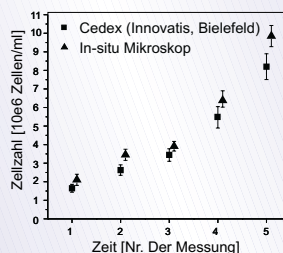


Abbildung 6: Zelldichte während einer Tierzellkultivierung, bestimmt durch In-situ Mikroskopie und das Cedex-System

### Fazit

Die mit dem In-situ Mikroskop erhaltenen Ergebnisse korrelieren sehr gut mit klassischen Methoden wie z.B. die Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Kammer oder mit dem Cedex-System. Probenahme entfällt und ein Bypass ist nicht nötig. Subjektive Einflüsse des Laborpersonals können als Fehlergröße ausgeschlossen werden. In Kombination mit einer adäquaten Bildverarbeitung ist es möglich, alle signifikanten Parameter über die Kultivierung online zu erhalten. Eine komplette Automation des Bioprozesses kann somit erreicht werden. In Kombination mit speziellen mathematischen Methoden, wie z.B. dem kontinuierlich-diskreten erweiterten Kalman-Filter (EKF), kann eine weitere Optimierung der Bioprozesse erreicht werden. Anhand von Langzeitversuchen konnte gezeigt werden, dass auch über lange Zeiträume die Sterilität der überwachten Prozesse nicht beeinflusst wird. Aufgrund des modularen Aufbaus des In-situ Mikroskops und der übersichtlich angeordneten Bedienersoftware ist das System anwenderfreundlich.