

Entwicklung von In-situ- und Durchfluss-Mikroskopen für die Bioprozesstechnik

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Andreas Prediger
geboren am 15.01.1985 in Hannover

Hannover, 2013

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Korreferent: Prof. Dr. Detlef Bahnemann
Tag der Promotion: 03.06.2013

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ferner versichere ich, dass die Dissertation nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsleistung verwendet worden ist.

Hannover, März 2013

Andreas Prediger

Danksagung

Ich danke Prof. Thomas Scheper für die Möglichkeit zur Promotion am TCI und das entgegengebrachte Vertrauen. Insbesondere die internationalen Erfahrungen waren für mich eine besondere Motivation. Bei Prof. Detlef Bahnemann bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Weiter danke allen, die im Rahmen von Kooperationsprojekten an meiner Promotion beteiligt waren. Vom Institut für Technische Biokatalyse an der TU Hamburg-Harburg danke ich Britta Lämmerhirt, Dr. Jakob Müller und Prof. Andreas Liese für die fruchtbare Zusammenarbeit bei den Projekten zu den Lewatit-Partikeln und dem Cellulose-Abbau. Josef Rudolph und seinem Laborteam von der Lanxess Deutschland GmbH danke ich für die gemeinsame Zeit in Uerdingen und die spannenden Einblicke in industrielle Prozessabläufe.

I wish to thank all of my international cooperation partners in Turkey, Israel and the USA. The experiences I had in your countries as well as working with you have been highlights of the last years. In particular I wish to thank Mihriban Akin, Merve Yüksel, Suna Timur, Michal Nudel and Neha Shah for making my time abroad more than just business trips.

Meinen TC-Kollegen danke ich für das gute Miteinander während der Arbeit und die darüber hinausgehenden Aktivitäten und Freundschaften. Besonderer Dank gilt allen die sich mit ihrem Einsatz ins ISM-Team eingebracht haben: Dr. Arne Bluma, Tim Höpfner, Alexander Babitzky, Daniel Marquard, Bernd Tscheschke und Christian Lüder. Den Werkstätten und besonders Feinmechanikermeister Friedbert Gellermann danke ich für die Umsetzung meiner ISM-Ideen. Dr. Sascha Beutel, Dr. Patrick Lindner und Ferdinand Rüdinger danke ich für die Unterstützung während der Promotion und für die gute Zeit während unserer gemeinsamen Dienstreisen. Außerdem danke ich dem VE Team für die Chance zur Mitarbeit im Bereich „Qualitätsmanagement“, Büro 162 für die Zitate der Woche und dem AK Hitzmann für die Dauerleihgabe Worf.

Meinen Eltern und Laura Petersen danke ich für den Rückhalt, ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen, die mir in meiner Studien- und Promotionszeit viel geholfen haben.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung von In-situ- und Durchfluss-Mikroskopen für den Einsatz in der Bioprozesstechnik.

Zu Beginn wird der Stand der Technik beschrieben und das In-situ-Mikroskop (ISM) III-XTF vorgestellt. Erfolgreiche Anwendungen dieses ISM werden beschrieben und Optimierungsmöglichkeiten für die Optik des Mikroskops aufgezeigt. Auf dieser Grundlage wird das ISM weiterentwickelt. Als Anwendungsbeispiel kommt das optimierte ISM für die Untersuchung der mechanischen Stabilität von Lewatit-Partikeln zum Einsatz.

Da nicht alle im Betrieb auftretenden Probleme durch die Optimierung der Optik gelöst werden können, wird ein neuer ISM-Prototyp entwickelt, der als Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop mit Unendlich-Optik eingesetzt werden kann. Neben der Optik wird auch die Mechanik des Mikroskops vollständig neu gestaltet. Durch eine Weiterentwicklung der ISM-Steuersoftware und der Anschlussmöglichkeit des Mikroskops über USB-Schnittstellen wird die Bedienung darüber hinaus benutzerfreundlicher gestaltet. Im Anschluss an die Charakterisierung des neuen ISM-Prototypen wird durch die Überwachung enzymatischer Abbauprozesse von Cellulose und *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellkultivierungen das Anwendungspotential demonstriert. Hierbei werden Methoden verwendet, die in dieser Form mit dem vorherigen Messsystem nicht möglich gewesen wären. Dabei wird ebenfalls auf die hierfür neu entwickelten Bildverarbeitungsalgorithmen eingegangen.

Des Weiteren wird die Entwicklung eines Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops (DFFM) für die automatisierte Bioprocessüberwachung vorgestellt. Der DFFM-Prototyp arbeitet, wie der neue ISM-Prototyp, im Durchlicht-Hellfeld-Betrieb mit Unendlich-Optik. Die Eigenschaften des DFFM-Prototypen werden charakterisiert und die Eignung des Systems zur Detektion von Fluoreszenz anhand der Untersuchung von Fluorescein-Lösungen demonstriert. Für die Analyse von CHO-Zellen wird ein Bildverarbeitungsalgorithmus entwickelt. Dieser kommt zum Einsatz, um durch die Untersuchung von CHO-Zellkultivierungen die Verwendung des DFFM als Fluoreszenzmikroskop zu veranschaulichen.

Schlagwörter: In-situ-Mikroskopie, Durchfluss-Mikroskopie, Bioprocessüberwachung, Bildverarbeitung

Abstract

The development of in situ and flow microscopes for biotechnological applications is described in this thesis.

First the state of the art and the in situ microscope (ISM) version III-XTF are presented. Successful applications of this ISM are discussed and optimization possibilities for the optics of the microscope are considered. On this basis the system is refined. As an application example the optimized ISM is used for the investigation of the mechanical stability of lewatin particles.

Not all of the encountered problems can be solved with the optimization of the microscope optics. Therefore a new ISM prototype is developed. This prototype features transmitted light brightfield microscopy using infinite optics. The mechanics of the microscope are completely redesigned as well. The further development of the controlling software for the ISM and the option to connect the whole microscope to a computer via USB-interface makes the operation of the microscope radically more user-friendly. The properties of the new prototype are characterized and subsequently enzymatic degradation processes of cellulose and Chinese Hamster Ovary (CHO) cell cultivations are monitored to demonstrate the enhanced application possibilities. Monitoring methods that would not have been possible with previous measurement systems are implemented. Image processing algorithms designed for the analysis of the described processes are also presented.

Moreover, the development of a prototype fluorescence flow microscope for automated bioprocess monitoring is described. As the new ISM prototype the acquisition mode used is transmitted light brightfield microscopy with infinite optics. The properties of this flow microscope are characterized and the capability of the prototype to detect fluorescence is demonstrated by the analysis of fluorescein solutions. Furthermore image processing algorithms for the analysis of CHO cells are developed. This is used for in the investigation of CHO cell cultivations to demonstrate the capabilities of the measurement system in fluorescence microscopy.

Keywords: In situ microscopy, flow microscopy, bioprocess monitoring, image processing

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	1
Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
2 Zielsetzung	6
3 In-situ-Mikroskopie	7
3.1 Entwicklung der In-situ-Mikroskopie.....	7
3.2 Kurzbeschreibung des ISM III-XTF	7
3.3 Modifikationen für Durchfluss-Anwendungen	9
3.4 Anwendungsbeispiele.....	10
3.4.1 Tierzellkultivierung.....	10
3.4.2 Microcarrier.....	10
3.4.3 Kristallisationen.....	12
3.4.4 Hefekultivierungen	13
3.4.5 Cellulose	13
3.5 Optimierungspotential	14
4 Optimierung des ISM III-XTF	16
4.1 Aufbau der neuen Objektive.....	16
4.1.1 Endlich-Objektiv	16
4.1.2 Unendlich-Objektiv.....	18
4.2 Untersuchung der mechanischen Stabilität von Enzymträgern.....	19
4.3 Bildverarbeitungssoftware <i>ParticleAnalyzer</i>	20
4.4 Optimierung der Messzonentiefe	21
4.5 Einfluss der Rührgeschwindigkeit	22
4.6 Einfluss des Dispersionsmittels	24
4.7 Bestimmung der Partikelgrößen-Dichteverteilung.....	25
4.7.1 Vergleich mit Laserbeugungsspektroskopie	27
4.8 Zwischenfazit	29
5 Entwicklung eines neuen In-situ-Mikroskop-Prototypen	30
5.1 Aufbau des ISM-TT	30
5.2 Steuersoftware <i>InsituControl</i>	32
5.3 Charakterisierung des Mikroskops.....	33
5.3.1 Optische Eigenschaften	33
5.3.2 Thermische Belastbarkeit.....	35
5.4 Überwachung enzymatischer Abbauprozesse von Cellulose	36

5.4.1	Untersuchtes Substrat und verwendete Enzyme.....	37
5.4.2	Entwicklung des <i>CelluloseAnalyzer</i> Algorithmus	38
5.4.3	Versuchsaufbau.....	41
5.4.4	Referenzmessung ohne Enzymzugabe.....	42
5.4.5	Enzymatische Hydrolyse mit Rohament CL.....	44
5.4.6	Enzymatische Hydrolyse mit Ecostone C1	46
5.4.7	Vergleich mit Laserbeugungsspektroskopie	47
5.5	Überwachung von CHO-Zellkultivierungsprozessen.....	51
5.5.1	Entwicklung des <i>CHOAnalyzer</i> Algorithmus	51
5.5.2	Überwachung der Zelldichte von CHO-Zellkultivierungen	54
5.5.3	Optimierte Überwachung der Zelldichte von CHO-Zellkultivierungen.....	57
5.5.4	Untersuchung von Hochzelldichte-Kultivierungen von CHO-Zellen....	58
5.5.5	Untersuchung von Zellmorphologie und Zellviabilität.....	64
5.6	Zwischenfazit	65
6	Entwicklung eines Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops	68
6.1	Aufbau des Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops	69
6.2	Steuersoftware.....	71
6.3	Optimierung des Strahlengangs.....	72
6.4	Charakterisierung des Mikroskops.....	74
6.4.1	Optische Eigenschaften.....	74
6.4.2	Eignungstest für Fluoreszenzuntersuchungen	76
6.5	Untersuchung von CHO-Zellkultivierungsprozessen	78
6.5.1	Entwicklung des <i>DFFMAnalyzer</i> Algorithmus.....	79
6.5.2	Zelldichte- und Viabilitätsmessungen	82
6.6	Zwischenfazit	84
7	Zusammenfassung und Ausblick.....	86
8	Literaturverzeichnis	89
8.1	Online-Quellen	93
9	Anhang.....	94
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	94
9.2	Liste der an dieser Arbeit beteiligten Personen und Institutionen.....	95
9.3	Technische Daten der verwendeten Kameras.....	96
9.4	Aufnahme-Eigenschaften der Mikroskope	96
9.5	Material und Methoden.....	97
9.6	Lebenslauf	106
9.6.1	Im Rahmen der Promotion entstandene Publikationen	107

1 Einleitung

Die Biotechnologie gilt als Schlüsseltechnologie für die Herausforderungen des 21. Jahrhunderts. Tatsächlich sind biotechnologische Produkte aus unserem Alltag bereits heutzutage nicht mehr weg zu denken: In Nahrungsmitteln finden sich Aromastoffe aus Pilzen, dem Benzin wird Bioethanol beigemischt und viele neue Pharmazeutika werden mithilfe von Zellkulturen produziert [Online 1, Online 2].

Der zentrale Schritt mit dem ein biotechnologisches Produkt hergestellt wird ist der Bioprozess. Hierbei werden Rohstoffe mithilfe von Enzymen, Mikroorganismen oder Zellkulturen zum gewünschten Produkt umgesetzt. Da Zellen und Enzyme sensitiv auf Veränderungen in der Prozessumgebung reagieren, werden hierfür Bioreaktoren verwendet, um kontrollierte Prozessbedingungen gewährleisten zu können. Als Bioreaktoren kommen klassischerweise gerührte Stahlkessel zum Einsatz, wobei besonders in der pharmazeutischen Industrie in den letzten Jahren ein Trend zu Einweg-Bioreaktoren aus Plastik zu beobachten ist [Eibl et al., 2010]. Um eine Regelung der Prozessbedingungen zu ermöglichen, müssen sie mit geeigneten Sensoren überwacht werden.

Durch die *Process Analytical Technology*-Initiative der *U.S. Food and Drug Administration*, ist das Interesse der pharmazeutischen Industrie an Sensoren zur Überwachung von Bioprocessen weiter gestiegen. Die Initiative zielt darauf ab das Verständnis von biotechnologischen Herstellungsprozessen zu erhöhen und die Produktqualität sicherzustellen. Hierfür müssen kritische Prozessvariablen möglichst in Echtzeit gemessen werden. Dies ist nur mit Sensoren möglich, die automatisiert im Reaktor messen können. Da diese Sensoren dort messen wo der biotechnologische Prozess stattfindet, werden sie als In-situ-Sensoren (in-situ = lat. für "am Platz") bezeichnet. Beinahe-Echtzeitanalysen können mit Sensoren, die über ein automatisches Probenahmesystem an den Bioreaktor angekoppelt sind, durchgeführt werden. Da sich die Sensoren hierbei außerhalb des Bioreaktors befinden, spricht man von Ex-situ-Sensoren [Hitzmann et al., 2011].

In-situ-Sensoren für die Überwachung des pH-Werts, des pO_2 -Werts und physikalischer Prozessgrößen wie Temperatur und Druck gehören heutzutage zum Standard industrieller Bioprocesses [Hitzmann et al., 2011]. Die In-situ-Überwachung der Biomasse stellt hingegen noch immer eine Herausforderung dar. Eine Möglichkeit ist die indirekte Analyse durch die Untersuchung von Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften der Kultivierungsbrühe. Mögliche Methoden sind beispielsweise die Raman-[Lee et al., 2004], NIR-[Kiviharju et al., 2007] und 2D-Fluoreszenzspektroskopie [Horvath et al., 1993]. Eine direkte In-situ-Überwachung

der Biomasse ist mit Trübungssonden [Sonnleitner et al., 1992], Kapazitätssonden [Neves et al., 2000] und mit In-situ-Mikroskopen möglich. Mittels In-situ-Mikroskopie ist es darüber hinaus möglich neben der Biomassekonzentration zusätzlich Prozessinformationen über die Zellgrößenverteilung und die Zellmorphologie zu erhalten.

Das Messprinzip der In-situ-Mikroskopie basiert darauf ein funktionsfähiges Mikroskop mit einer angeschlossenen Kamera in einen Bioreaktor zu integrieren. Auf diese Weise können Bilder direkt aus dem Reaktorinneren aufgenommen und das Bildmaterial im Anschluss mit geeigneter Computersoftware ausgewertet werden. Der maximale Durchmesser der Mikroskopsonde wird dabei durch den Reaktorport beschränkt.

Um dies zu umgehen kann die Ex-situ-Variante der Technologie verwendet werden. Bei der Durchflussmikroskopie werden automatisiert Proben aus einem Bioreaktor entnommen und durch die Messkammer eines Mikroskops gepumpt. Da hierbei der Sensor nicht in den Bioreaktor integriert werden muss, wird die Optik des Mikroskops nicht durch den Durchmesser eines Reaktorports beschränkt.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen verschiedene Ansätze zur Entwicklung von In-situ- und Durchfluss-Mikroskopen für den Einsatz in der Bioprozesstechnik vorgestellt werden. Hierfür müssen zuerst Stärken und Schwächen des modernsten, zu Beginn der Arbeit zur Verfügung stehenden, ISM analysiert werden. Anhand der Ergebnisse soll das bestehende System optimiert werden.

Auftretende Betriebsprobleme, die nicht durch eine Optimierung des bestehenden Systems gelöst werden können, sollen durch eine vollständige Neugestaltung eines ISM gelöst werden. Hierbei sollen Optik, Mechanik, Bedienelemente und Anschlussmöglichkeiten des neuen ISM optimiert werden. Schließlich soll ein weiteres Mikroskop, das für Fluoreszenzuntersuchungen an Zellen geeignet ist, entwickelt werden.

Alle entwickelten Mikroskope sollen in aktuellen Forschungsarbeiten aus der Bioprozesstechnik exemplarisch zum Einsatz kommen, um die Anwendungsmöglichkeiten zu demonstrieren sowie Stärken und Schwächen der neuen Mikroskope zu bestimmen. Die Entwicklung der hierfür erforderlichen Bildverarbeitungsalgorithmen soll ebenfalls beschrieben werden.

3 In-situ-Mikroskopie

In diesem Abschnitt wird der Stand der Technik im Bereich der In-situ-Mikroskopie dargestellt. Insbesondere wird das verwendete ISM III-XTF beschrieben und Anwendungsbeispiele aus der Bioprozesstechnik vorgestellt.

3.1 Entwicklung der In-situ-Mikroskopie

Die Entwicklung des ersten ISM wurde 1991 für die Überwachung von Zellkultivierungsprozessen beschrieben [Suhr et al., 1991]. Seitdem wurde das Konzept in mehreren Schritten weiterentwickelt [Bittner, 1994; Bittner et al., 1998; Joeris et al., 2002; Frerichs et al., 2002; Brückerhoff, 2006]. Das in dieser Arbeit verwendete ISM III-XTF ist im Detail bei Rudolph beschrieben [Rudolph, 2007].

3.2 Kurzbeschreibung des ISM III-XTF

Das ISM III-XTF ist ein Durchlicht-Hellfeld-Mikroskop mit Endlich-Optik. Objektive mit Abbildungsmaßstäben von 4-fach bis 20-fach stehen zur Verfügung. Damit können Objekte mit Durchmessern zwischen 1 μm und 400 μm aufgenommen werden.

Das ISM ist in zwei Segmente gegliedert. Das untere Segment stellt eine autoklavierbare Sonde dar, die in Bioreaktoren über einen 25 mm Port integriert werden kann. In den Außentubus der Sonde ist am unteren Ende ein breiter Schlitz eingelassen, der die Messzone des Mikroskops bildet. Für Messungen muss diese Messzone ins Prozessmedium eintauchen. Begrenzt wird die Messzone durch zwei Saphirglasscheiben. Die Messzontiefe kann in Schritten von 1,25 μm eingestellt werden und maximal 6 mm erreichen. Weiter unten befindet sich die Beleuchtungseinheit bestehend aus einer LED und einer Kondensorlinse.

Das obere Segment des ISM besteht aus zwei verfahrbaren, kreuzroll-gelagerten Linearschlitten, durch die sowohl die Tiefe der Messzone, als auch die Position des Objektivtubus variiert werden kann. Die Linearschlitten werden durch Schrittmotoren gesteuert. Verschiedene CCD-Kameras können für die Bildaufnahme in dieses Segment eingesetzt werden. In Abb. 1 ist der schematische Aufbau des ISM zu sehen.

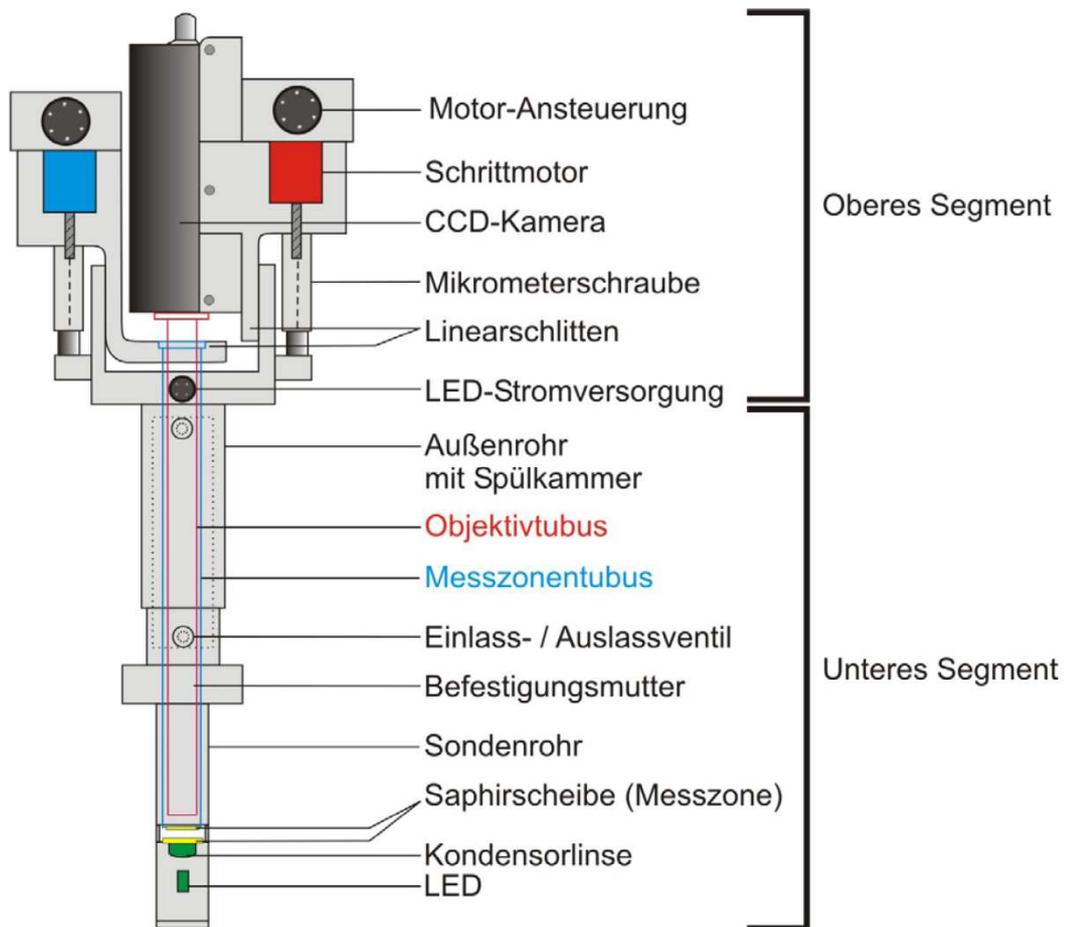


Abb. 1: Schematischer Aufbau des ISM III-XTF. Quelle: [Rudolph, 2007].

Die Ansteuerung des Systems wird über die Software *InsituControl* realisiert, deren Entwicklung bei Lindner beschrieben ist. Sie erlaubt die Steuerung der LED-Intensität, der Lineartischmotoren und verschiedener CCD-Kameras [Lindner, 2006].

Das Messprinzip des Mikroskops ist, dass die zu überwachenden Objekte durch die im Reaktor herrschende konvektive Strömung kontinuierlich durch die Messzone transportiert werden. Dort können sie mit der Kamera aufgenommen werden. Durch Bildverarbeitungsalgorithmen können nun die Anzahl der Objekte und Eigenschaften wie ihre Größe und Morphologie direkt berechnet werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass das in der Messzone überwachte Volumen in seiner Zusammensetzung dem Inhalt des Reaktors entspricht.

3.3 Modifikationen für Durchfluss-Anwendungen

Voraussetzung für die Verwendung des ISM III-XTF ist, dass ein 25 mm Standardport für die Integration des ISM in den Reaktor vorhanden ist. Diese Voraussetzung ist in kleinen Bioreaktoren oftmals nicht gegeben, wodurch der Einsatz des ISM limitiert ist.

An diesem Punkt setzt die Entwicklung eines Durchfluss-Systems an, das auf dem ISM III-XTF basiert. Hierfür wird das untere Segment des ISM in eine Durchflusszelle eingefasst. Dadurch kann das Mikroskop nun in Fließanalysensysteme oder den Bypass eines Reaktors eingebaut werden [Rehbock, 2009; Rehbock et al., 2010]. In Abb. 2 ist ein Schema der Durchflusszelle zu sehen.

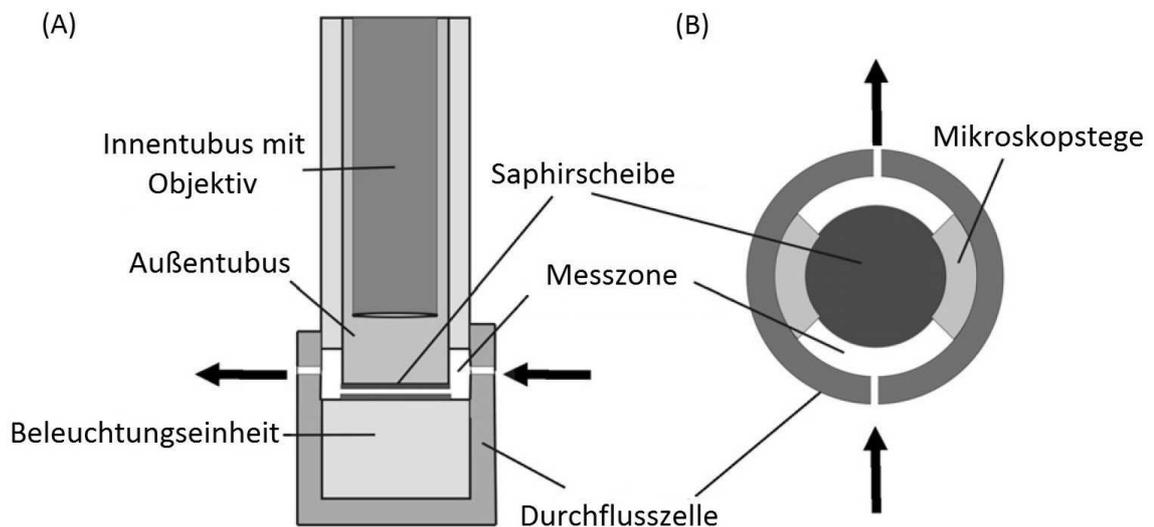


Abb. 2: Schema der Durchflusszelle: (A) Seitenansicht, (B) Aufsicht. Quelle: [Rehbock, 2009].

Der Einsatz dieses Mikroskops in Fließanalysensystemen eröffnet neue Anwendungsgebiete. Im Vergleich zum ISM III-XTF können höhere Zelldichten analysiert werden, da Verdünnungsschritte einfach zu realisieren sind. Zellfarbstoffe (z.B. Trypanblau) können verwendet werden, um Viabilitätsstudien an den Zellen durchzuführen. Weitere Sensoren können mit Durchfluss-Mikroskopen im Fließanalysensystem kombiniert werden, um multifunktionelle Analysensysteme zu entwickeln [Akin et al., 2011].

3.4 Anwendungsbeispiele

Das ISM III-XTF wurde bereits zur Überwachung von diversen biotechnologischen Prozessen verwendet, die im Folgenden vorgestellt werden.

3.4.1 Tierzellkultivierung

Therapeutische Proteine werden hauptsächlich in Tierzelllinien produziert, da diese im Gegensatz zu Bakterien und niederen Eukaryoten in der Lage sind posttranslationalen Modifikationen an den Proteinen durchzuführen. Nachteile der Kultivierung von Tierzellen sind niedrige Proliferationsraten und hohe Kontaminationsrisiken. Die Kulturen müssen überwacht werden, um die ablaufenden Prozesse verstehen und beurteilen zu können. Eine manuelle Probenahme und die anschließende offline Analyse der Daten sind zeitaufwändig, liefern die Ergebnisse zeitverzögert und erhöhen das Kontaminationsrisiko. Daher sind automatisierbare und nicht-invasive Möglichkeiten zur Überwachung der Zellkulturen wünschenswert.

Das ISM III-XTF kann verwendet werden, um Daten aus laufenden Tierzellkultivierungsprozessen zu liefern. Dabei können Informationen über die Zelldichte, Zellgröße und die Zellmorphologie gewonnen werden. Auch mikrobielle Kontaminationen können frühzeitig erkannt werden. Das ISM III-XTF wurde bereits für die Überwachung von *Chinese Hamster Ovary* (CHO)- und *Baby Hamster Kidney* (BHK)-Zellkultivierungen eingesetzt [Martinez et al., 2005; Martinez et al., 2008; Prediger, 2010; Tschesche, 2011].

3.4.2 Microcarrier

In industriellen Prozessen werden Tierzellen zumeist in Suspension kultiviert. Wenn dies nicht möglich ist können Microcarrier verwendet werden, um die Fläche, auf der die Zellen wachsen können, zu vergrößern. Diese Methode kann verwendet werden, um auch mit adhärent wachsenden Zellen hohe Zelldichten und damit hohe Produktivität zu erreichen [van der Velden-de Groot, 1995]. Die Standardmethode, um das Wachstum dieser Zellen zu untersuchen, ist, sie von den Trägern zu lösen und in einem Hämozytometer zu zählen. Diese manuelle Technik ist extrem zeitaufwändig und liefert die Ergebnisse zeitverzögert [Mered et al., 1980; Sanford et al., 1951].

Stattdessen kann das ISM III-XTF verwendet werden, um den Grad des Zellbewuchses auf den Microcarriern zu verfolgen [Rudolph, 2007; Rudolph et al., 2008]. Allerdings müssen für diese Methode transparente Microcarrier, wie z.B. Cytodex 1 (Amersham, Uppsala, Schweden) verwendet werden. Abb. 3 zeigt Bilder von NIH-

3T3 Fibroblasten aus der Maus, die auf Cytodex 1 Microcarriern wachsen. Gezeigt werden Bilder von verschiedenen Stadien einer batch-Kultivierung.

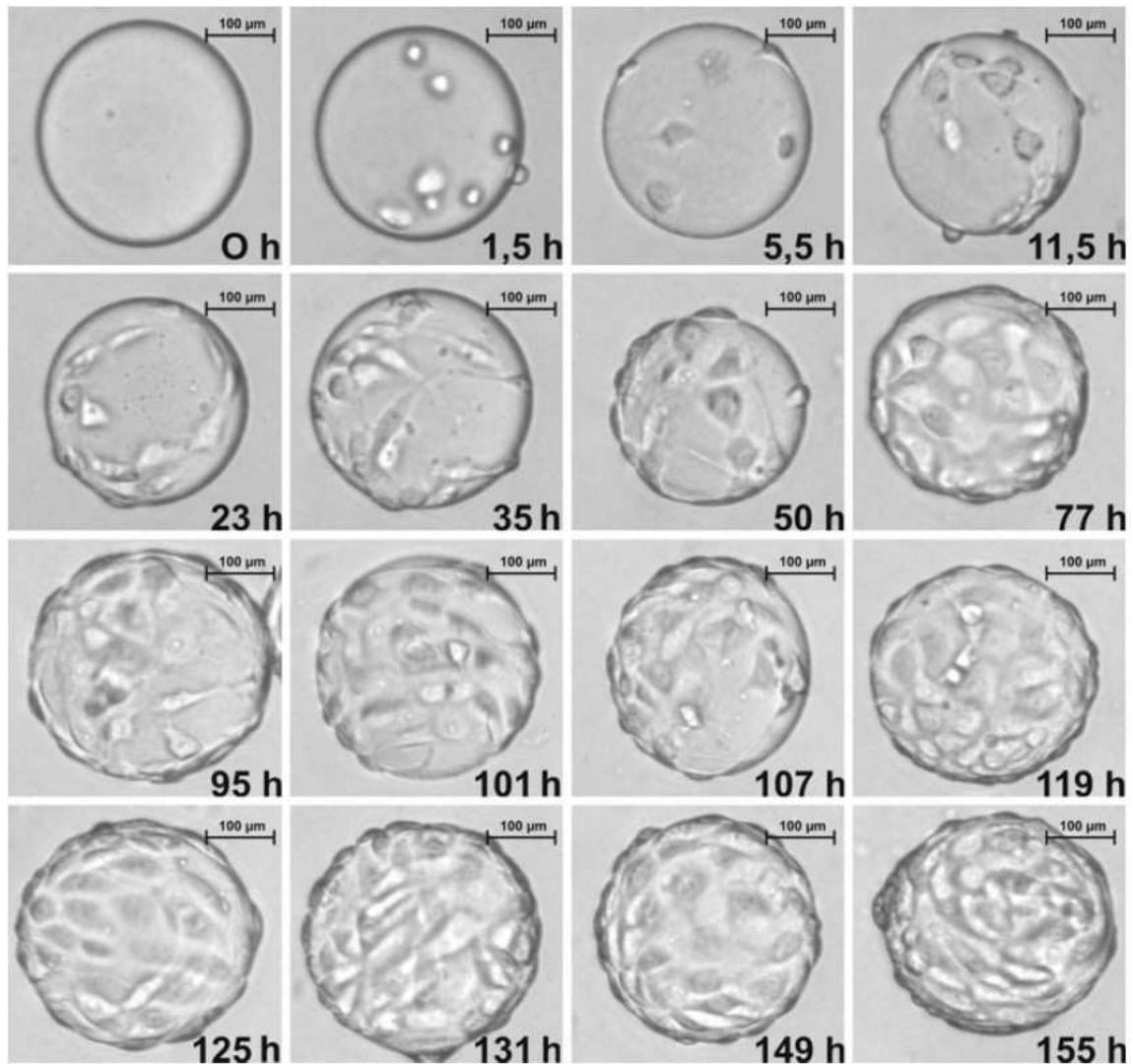


Abb. 3: Auf Cytodex-1 wachsende Fibroblasten Quelle: [Bluma et al., 2010].

Der für diese Anwendung entwickelte Bildverarbeitungsalgorithmus errechnet den Bewuchsgrad der Microcarrier auf der Grundlage eines neuronalen Netzwerkes [Lindner, 2006; Rudolph, 2007].

3.4.3 Kristallisationen

Kristallisationsprozesse stellen eine wichtige Verfahrensstufe in der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie dar. Für die nicht-invasive Überwachung dieser Prozesse kann das ISM III-XTF verwendet werden. Eine Zusammenstellung von Kristallen, die mit dem ISM aufgenommen wurden, ist in Abb. 4 dargestellt.

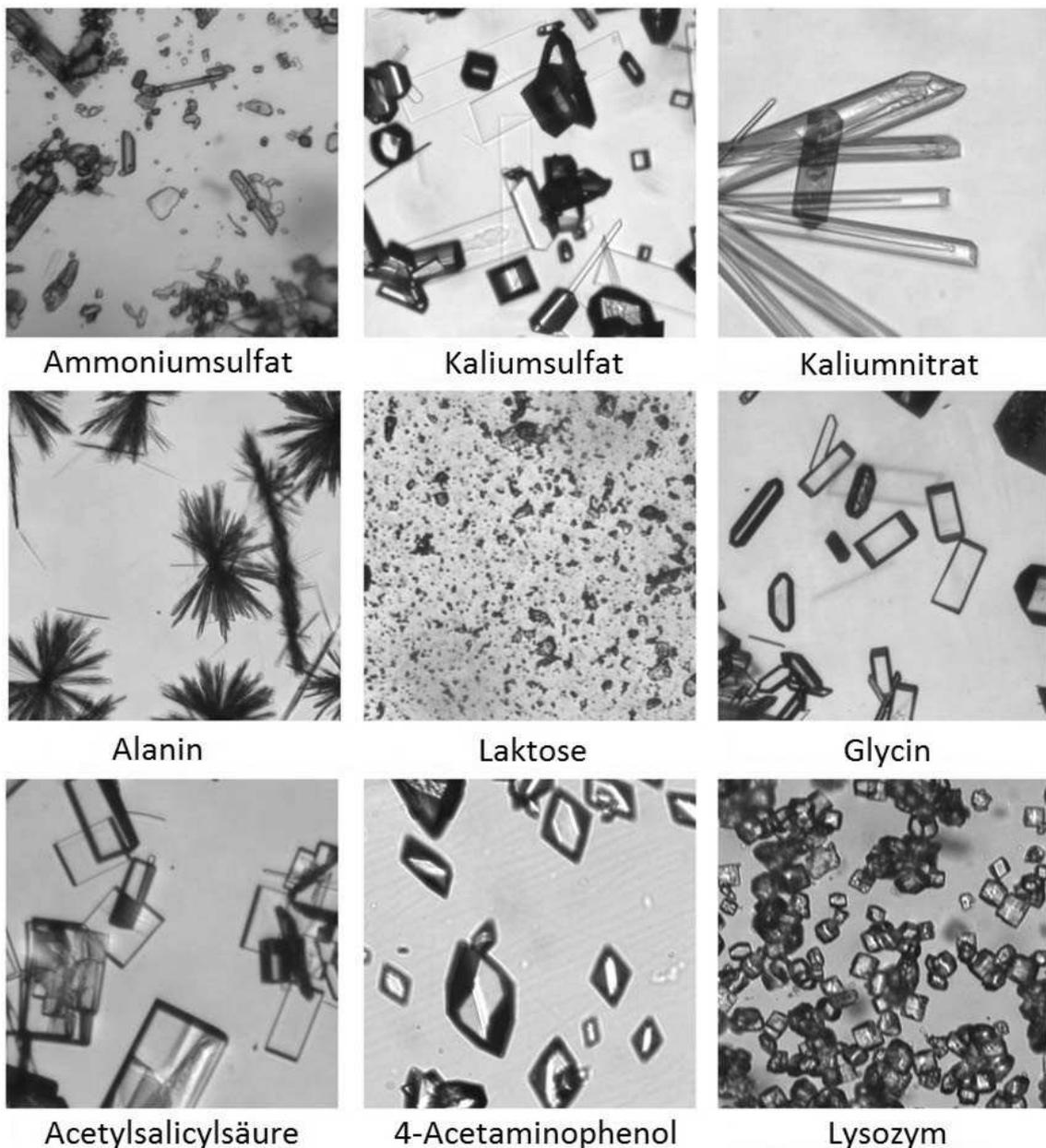


Abb. 4: ISM-Aufnahmen von Kristallen verschiedener chemischer Verbindungen. Quelle: [Bluma, 2009].

Mithilfe geeigneter Bildverarbeitungsalgorithmen kann der Kristallisationsprozess überwacht werden. Dabei korreliert die Gesamtfläche der detektierten Kristalle mit der Masse der kristallisierten Verbindung [Bluma, 2009].

3.4.4 Hefekultivierungen

S. cerevisiae stellt einen wichtigen eukaryotischen Modellorganismus in der Biotechnologie dar. Das ISM III-XTF wurde bereits mehrfach für die Überwachung von Kultivierungsprozessen dieses Organismus eingesetzt [Rehbock et al., 2010; Akin et al., 2011]. In Abb. 5 ist eine ISM-Aufnahme von suspendierten *S. cerevisiae* Zellen dargestellt.

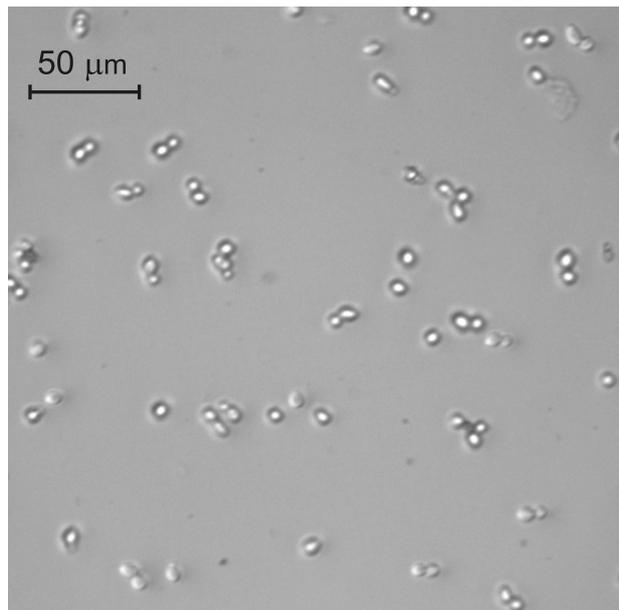


Abb. 5: Während eines batch-Kultivierungsprozesses aufgenommenes ISM-Bild von *S. cerevisiae* Zellen. Zelldichte bei etwa 6×10^6 Zellen/ml.

Im Bild sind Einzelzellen und viele Doppelzellen, die durch Knospung entstanden sind, zu sehen. Der für die Auswertung der Bilddaten entwickelte Bildverarbeitungsalgorithmus *Double-Yeast-Cell-Counter* ist in der Lage zwischen Einzel- und Doppelzellen sowie Zellclustern zu unterscheiden [Krabichler, 2005].

3.4.5 Cellulose

Cellulose hat großes Potential als regenerative Ressource. Bereits heute ist die Produktion von Bioethanol aus Cellulose möglich, auch wenn die Rentabilität des Prozesses im Vergleich zum Einsatz von biologischen Rohstoffen der ersten Generation, wie beispielsweise Zuckerrohr, noch zu niedrig ist [Larsen et al., 2012; Limayem et al., 2012].

Um die Effizienz der Verwertung von Cellulose zu erhöhen, wird ihr enzymatischer Abbau erforscht. Hierfür ist es wichtig die enzymatische Hydrolyse während der Versuche zu verfolgen. Für diese Überwachung wurde die Durchflussvariante des ISM III-XTF bereits verwendet. Sowohl Größenverteilungen der Cellulosepartikel,

als auch die Veränderung dieser Verteilung können mit dem ISM ermittelt werden. Für Probleme sorgt die Bildung von Agglomeraten, die die Messzone des Mikroskops komplett blockieren können [Pietsch, 2012]. Treten diese Agglomerate auf, wird eine sinnvolle Messung mit dem ISM unmöglich. Es kann daher nicht für eine verlässliche Überwachung eingesetzt werden.

3.5 Optimierungspotential

Das ISM III-XTF ist für die Überwachung vieler biotechnologischer Prozesse geeignet. In einigen Punkten besteht jedoch Optimierungspotential.

1. Wie am Beispiel der Überwachung von Cellulose deutlich wird, ist eine sinnvolle Messung unmöglich, wenn der Eingang zur Messzone des Mikroskops durch Agglomerate blockiert wird. Dieses Problem tritt ebenfalls bei extrem hohen Zelldichten in Kultivierungsexperimenten auf. Ein Lösungsansatz ist die Messzone zwischen den Aufnahmen aufzufahren und die Verblockung auf diese Weise zu lösen.
2. Die verwendeten Schrittmotoren zum Antrieb der Linearschlitten besitzen ein hohes Umkehrspiel, wodurch die Messzone nach Auf- und Zufahren nicht exakt auf die ursprüngliche Tiefe zurückgefahren wird. Mithilfe eines Weglängen-Messgeräts konnte festgestellt werden, dass der Fehler bis zu 10 μm in der Messzonentiefe ausmacht [Rudolph, 2007]. Besonders problematisch ist dabei, dass die Tiefe der Messzone nicht überprüft werden kann, da keine Rückmeldung an den Computer stattfindet, ob die Schrittmotoren die vom Computer erteilten Befehle umgesetzt haben. Daraus ergibt sich weiter, dass das in der Messzone befindliche Volumen nicht exakt bestimmt werden kann. Dadurch wird die direkte Bestimmung von Zell- und Partikeldichten erschwert. Für jede Einstellung der Messzonentiefe muss das Mikroskop prinzipiell neu kalibriert werden. Dies erhöht den Arbeitsaufwand erheblich und stellt eine zusätzliche Fehlerquelle dar. Die Verwendung von genaueren Motoren mit Positionskontrolle ist daher empfehlenswert.
3. Die maximal erreichbare Aufsichtsfläche des Mikroskops beträgt 0,83 mm^2 . Damit können runde Objekte mit einem Durchmesser von $<400 \mu\text{m}$ aufgenommen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass sie unvollständig aufgenommen werden ist jedoch groß. Da nur vollständig aufgenommene Objekte von der Bildverarbeitungssoftware analysiert werden können, verringert sich die für die Auswertung zur Verfügung stehende Datengrundlage. Für große Objekte ist es daher wünschenswert, Objektive mit kleineren Abbildungsmaßstäben zur Verfügung zu stellen, um das Applikationsspektrum der In-situ-Mikroskopie zu erweitern. Durch die

Verwendung von Kameras mit größeren CCD-Chips kann die Aufsichtsfläche weiter vergrößert werden.

4. Moderne Mikroskope sind mit Unendlich-Objektiven ausgerüstet. Bei Endlich-Objektiven wird das erzeugte Zwischenbild durch chromatische Aberration verzerrt und mit kleinen Abbildungsfehlern dargestellt. Durch eine Unendlich-Optik wird dieser Fehler korrigiert. Zukünftige Versionen des ISM sollten daher mit Unendlich-Optik ausgestattet werden.

5. Das ISM III-XTF kann nur über Firewire und RS232-Anschlüsse angesteuert werden. Diese Schnittstellen sind nicht mehr zeitgemäß und werden nicht serienmäßig verbaut. Zukünftige ISM sollten daher über gängige Schnittstellen (z.B. USB) ansteuerbar sein.

6. Schließlich sind mit dem ISM III-XTF keine Fluoreszenzuntersuchungen möglich. Diese werden in der modernen Mikroskopie jedoch immer häufiger eingesetzt, weshalb eine Weiterentwicklung des ISM in diesem Bereich wünschenswert ist.

4 Optimierung des ISM III-XTF

Mit den vorhandenen Objektiven hat das ISM III-XTF ein auf maximal $1.050 \mu\text{m} \times 787 \mu\text{m}$ beschränktes Sichtfeld. Daher gelingt es bei der Untersuchung von großen ($\varnothing > 250 \mu\text{m}$) Objekten und Objekten mit besonders ausladender Morphologie nur selten diese komplett aufzunehmen. Für die Untersuchung von Lewatit-Partikeln wurde dieses Problem bereits beschrieben [Prediger et al., 2011].

Ein aus dem ISM III-XTF entwickeltes Ex-situ-System für die Untersuchung von großen Partikeln wurde bereits vorgestellt [Bluma, 2009]. Um ähnliche Messungen auch in-situ durchführen zu können, werden neue Objektive für das ISM III-XTF entworfen und charakterisiert. Anhand der Untersuchung der mechanischen Stabilität von Lewatit VP OC 1600 Partikeln (Lanxess, Leverkusen) wird ihr Anwendungspotential demonstriert.

4.1 Aufbau der neuen Objektive

Kommerziell verfügbare Objektive mit kleinen Vergrößerungsfaktoren haben sehr große Durchmesser, weshalb sie nicht in das ISM III-XTF integriert werden können. Daher sind die im Folgenden beschriebenen Objektive aus bikonvexen Linsen (CVI Melles Griot, Albuquerque, USA) aufgebaut.

4.1.1 Endlich-Objektiv

In Abb. 6 ist der Strahlengang durch eine bikonvexe Linse schematisch dargestellt.

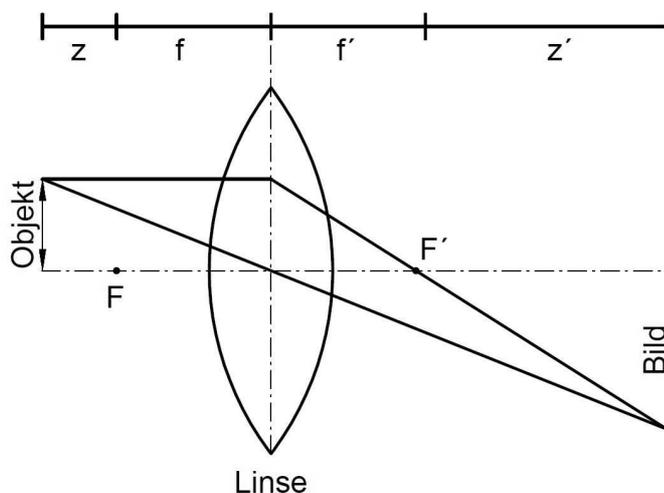


Abb. 6: Schematischer Strahlengang durch eine bikonvexe Linse.

Hierbei sind f und f' die Brennweite der Linse. Es gilt:

$$f = f' \quad (1)$$

F und F' sind die Brennpunkte. z ist die Distanz zwischen Objekt und objektseitiger Brennebene. z' ist die Distanz zwischen Bild und bildseitiger Brennebene. Der Abbildungsmaßstabs M kann wie folgt berechnet werden:

$$M = \frac{f}{z} = \frac{z'}{f'} \quad (2)$$

Die Gesamtlänge des ISM III-XTF ist festgelegt. Die Tubuslänge zwischen der Mitte einer 1.000 μm geöffneten Messzone und dem CCD-Chip der Kamera beträgt 233,5 mm. Für die Tubuslänge T gilt:

$$T = z + z' + 2f \quad (3)$$

Aus (2) ergibt sich:

$$z' = \frac{f^2}{z} \quad (4)$$

(4) kann in (3) eingesetzt werden:

$$T = z + \frac{f^2}{z} + 2f \quad (5)$$

Nach z aufgelöst ergibt dies:

$$z_{1/2} = -f + \left(\frac{T}{2}\right) \pm \sqrt{-Tf + \left(\frac{T}{2}\right)^2} \quad (6)$$

Diese beiden Lösungen beschreiben die zwei möglichen Anordnungen für bikonvexe Linsen in einem Objektiv für das ISM III-XTF. Anhand dieser Formel werden die erreichbaren Vergrößerungsfaktoren für die zur Verfügung stehenden Linsen berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Erreichbare Vergrößerungsfaktoren bei verschiedenen Linsenbrennweiten.

Brennweite der Linse [mm]	Möglicher Vergrößerungsfaktor im ISM-III-XTF
10	21,3
12,5	16,5
15	13,5
20	9,6
25	7,2
30	5,6
40	3,6
50	2,2
60	/

Bei Brennweiten von über 58,4 mm gibt es nur noch imaginäre Lösungen für z . Hier kann kein scharfes Abbild der Objekte mehr erhalten werden. Daher wird entschieden eine Linse mit einer Brennweite von 50 mm zu verwenden, um einen möglichst geringen Vergrößerungsfaktor zu erhalten. Aus (6) ergibt sich damit $z = 22,53$ mm und $z' = 110,97$ mm. Ein Schema des Objektivs ist in Abb. 7 dargestellt.

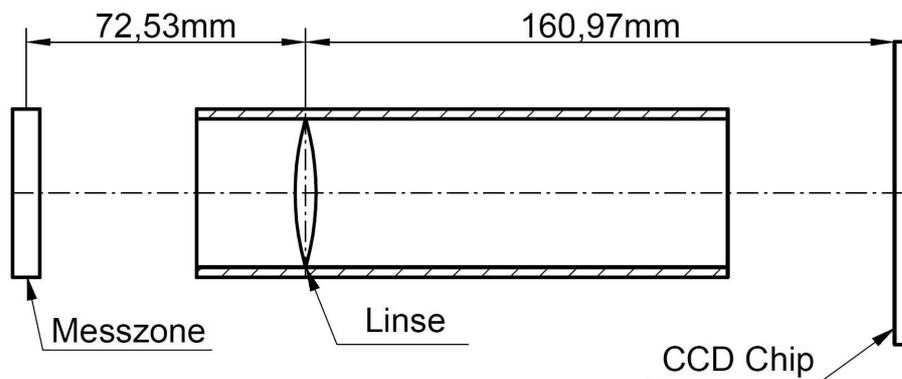


Abb. 7: Schematische Darstellung des neuen Endlich-Objektivs.

Durch das neue Endlich-Objektiv wird die maximal mögliche Aufsichtsfläche des ISM- III-XTF auf $2.701 \mu\text{m} \times 2.026 \mu\text{m}$ gesteigert. Mit $5,47 \text{ mm}^2$ ist sie damit etwa 6,6-mal mal so groß wie zuvor.

4.1.2 Unendlich-Objektiv

In Abb. 8 ist der Strahlengang für ein Unendlich-Objektiv mit zwei bikonvexen Linsen schematisch dargestellt.

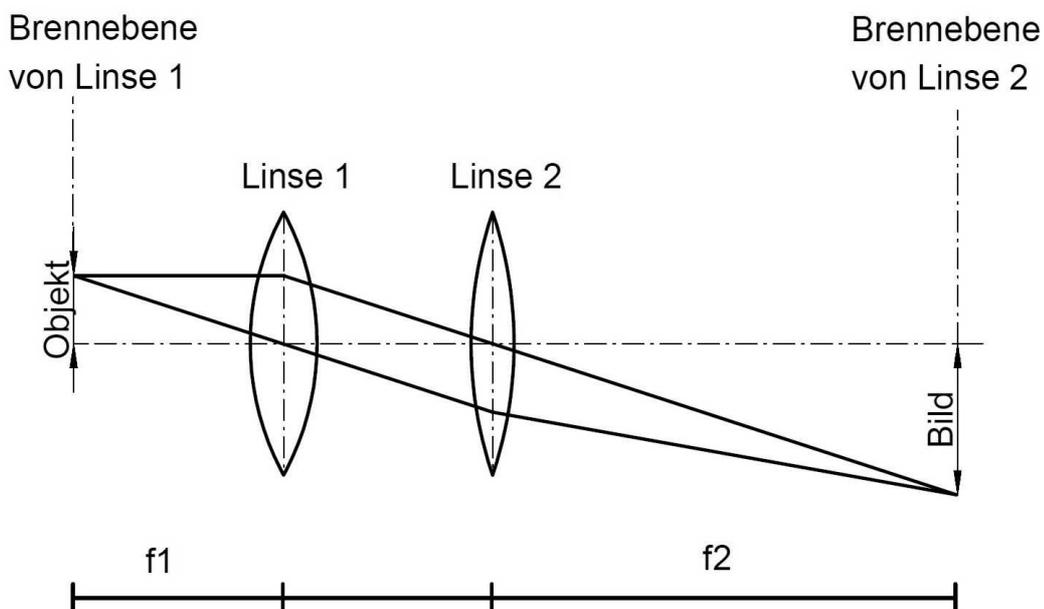


Abb. 8: Schematischer Strahlengang durch ein Unendlich-Objektiv mit zwei bikonvexen Linsen.

In einem Unendlich-Objektiv müssen die Linsen so angeordnet werden, dass die Brennebene der ersten Linse mit der Objektebene und die Brennebene der zweiten Linse mit der Bildebene zusammenfällt. Wie in Abb. 8 zu erkennen kann der Bereich zwischen den Linsen nahezu beliebig lang werden, da alle Strahlen in diesem Bereich parallel zueinander verlaufen. Der größte Vorteil der Unendlich-Optik liegt darin, dass in diesem Bereich optische Filter eingesetzt werden können, ohne dass sich das Bildergebnis dadurch verändert. Bei einem Unendlich-Objektiv kann der Abbildungsmaßstab M wie folgt berechnet werden.

$$M = \frac{f_2}{f_1} \quad (7)$$

Für die Konstruktion des Unendlich-Objektivs werden zwei Linsen mit einer Brennweite von 75 mm verwendet. Damit wird ein Abbildungsmaßstab von 1 erreicht. Ein Schema des Objektivs ist in Abb. 9 dargestellt.

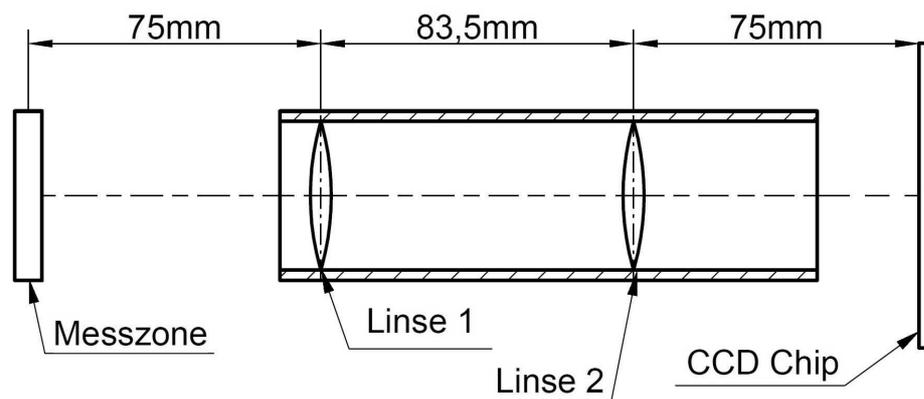


Abb. 9: Schematische Darstellung des neuen Unendlich-Objektivs.

Durch die Verwendung des neuen Unendlich-Objektivs lässt sich theoretisch eine maximale Aufsichtsfläche von $5.952 \mu\text{m} \times 4.464 \mu\text{m}$ erreichen. Da die Beleuchtungseinheit des ISM III-XTF nicht auf die Beleuchtung einer derartig großen Fläche ausgelegt ist, können in der Anwendung nur etwa 70% der Fläche verwendet werden. Damit lässt sich mit dem neuen Unendlich-Objektiv eine maximale Aufsichtsfläche von $17,7 \text{ mm}^2$ erreichen. Diese kann ohne eine Veränderung der Beleuchtungseinheit nicht weiter vergrößert werden.

4.2 Untersuchung der mechanischen Stabilität von Enzymträgern

Um die Eignung des neuen Endlich-Objektivs für die Beobachtung großer Partikel zu demonstrieren, werden Lewatit-Partikel auf ihre mechanische Stabilität hin un-

tersucht. Es handelt sich hierbei um ein makroporöses Material aus Polymethylmethacrylat, das zur Enzymimmobilisierung verwendet werden kann. Wenn Lewatit-Partikel in konventionellen Rührkesselreaktoren verwendet werden, können die am Rührwerk entstehenden Scherkräfte die Partikel zerstören. Um dies zu verhindern, können die Lewatit-Partikel mit einer Silikonschicht geschützt [Wiemann et al., 2009], oder die Reaktorplattform gewechselt werden [Hilterhaus et al., 2008]. Für die Beurteilung der Maßnahmen ist die Untersuchung der mechanischen Stabilität der Enzymträger in jedem Fall von Bedeutung.

Um die mechanische Stabilität der Lewatit-Partikel zu untersuchen, werden die Partikel in einen Testreaktor mit Scheibenblattrührer gegeben, in Isopropanol dispergiert und gerührt. Der Verlauf des Partikelabriebs wird mit dem ISM III-XTF überwacht.¹ Weitere Informationen zum verwendeten Reaktor und den ISM-Einstellungen finden sich im Anhang (Abschnitt 9.5). Aufgrund der ungenügenden Ausleuchtung wird auf die Verwendung des Unendlich-Objektives verzichtet. Die für die Auswertung der Bilder verwendete Software wird im Folgenden erläutert.

4.3 Bildverarbeitungssoftware *ParticleAnalyzer*

Für die Verarbeitung der mit dem neuen Objektiv aufgenommenen Bilder kommt der bereits beschriebene Algorithmus *ParticleAnalyzer* zum Einsatz [Prediger et al., 2011]. Der Algorithmus arbeitet die folgenden Schritte ab:

1. Binarisierung: Alle Pixel deren Grauwert unter einem bestimmten Schwellenwert liegt werden als Objektpixel erkannt.
2. Objekterkennung: Alle zusammenliegenden Objektpixel werden zu Objekten zusammengefasst. Von einem Objekt umschlossene Pixel werden als zum Objekt gehörend gewertet.
3. Größenausschluss: Die Größe der Objekte wird berechnet und Objekte unterhalb einer Größe von $220 \mu\text{m}^2$ werden verworfen.
4. Randobjektlöschung: Objekte die Pixel enthalten, die den Rand des Bildes berühren, werden ebenfalls gelöscht.
5. Klassifizierung: Anhand der Exzentrizität der Objekte werden diese in die Kategorie Bruchstück oder intakter Partikel eingeteilt. Die Exzentrizität wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Exzentrizität} = \frac{\text{maximaler polarer Abstand}}{\text{minimaler polarer Abstand}} \quad (8)$$

Dabei ist der maximale polare Abstand die längste mögliche Strecke zwischen einem Randpixel des Objektes und seinem Schwerpunkt. Der minima-

¹ Die Versuchsdurchführung erfolgte im Rahmen der vom Autor betreuten Bachelorarbeit von Daniel Marquard [Marquard, 2012].

le polare Abstand ergibt sich analog aus der kürzesten Strecke [Steinbrecher, 2006]. Objekte mit einer Exzentrizität von über 1,3 werden als Bruchstück gewertet, alle anderen als intakte Partikel.

6. Datenausgabe: Die Ergebnisse werden in einer Tabelle ausgegeben.

Ein mit dem neuen Endlich-Objektiv aufgenommenes ISM-Bild und das vom *ParticleAnalyzer* erzeugte Resultatbild werden in Abb. 10 gezeigt.

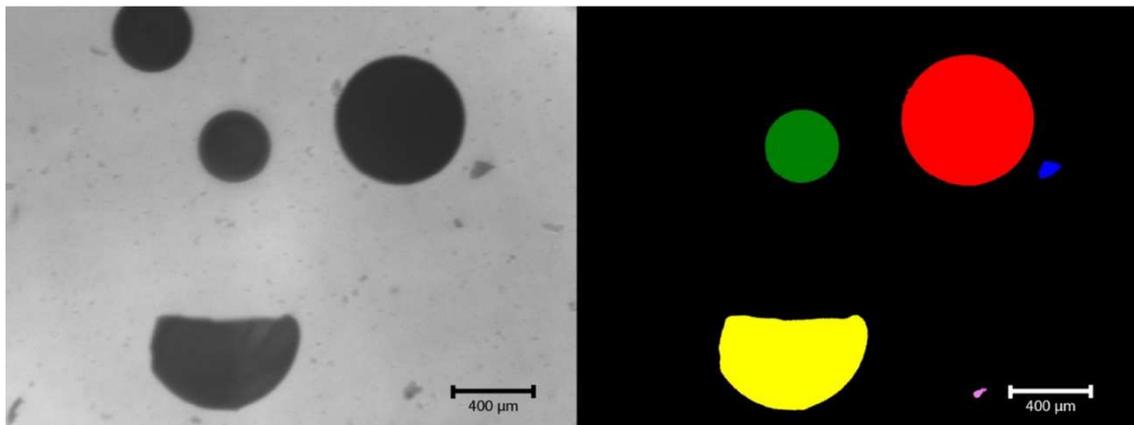


Abb. 10: Originalbild (links) und Resultatbild (rechts) nach Auswertung mit dem *ParticleAnalyzer*. Es werden zwei intakte Partikel und drei Bruchstücke erkannt. Die Einfärbung der Objekte erfolgt, damit die Objekte besser voneinander unterschieden werden können. Quelle: [Marquard, 2012].

Der im Originalbild noch zu sehende Partikel am oberen linken Bildrand wird nicht vom Bildverarbeitungsalgorithmus erkannt, da er am Rand des Bildes liegt und nicht komplett aufgenommen wurde. Einige kleinere Bruchstücke werden ebenfalls nicht erkannt, da ihre Größe unter $220 \mu\text{m}^2$ liegt.

4.4 Optimierung der Messzontentiefe

In einer Voruntersuchung wird die optimale Messzontentiefe für die Überwachung bestimmt. Hierfür werden Versuche mit Messzontiefen von $900 \mu\text{m}$, $1.200 \mu\text{m}$ und $1.500 \mu\text{m}$ durchgeführt und jeweils 600 Bilder ausgewertet. Dabei wird der Anteil scharf aufgenommener Partikel und die Verblockung der Messzone durch die Partikel untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Voruntersuchung zur Messzontentiefe.

Messzontentiefe [μm]	900	1.200	1.500
Anteil scharf aufgenommener Partikel [%]	83	47,3	46,9
Verblockung der Messzone	Ja	Ja	Nein

Der größte Anteil scharf aufgenommener Partikel wird mit 83% bei einer Messzontiefe von 900 μm erreicht. Bei den größeren Messzontiefen wird noch knapp die Hälfte der Partikel scharf abgebildet. Wenn Rührgeschwindigkeiten von unter 100 rpm verwendet werden, treten bei den kleineren Messzontiefen Verblockungen der Messzone auf. Dadurch sind die Versuche nicht mehr auswertbar. Da unscharf aufgenommene Partikel trotzdem noch gut vom *ParticleAnalyzer* zugeordnet werden können, werden alle weiteren Versuche mit Messzontiefen von 1.500 μm durchgeführt.

4.5 Einfluss der Rührgeschwindigkeit

Um den Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Fragmentierung der Partikel zu untersuchen, werden in Isopropanol dispergierte Lewatit-Partikel bei verschiedenen Geschwindigkeiten gerührt. Der Verlauf des Partikelabriebs wird mit dem ISM III-XTF überwacht und die entstehenden Bilder mit dem *ParticleAnalyzer* Algorithmus ausgewertet.

In Abb. 11 ist beispielhaft die Auswertung des Versuchs mit einer Rührgeschwindigkeit von 100 rpm grafisch dargestellt.

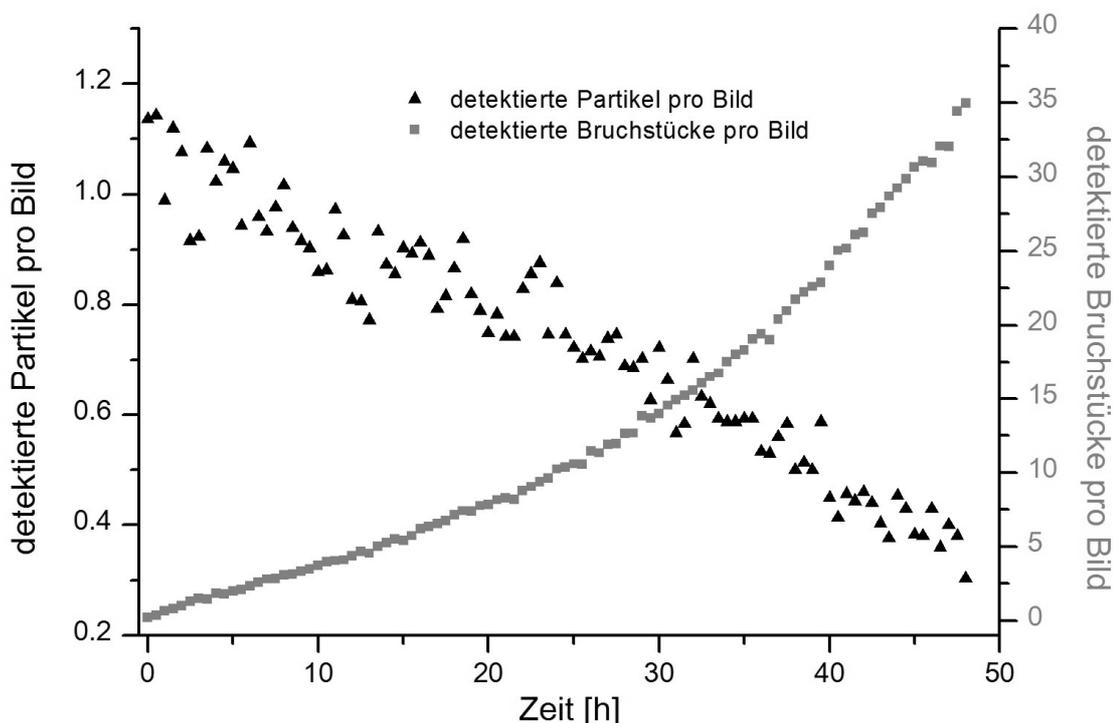


Abb. 11: Durchschnittliche Anzahl der pro Bild detektierten Partikel und Bruchstücke im Versuchsverlauf. Verwendete Rührgeschwindigkeit: 100 rpm.

In der Abbildung ist zu sehen, dass die durchschnittliche Anzahl intakter Partikel pro Bild von über 1 kontinuierlich bis auf 0,4 absinkt. Zeitgleich steigt die durch-

schnittliche Anzahl detektierter Bruchstücke pro Bild von 0 bis auf 35 an. Im Versuchsverlauf beschleunigt sich die Bildung der Bruchstücke. Dies liegt daran, dass die entstehenden Bruchstücke weiter zerschlagen werden und noch kleinere Bruchstücke bilden. Ein einfacher Vergleich mit der Bruchstückbildungsrate in anderen Versuchen ist daher am besten im Bereich der ersten Stunden möglich, in dem die Bruchstückbildung linear verläuft.

Weiter ist zu erkennen, dass die Werte für die intakten Partikel stärker streuen als die für die Bruchstücke berechneten Werte. Dies liegt zum einen an der größeren Datengrundlage, denn bereits nach wenigen Stunden werden mehr Bruchstücke pro Zyklus aufgenommen als intakte Partikel. Zum andern liegt es daran, dass die Bruchstücke regelmäßiger detektiert werden können. Damit ein Objekt detektiert werden kann muss es komplett aufgenommen werden. Dies geschieht bei großen Objekten seltener, wodurch es zu zufallsbedingten Schwankungen in den Messungen kommt. Für eine Analyse der mechanischen Stabilität der Partikel eignet sich die Überwachung der Bruchstückgenerierung daher besser.

In Abb. 12 werden die Ergebnisse aller Versuche gezeigt. Dargestellt ist die Anzahl der durchschnittlich pro Bild aufgenommenen Bruchstücke während der ersten vier Stunden.

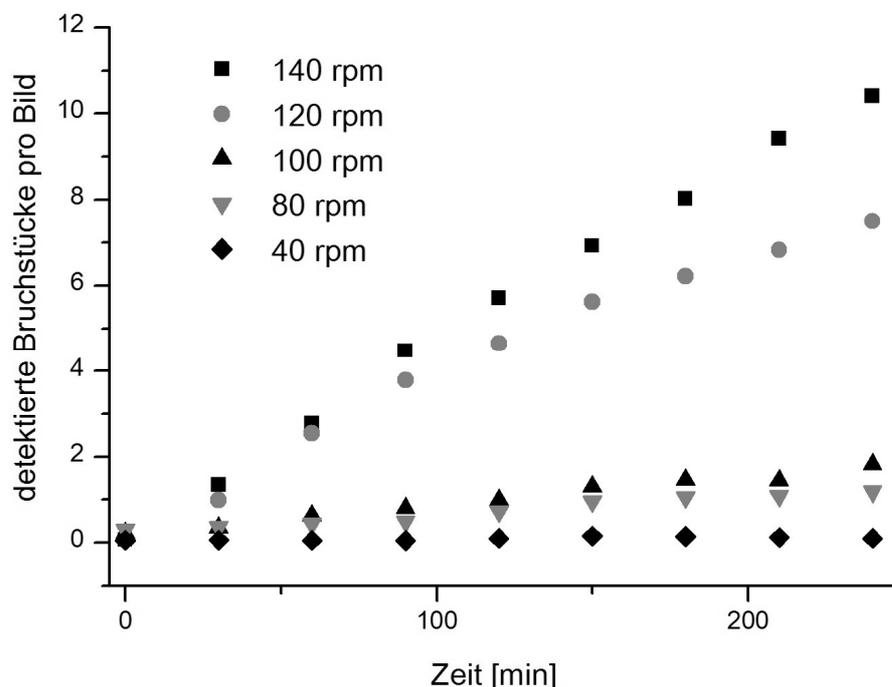


Abb. 12: Vergleich der Bruchstückentstehung bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Bruchstückbildungsrate mit steigender Rührgeschwindigkeit ebenfalls steigt. Die höchste Bruchstückbildungsrate wird bei 140 rpm erreicht. Hierbei werden pro Stunde etwa 2,5 Bruchstücke mehr pro Bild

detektiert. Weiter ist zu erkennen, dass bei einer Rührgeschwindigkeit von 40 rpm keine Bruchstückbildung in den ersten vier Stunden beobachtet werden kann.

4.6 Einfluss des Dispersionsmittels

Um den Einfluss des Dispersionsmittels auf die Partikelzerstörung zu untersuchen werden Experimente in unterschiedlichen Flüssigkeiten durchgeführt. Als Dispersionsmittel kommen Isopropanol und flüssige Myristinsäure (60°C) zum Einsatz. Bei letzterer handelt es sich um ein typisches Prozessmedium für industrielle Produktion von Seifen mit hoher Viskosität. In beiden Versuchen werden Lewatit-Partikel für 24 h bei 80 rpm im Testreaktor gerührt. Die mechanische Beanspruchung der Partikel wird anhand der Bruchstückbildung mit dem ISM überwacht. Das Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt.

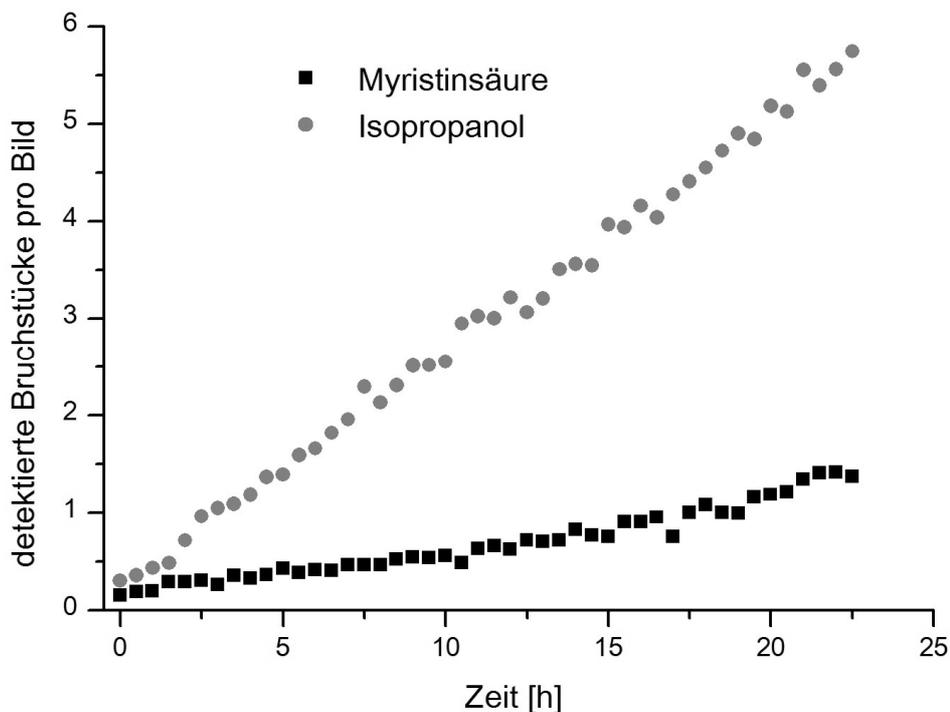


Abb. 13: Vergleich der Bruchstückgenerierung in verschiedenen Dispersionsmitteln bei 80 rpm.

Bei beiden Versuchen ist eine lineare Zunahme der Anzahl der pro Bild aufgenommenen Bruchstücke über den gesamten Versuchsverlauf zu erkennen. Dabei steigt die Anzahl detektierter Bruchstücke pro Bild in der flüssigen Myristinsäure mit 15 Bruchstücken pro Stunde, während in Isopropanol mit 68 Bruchstücken pro Stunde mehr als viermal so viele Bruchstücke entstehen. Die höhere Viskosität der Myristinsäure sorgt vermutlich dafür, dass im Vergleich zum Rühren in Isopropanol geringere Scherkräfte auftreten. Dadurch bleiben die Lewatit-Partikel länger intakt.

4.7 Bestimmung der Partikelgrößen-Dichteverteilung

Die Überwachung des Partikelabriebs durch das Rührsystem kann nicht nur über die Bruchstückgenerierung charakterisiert werden. Mit dem ISM und dem Bildverarbeitungsalgorithmus ist es auch möglich Größenverteilungen der aufgenommenen Objekte an jedem Messpunkt zu berechnen.

Da die Anzahl detektierbarer Objekte während der Versuche nicht konstant bleibt, werden die Größenverteilungen mit der folgenden Formel auf die Gesamtzahl der pro Messung detektierten Objekte normiert.

$$\text{Anteil der Größenfraktion [\%]} = \frac{\text{Anzahl Objekte in Größenfraktion}}{\text{Gesamtanzahl der Objekte}} \times 100 \quad (9)$$

Die grafische Darstellung einer Partikelgrößenverteilung kann durch eine Summenverteilungskurve erfolgen. Hierbei entspricht der aufgetragene Wert $F(x)$ jeweils der normierten Menge aller Partikel mit einer Fläche kleiner gleich x . Alternativ kann die Partikelgrößenverteilung durch eine Dichteverteilungskurve dargestellt werden. Ist eine Summenverteilung differenzierbar, so stellt die Dichteverteilung die erste Ableitung der Summenverteilung dar. Ist sie es nicht wird die x -Achse in äquidistante Intervalle aufgeteilt. Der aufgetragene Wert $f(x)$ stellt dann die normierte Menge aller Partikel in einem bestimmten Intervall $x_n - x_{n-1}$ dar. Die Breite der Intervalle wird als Auflösung der Größenverteilung bezeichnet.

Zur Veranschaulichung sind in Abb. 14 die Summen- und Dichteverteilungskurve der Standardnormalverteilung (Erwartungswert=0; Varianz=1) dargestellt.

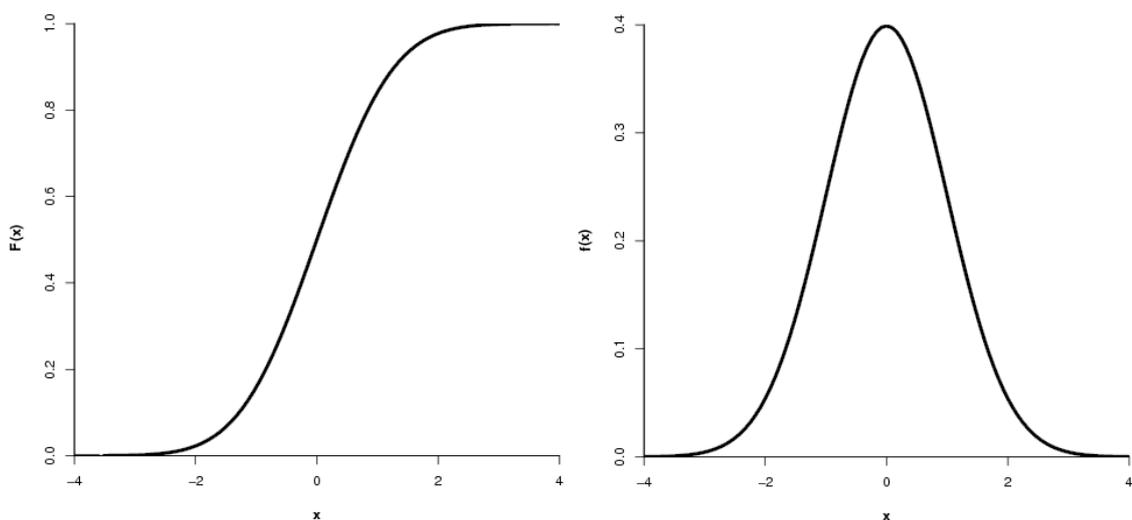


Abb. 14: Summen- (links) und Dichteverteilungskurve (rechts) der Standardnormalverteilung.

In Abb. 15 werden Dichteverteilungen von bestimmten Versuchszeitpunkten miteinander verglichen. Hierfür werden Messdaten von jeweils 5 Aufnahmezyklen zusammengefügt, um eine breitere Datengrundlage zu erhalten. Daher entspricht jede Datenreihe einer Messung über 2,5 h. Der Versuch wurde mit einer Rührgeschwindigkeit von 100 rpm in Isopropanol durchgeführt. Statt Flächeneinheiten wird der theoretische Durchmesser angegeben. Dies ist der Durchmesser, den ein idealer Kreis mit einer bestimmten Fläche hätte. Er kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Theor. Durchmesser} = 2 \times \sqrt{\frac{\text{Objektfläche}}{\pi}} \quad (10)$$

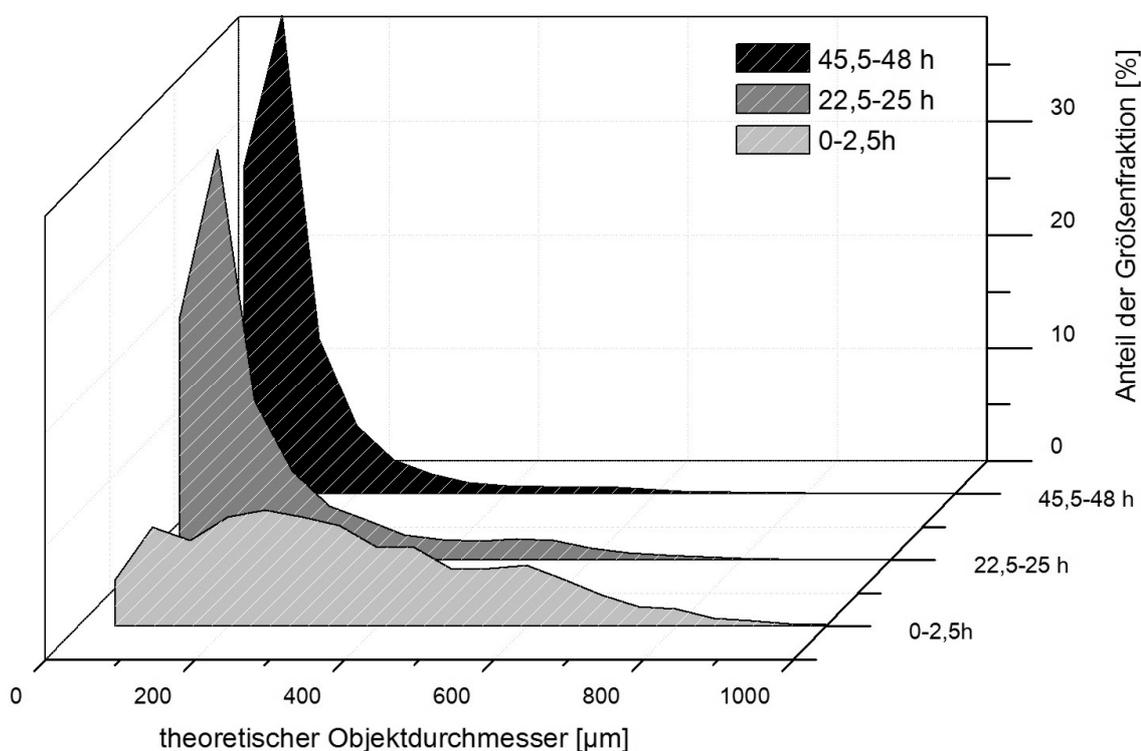


Abb. 15: Dichteverteilungen der erkannten Objekte zu verschiedenen Versuchszeitpunkten. Auflösung: 50 µm theor. Objektdurchmesser.

Es ist zu erkennen, dass der Anteil großer Objekte im Laufe des Versuchs abnimmt und dafür der Anteil von kleinen Objekten steigt. Oberhalb eines theoretischen Durchmessers von 150 µm sinkt der Anteil der Objekte über den gesamten Versuchszeitraum, während der Anteil von Objekten mit Durchmessern unter 150 µm steigt. Der größte Anstieg liegt im Bereich von theoretischen Durchmessern zwischen 50 µm und 100 µm. In den ersten 2,5 h des Versuches liegen unter 10% aller Objekte in diesem Bereich. Während der letzten 2,5 h sind es bereits über 40%.

4.7.1 Vergleich mit Laserbeugungsspektroskopie

Um die mit dem ISM beobachteten Dichteverteilungen mit einer etablierten Technik zur Partikelgrößenbestimmung vergleichen zu können, werden mittels Laserbeugungsspektroskopie (LBS) Vergleichsmessungen durchgeführt.²

Die ISM-Daten werden so generiert, dass in der Dichteverteilung jeder Datenpunkt einen Durchmesserbereich von 25 μm abdeckt. Die mittels LBS erhaltenen Datenpunkte beziehen sich auf verschiedengroße Durchmesserbereiche. Daher werden diese in einem ersten Schritt anhand der folgenden Formel auf den ISM-Bereich normiert, um die ISM-Ergebnisse mit denen der LBS vergleichen zu können:

$$\text{Normierter Anteil} = \frac{25 \mu\text{m}}{\text{Durchmesserbereich}} \times \text{gemessener Anteil} \quad (11)$$

In Abb. 16 werden die mit LBS und ISM ermittelten Dichteverteilungen aller Objekte miteinander verglichen.

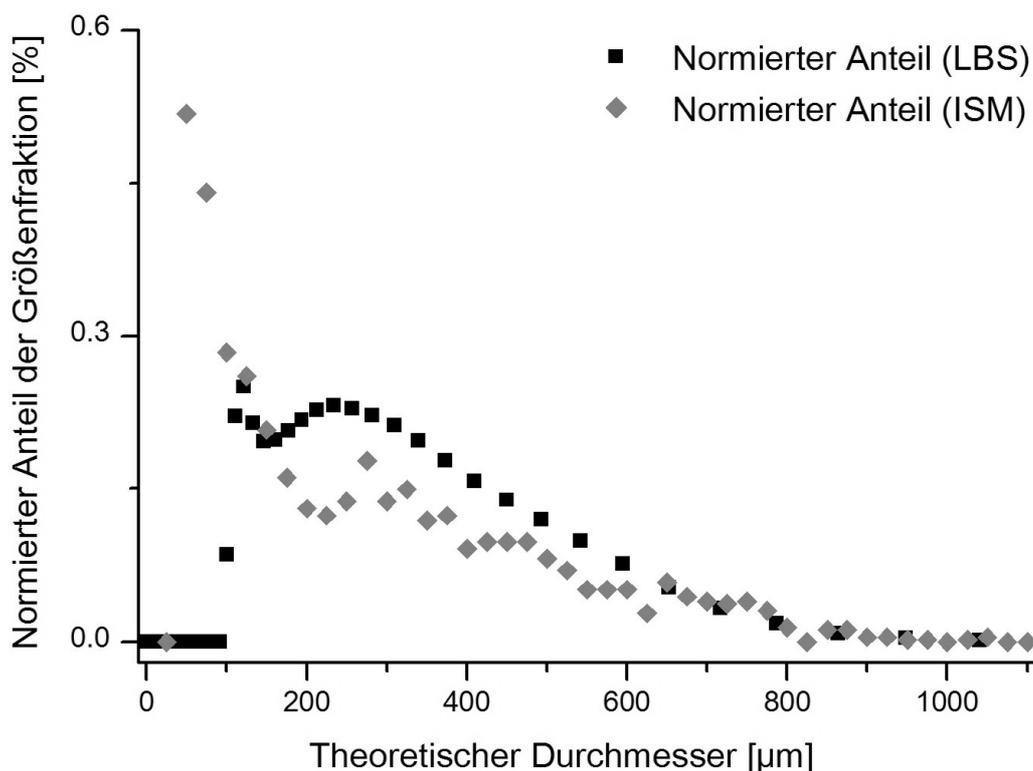


Abb. 16: Vergleich der mittels LBS und ISM erfassten normierten Dichteverteilungen.

² Diese Versuche wurden vom Institut für Feststoffverfahrenstechnik und Partikeltechnologie der Technischen Universität Hamburg-Harburg durchgeführt.

Es ist zu sehen, dass die ermittelten Dichteverteilungen voneinander abweichen. Die mikroskopische Messung wurde nach 2,5 h Rühren durchgeführt. Daher liegen hierbei bereits kleine Bruchstücke vor, die für die Diskrepanz zwischen den Messmethoden sorgen. Dies erklärt insbesondere die großen Anteile der Größenfraktionen mit theoretischen Durchmessern von unter 100 μm bei der ISM Messung.

Da Bruchstücke von der Auswertungssoftware als solche erkannt werden, können sie aus der Berechnung der Dichteverteilungen ausgeschlossen werden. Um zu untersuchen, ob die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden Messmethoden entfallen wenn nur intakte Partikel in die Berechnung der Dichteverteilungen einfließen, wurde eine entsprechende Auswertung der ISM Daten durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

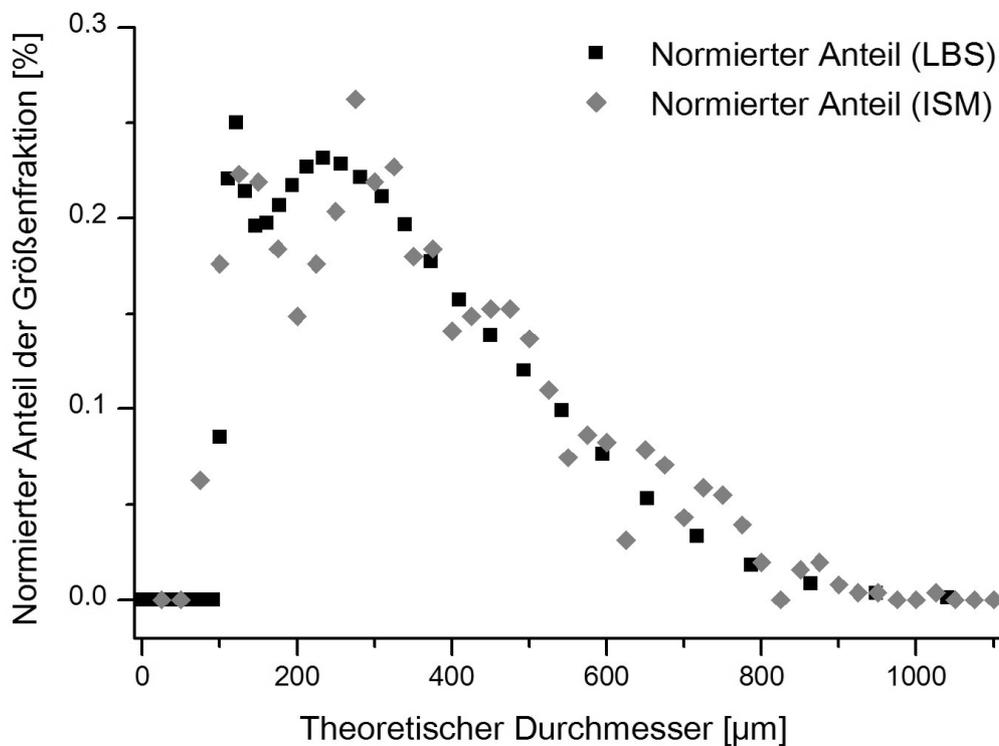


Abb. 17: Vergleich der mittels ISM bestimmten Dichteverteilung mit der LBS Dichteverteilung.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die mit den beiden Methoden ermittelten Dichteverteilung besser übereinstimmen, wenn bei der ISM-Messung nur die intakten Partikel berücksichtigt werden. Weiter ist zu erkennen, dass die mittels ISM bestimmten Werte stärker schwanken, was darauf zurückzuführen ist, dass durch die Beschränkung auf intakte Partikel die Datengrundlage für die Berechnung verkleinert wurde. Um diese Schwankung für zukünftige Messungen zu minimieren, können mehr Bilder pro ISM-Messzyklus aufgenommen werden.

4.8 Zwischenfazit

Durch die Verwendung von Objektiven mit niedrigeren Vergrößerungsfaktoren konnte das Problem der zu kleinen Aufsichtsfläche gelöst werden. Somit konnte das Anwendungsspektrum des ISM III-XTF auf Objekte mit Durchmessern von über 1 mm erweitert werden. Mit dem neuen Endlich-Objektiv mit 2-facher optischer Vergrößerung war es möglich Aufnahmen zu machen, die sich gut für die Analyse mit dem *ParticleAnalyzer* Algorithmus eigneten. Das neue Unendlich-Objektiv war mit der ISM-Beleuchtungseinheit nur beschränkt einsatzfähig.

Die Weiterentwicklung ermöglichte eine optimierte Überwachung von Enzymträgern in gerührten Systemen. Durch die Analyse der Bruchstückbildung konnte der Einfluss verschiedener Dispersionsmittel und der Rührgeschwindigkeit auf die mechanische Stabilität von Enzymträgern untersucht werden. Darüber hinaus war es durch die Verwendung der neuen Objektive möglich Partikelgrößen-Dichteverteilungen zu erstellen und ihre Entwicklung zu verfolgen. Der Vergleich mit der LBS zeigte, dass eine realistische Erstellung von Größenprofilen der Partikel möglich war. Durch die Aufnahme von mehr Bildern pro Messzyklus kann die Streuung der Messwerte in Zukunft reduziert werden.

Weitere Problemfelder wie die ungenaue Messzonentiefe, die Ablagerung von Objekten auf den Saphirglasscheiben, oder die unflexiblen Anschlussoptionen des Mikroskops konnten durch die Optimierung der Optik des ISM III-XTF nicht gelöst werden. Hierfür wurde eine komplette Neukonzeption des ISM-Systems durchgeführt, die im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

5 Entwicklung eines neuen In-situ-Mikroskop-Prototypen

5.1 Aufbau des ISM-TT

In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines neuen ISM-Prototyps (ISM-TT) beschrieben. Als In-situ-Mikroskop soll der Prototyp für die Überwachung von biotechnologischen Prozessen zur Anwendung kommen.

5.1 Aufbau des ISM-TT

Eine schematische Seitenansicht des ISM-TT ist in Abb. 18 dargestellt.

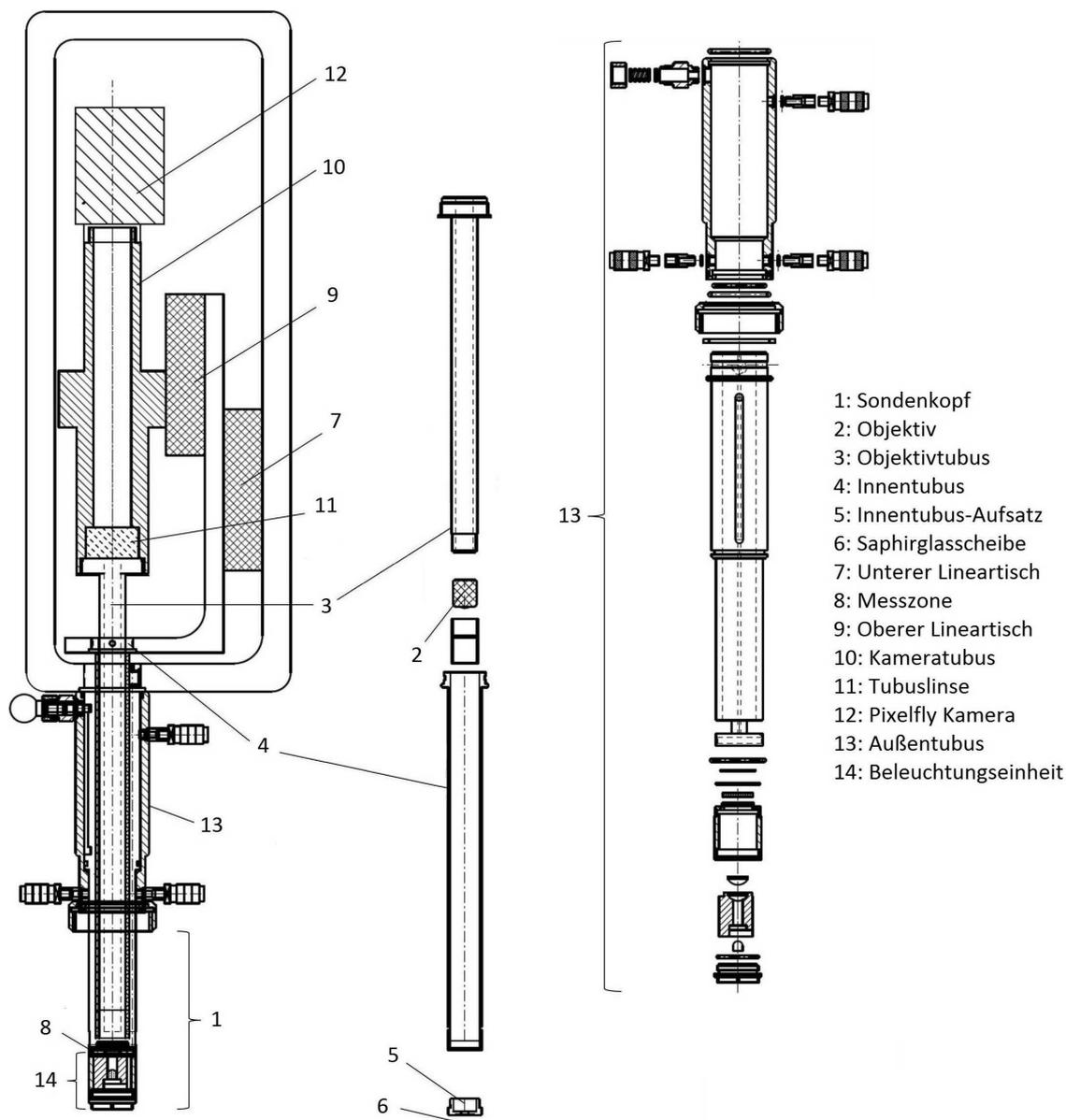


Abb. 18: Schematische Seitenansicht des ISM-TT (links) mit Explosionszeichnungen vom Innentubus (Mitte, unten) und Objektivtubus (Mitte, oben) und vom Außentubus (rechts).

Das ISM-TT ist modular aufgebaut und kann mit seinem Sondenkopf (1) in einen Bioreaktor integriert werden. Wie beim Vorgängermodell ISM III-XTF kommt eine Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung zum Einsatz. Es werden moderne Unendlich-Objektive (Olympus Deutschland, Hamburg) verwendet, um chromatische Aberrationen und Abbildungsfehler zu minimieren. Die Objektive (2) sind in einem Objektivtubus (3) eingefasst. 4-fach und 10-fach vergrößernde Objektive stehen zur Verfügung. Der Objektivtubus liegt im zusammengebauten ISM-TT innerhalb des Innentubus (4). Ein Aufsatz (5) mit Saphirglasscheibe (6) kann auf den Innentubus aufgeschraubt werden. Da der Objektivtubus nur bis zum Gewinde des Aufsatzes vorgefahren werden kann, ist der Aufsatz in seiner Gesamtlänge kürzer als im Vorgängermodell.

Die größte Veränderung zum Vorgängermodell stellt die Mechanik des ISM-TT dar. Für die Einstellung der Messzonentiefe und der Fokusebene werden beim ISM-TT umkehrspielfreie Kugelspindel-Präzisionslineartische (Physik Instrumente, Karlsruhe) verwendet. Diese können ihre Position über eine Echo-Kontrolle jederzeit exakt feststellen. Dadurch wird sichergestellt, dass die Schlitten beliebige Positionen reproduzierbar anfahren können. Auf dem unteren Lineartisch (7) ist eine Aluminiumplatte aufgeschraubt, in die der Innentubus eingesetzt werden kann. Da dieser mit seiner Saphirglasscheibe die Messzone (8) begrenzt, kann durch Verfahren des Lineartisches die Tiefe der Messzone variiert werden. Der obere Lineartisch (9) ist auf der Aluminiumplatte aufgeschraubt. Auf ihm ist der Kameratubus (10) verschraubt. Der Objektivtubus ist in diesen Tubus verschraubt und hält damit die Tubuslinse (11). Durch Verfahren des oberen Tisches kann somit die Fokusebene des ISM-TT eingestellt werden. Die „Tisch-auf-Tisch“-Anordnung der Lineartische bedeutet, dass beim Verfahren des unteren Tisches der obere mitverfahren wird. Dadurch bleibt der relative Abstand des Objektivs zur vorderen Saphirglasscheibe gleich.

Am Ende des Kameratubus wird eine Pixelfly-Kamera (12) (PCO AG, Kelheim) über ein C-mount-Gewinde angeschlossen. Sowohl die Beleuchtungseinheit des Mikroskops, als auch die Lineartische und die neue Pixelfly-Kamera können per USB-Schnittstelle über einen Computer gesteuert werden.

Der Außentubus (13) des ISM III-XTF wird als Bauteil für das ISM-TT übernommen. Lediglich die LED der Beleuchtungseinheit (14) wird durch eine leistungsstärkere LED ($I = 20\text{mA}$, $\lambda = 516\text{ nm}$, 24.000 mcd , Winger Electronics GmbH & Co, Dessau) ersetzt. Eine detaillierte Beschreibung des Außentubus findet sich bei Rudolph [Rudolph, 2007].

5.2 Steuersoftware *InsituControl*

Für die Steuerung des neuen ISM-TT wird die Software *InsituControl 3.1* verwendet.³ In Abb. 19 ist ein Bildschirmfoto des Programms im laufenden Betrieb dargestellt.

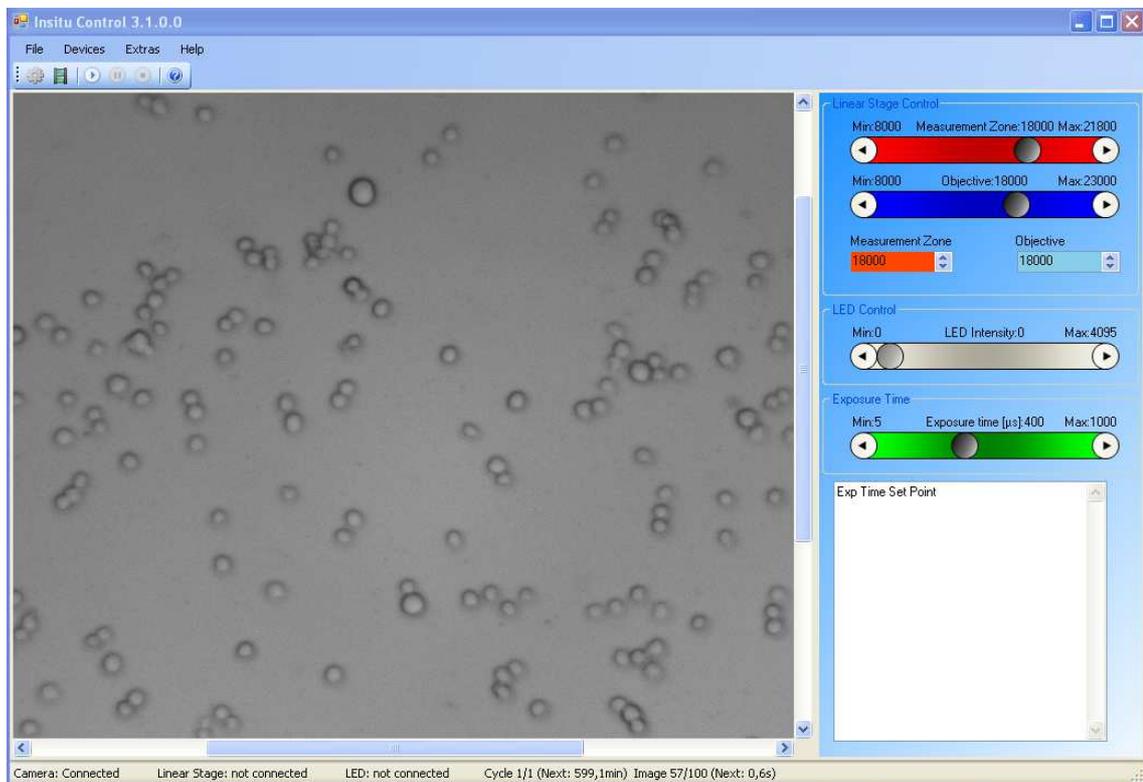


Abb. 19: Bildschirmfoto der Steuersoftware *InsituControl 3.1*. Im Live-Bild sind CHO-Zellen zu sehen.

In der Abbildung ist das Hauptfenster des Programms zu sehen. Auf der linken Seite wird das von der Kamera aufgenommene Live-Bild gezeigt. Die Steuerelemente für die Lineartische, die LED und die Belichtungszeit der Kamera sind auf der rechten Seite angeordnet. Am oberen Rand ist die Menüleiste zu erkennen. Darunter sind Schaltflächen für die wichtigsten Steuerbefehle angeordnet. Über die Menüleiste kann das ISM-TT initialisiert und weitere Untermenüs erreicht werden. Das wichtigste Untermenü für die Einstellung der Aufnahmezyklen ist in Abb. 20 dargestellt.

³ Diese Software wurde von Dr. Patrick Lindner entwickelt.

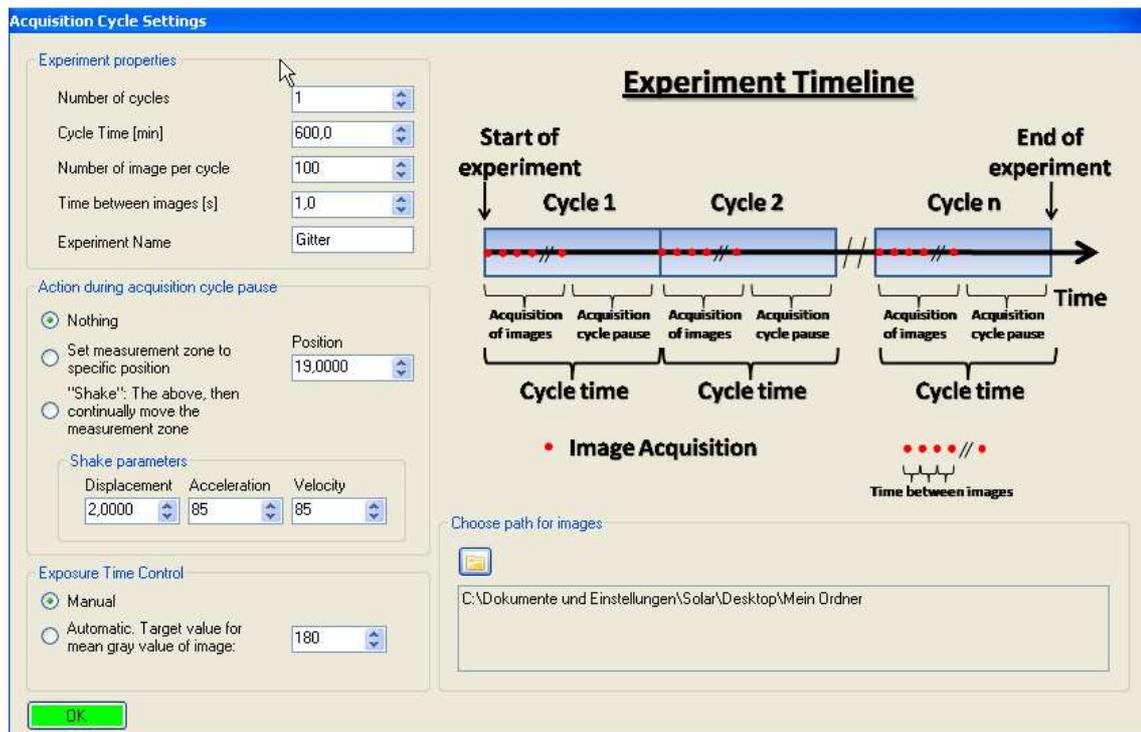


Abb. 20: *InsituControl 3.1* Untermenü zur Einstellung der Aufnahmezyklen.

Alle Einstellungen zum Ablauf der Aufnahmezyklen können in diesem Untermenü durchgeführt werden. In der oberen linken Ecke können die Anzahl der Aufnahmezyklen, die für einen Aufnahmezyklus zur Verfügung stehende Zeit, die Anzahl der Bilder pro Zyklus sowie die Zeit zwischen zwei Einzelaufnahmen festgelegt werden. Darüber hinaus kann den Aufnahmen ein Experimentname zugewiesen werden, der später in den Dateinamen der Aufnahme integriert wird.

Das Bild auf der rechten Seite illustriert die Bedeutung der oben beschriebenen Programmparameter. Als weitere Optionen kann in diesem Menü festgelegt werden, was während der Pause zwischen zwei Aufnahmezyklen geschehen soll, in welchem Ordner die Aufnahmen abgelegt werden und auf welche Art die Belichtungszeit der Bilder kontrolliert wird.

5.3 Charakterisierung des Mikroskops

Bevor das Mikroskop einsatzbereit ist, müssen grundlegende Eigenschaften charakterisiert werden.

5.3.1 Optische Eigenschaften

Die Objektive des Mikroskops sind für 4-fach und 10-fach Vergrößerungen ausgelegt. Um zu untersuchen, ob diese auch tatsächlich erreicht werden, wird ein Ob-

jektmikrometer (Olympus Deutschland, Hamburg) mit dem ISM-TT aufgenommen und die Anzahl der Pixel zwischen 10 Objektmikrometerstrichen ($\cong 100 \mu\text{m}$) mit dem Bildbearbeitungsprogramm *ImageJ* bestimmt. Diese Messungen werden in 3-fach Bestimmung durchgeführt. In Abb. 21 ist eine Aufnahme des Objektmikrometers zu sehen.

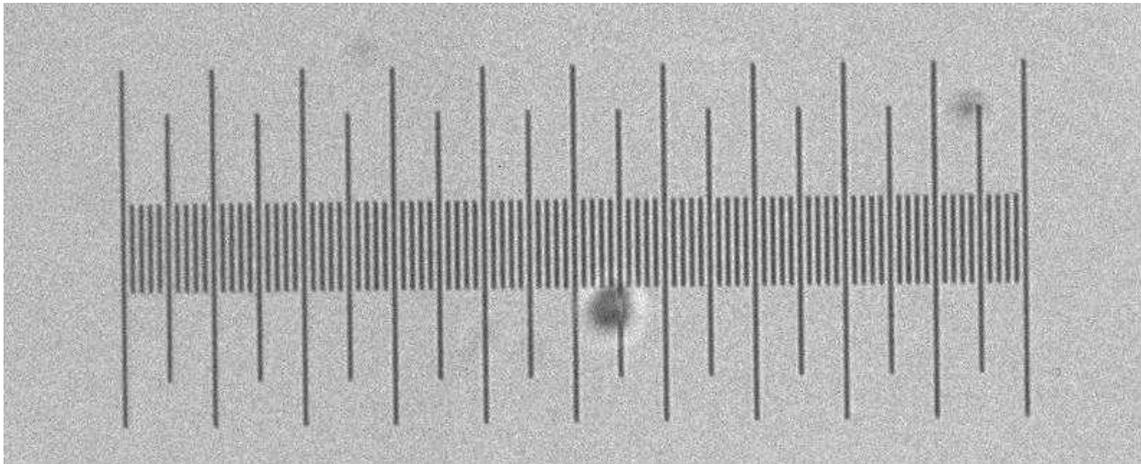


Abb. 21: Aufnahme des Objektmikrometers. Auf seiner Oberfläche sind 100 Striche im Abstand von jeweils $10 \mu\text{m}$ eingätzt.

Mit folgender Formel kann die Kantenlänge der Bildpixel berechnet werden:

$$\text{Bildpixel Kantenlänge} = \frac{100 \mu\text{m}}{\text{Pixelanzahl zwischen 10 Strichen}} \quad (12)$$

Nun kann der Abbildungsmaßstab des verwendeten Objektivs unter Einbeziehung der Kantenlänge der Pixel auf dem CCD-Chip der Kamera wie folgt berechnet werden:

$$\text{Abbildungsmaßstab} = \frac{\text{Chippixel Kantenlänge}}{\text{Bildpixel Kantenlänge}} \quad (13)$$

Die Kantenlänge eines Pixels auf dem CCD-Chip der verwendeten Pixelfly Kamera beträgt $6,45 \mu\text{m}$. Aus der Kantenlänge der Bildpixel kann darüber hinaus die größtmögliche Aufsichtsfläche des Mikroskops errechnet werden, wenn die Anzahl der Kamerapixel bekannt ist.

$$\text{max. Aufsichtsfläche} = \text{Anzahl Kamerapixel} \times \text{Bildpixel Kantenlänge}^2 \quad (14)$$

Der CCD-Chip der Pixelfly Kamera besitzt 1.392×1.040 Pixel. In Tabelle 3 sind die für die beiden Objektive berechneten Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3: Optische Eigenschaften des ISM-TT bei Verwendung verschiedener Objektive.

	4-fach Objektiv	10-fach Objektiv
10 Objektmikrometerstriche ($\cong 100 \mu\text{m}$)	62,4 Pixel	156,2 Pixel
errechnete Bildpixel Kantenlänge	1,60 μm	0,64 μm
errechneter Abbildungsmaßstab	4,03	10,08
Abweichung zum erwarteten Wert	0,75%	0,8%
größtmögliche Aufsichtsfläche	3,7 mm^2	0,59 mm^2

Abgesehen von kleinen Abweichungen vergrößern die Objektive wie erwartet. Die Abweichungen liegen im Bereich des Messfehlers, weshalb sie für weitere Berechnungen vernachlässigt werden.

5.3.2 Thermische Belastbarkeit

Die thermische Belastbarkeit des Mikroskops im Betrieb wird untersucht, indem der Prototyp an das für die Versuche in Abschnitt 4 verwendete Testreaktorsystem angeschlossen wird. Diese wird mit Wasser gefüllt und bei einer Rührgeschwindigkeit von 450 rpm auf 70°C erhitzt. An Mikroskop und Reaktor werden Messorte definiert, die mit schwarzem Gewebepband markiert werden. An diesen Stellen wird die Temperatur mit Hilfe eines 62 Mini IR-Thermometers (Fluke Deutschland, Glottertal) gemessen. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse während laufender ISM-Aufnahmen aufgelistet.

Tabelle 4: Gemessene Temperaturen an ISM-TT und Reaktor.

Messort	Temperatur [$^\circ\text{C}$]
Reaktoraußenwand	67,6
Mitte der ISM-Sonde	36,0
Motorenblock	31,0
Pixelfly-Kamera	31,8

Die Kamera ist für einen Betrieb bei Temperaturen von bis zu 45°C ausgelegt, die Lineartische sogar bis zu 65°C [PCO AG, 2010; Physik Instrumente GmbH & Co. KG, 2007]. Damit liegen die am ISM-TT erreichten Temperaturen deutlich unter den Grenzwerten. Das ISM-TT kann daher problemlos zur Überwachung von Prozessen mit Temperaturen von bis zu 70°C verwendet werden.

Der untere Teil des Mikroskops, der in den Reaktor integriert wird, kann autoklaviert werden. Für die Autoklavierung wird der obere Teil des ISM mit den optischen und elektronischen Bauteilen abgenommen. Der Innentubus des ISM wird dann durch eine Autoklavierkappe, die auf das untere Segment aufgeschraubt wird, arretiert. Eine zusätzliche Schutzkappe schirmt den LED-Anschluss vor Feuchtigkeit ab. Ein Schema der angeschraubten Autoklavierkappen ist in Abb. 22 zu sehen.

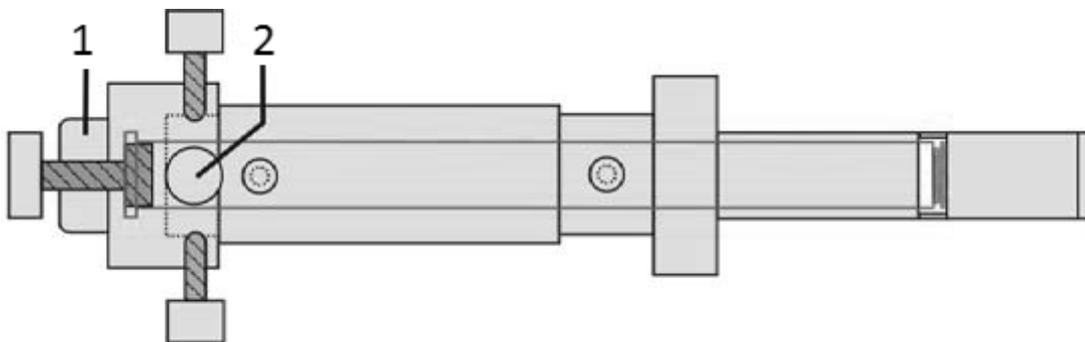


Abb. 22: Unteres Mikroskop-Segment mit aufgeschraubter Autoklavierkappe (1) und LED-Schutzkappe (2), Quelle: [Rudolph, 2007].

Sowohl die Beleuchtungseinheit am unteren Ende des Mikroskops, als auch der verwendete Epoxid-Kleber für die Saphirglasscheiben (Polytec EP 653, Polytec PT GmbH, Waldbronn), sind für das Autoklavieren geeignet.

5.4 Überwachung enzymatischer Abbauprozesse von Cellulose

Um die verbesserten Eigenschaften des ISM-TT für die in-situ-Überwachung von biotechnologischen Prozessen zu demonstrieren, wird es für die Untersuchung enzymatischer Abbauprozesse von Cellulose verwendet. Das Vorgängermodell III-XTF wurde bereits in einer Durchfluss-Anwendung für ähnliche Versuche eingesetzt. Die Verblockung der Messzone während der Versuche führte hierbei jedoch zu schwerwiegenden Messproblemen [Pietsch, 2012].

Enzymatische Abbauprozesse von Cellulose sind von wissenschaftlichem Interesse, da sie einen wichtigen Prozessschritt in der Produktion von Bioethanol der 2. Generation darstellen. Im Gegensatz zu Bioethanol der 1. Generation, der aus

Zuckerrohr oder Getreide hergestellt wird, steht die Produktion von Bioethanol aus Cellulose nicht in direkter Konkurrenz zum Anbau von Lebensmitteln.

Die Voraussetzungen für die Verzuckerung von Cellulose und die anschließende mikrobielle Umsetzung zu Ethanol sind vorhanden. Aufgrund des hohen verfahrenstechnischen Aufwands ist der Prozess zurzeit noch nicht wirtschaftlich durchführbar [Larsen et al., 2012; Limayem et al., 2012]. Um die Effizienz der Umsetzungsprozesse zu erhöhen, wird daher nach Möglichkeiten für die Herstellung weiterer hochwertiger Produkte aus Cellulose gesucht. Denkbar ist beispielsweise die Produktion von Cellulosemolekülen mit definierter Molekulargewichtsverteilung. Diese können nach einer enzymatischen Veresterung als Emulgatoren in der Kosmetikindustrie verwendet werden [Online 3].

Die In-situ-Mikroskopie wird in dieser Arbeit eingesetzt, um die enzymatischen Abbauprozesse direkt im Bioreaktor zu verfolgen und eine schnelle und automatisierte Erfassung der Größenverteilung der Cellulosefasern zu ermöglichen. Dafür wird ein spezialisierter Bildverarbeitungsalgorithmus entwickelt und die Ergebnisse mit Laserbeugungsspektroskopie-Daten verglichen.

5.4.1 Untersuchtes Substrat und verwendete Enzyme

Als Cellulosesubstrat wird ARBOCEL BE 600–10 TG (Rettenmaier & Söhne, Rosenberg) untersucht. Es handelt sich hierbei um weiße Cellulose-Mikrofasern, die aus der Buche gewonnen werden. Für den Abbau der Cellulose werden die Enzympräparate Rohament CL und Ecostone C1 (AB Enzymes, Darmstadt) verwendet. Rohament CL sorgt für eine Kompletthydrolyse der Cellulose zu Glucose, wohingegen Ecostone C1 nur eine Teilhydrolyse erreicht. Anwendung findet Rohament CL in der Getränkeindustrie für den Abbau von β -Glucanen, Pentosanen und anderen Nicht-Stärke Polysacchariden. Ecostone C1 kommt industriell für die Bearbeitung von Jeansstoffen zum Einsatz [Online 4]. In Tabelle 5 sind die wichtigsten Eigenschaften der beiden Enzympräparate aufgelistet.

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Enzyme [Online 5; Online 6].

Name	Rohament CL	Ecystone C1
Art des Enzyms	Cellulase (EC-Nr. 3.2.1.4)	Cellulase (EC-Nr. 3.2.1.4)
Aktivität	50000 NCU ⁴ /g	15000 ECU ⁵ /g
Form	Flüssigkeit	Flüssigkeit
Proteingehalt	16 mg/ml	27 mg/ml
pH-Toleranz	pH 6 – 7,5	pH 3 – 6
Temperatur-Toleranz (Aktivitätsmaximum)	55 – 65°C (60°C)	< 65°C (60°C)

5.4.2 Entwicklung des *CelluloseAnalyzer* Algorithmus

Für die automatisierte Auswertung der aufgenommenen In-situ-Mikroskop Bilder wird der *CelluloseAnalyzer* Algorithmus entwickelt.⁶ In 5 Schritten verarbeitet der Algorithmus die entstanden Bilder und gibt das Ergebnis in Tabellenform aus. Ein Bildschirmfoto der Bildverarbeitungssoftware in Arbeit ist in Abb. 23 sehen.

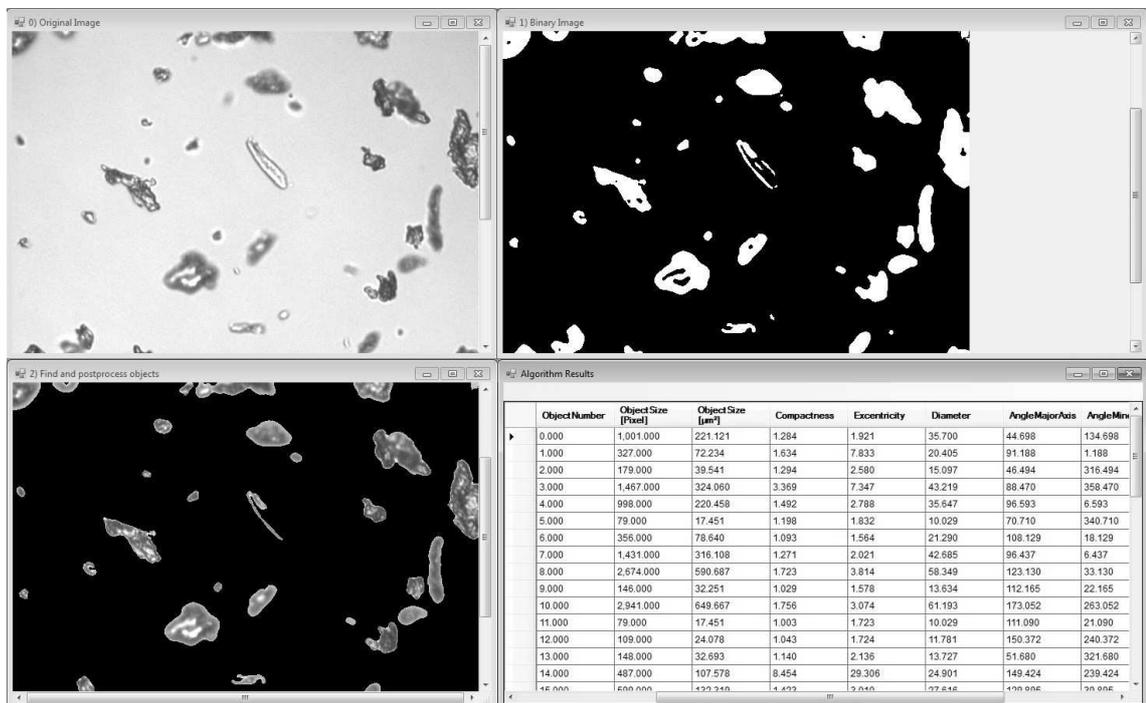


Abb. 23: Bildschirmfoto des *CelluloseAnalyzers*. Oben-links: Originalbild, oben-rechts: binarisiertes Bild, unten-links: erkannte Objekte, unten-rechts: Ergebnistabelle.

⁴ NCU: Novo-Cellulase-Unit, Substrat: Carboxymethylcellulose

⁵ ECU: Endo-Cellulose-Unit, Substrat: Carboxymethylcellulose

⁶ Die Implementierung des Algorithmus in C# wurde von Dr. Patrick Lindner durchgeführt.

Die wichtigsten Schritte des Algorithmus können durch die oben gezeigte grafische Ausgabe vom Benutzer nachvollzogen werden. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden beschrieben:

1. Medianfilter: Damit Messrauschen und kleinere Verschmutzungen der Saphirglasscheiben weniger ins Gewicht fallen wird ein Medianfilter über das Originalbild gelegt.
2. Binarisierung: Alle Pixel, deren Grauwert einen bestimmten Schwellenwert unterschreitet, werden vom Algorithmus erkannt und im Binarisierungsbild (Abb. 23, oben-rechts) weiß markiert. Alle anderen Pixel werden schwarz markiert.
3. Zusammenfassung: Alle Pixel, die gemeinsame Kanten haben, werden zu Objekten zusammengefasst.
4. Objektlöschung: Alle Objekte, deren Größe unter einem bestimmten Schwellenwert liegt, werden gelöscht. Die verbleibenden Objekte werden als Maske über das Originalbild gelegt. Daraus ergibt sich das Ergebnisbild (Abb. 23, unten-links). Optional können zusätzlich alle Objekte gelöscht werden, die Pixel am Rand des Bildes besitzen.
5. Eigenschaftsberechnung und Ausgabe: Die Eigenschaften aller Objekte wie beispielsweise der durchschnittliche Grauwert und die Größe, sowie Formfaktoren wie Kompaktheit und Exzentrizität werden berechnet. Die Ergebnisse werden in einer Tabelle ausgegeben.

Mit Sortieralgorithmen und Tabellenkalkulationsprogrammen werden diese Daten weiterverarbeitet und grafisch aufbereitet.

5.4.2.1 Parameterbestimmung

Der Parameter des *CelluloseAnalyzers* mit dem größten Einfluss auf das Ergebnis ist der Schwellenwert für die Binarisierung. Um diesen festzulegen, werden Grauwertistogramme der Bilder nach Anwendung des Medianfilters untersucht. In Abb. 24 sind ein solches Bild und das zugehörige Grauwertistogramm gezeigt.

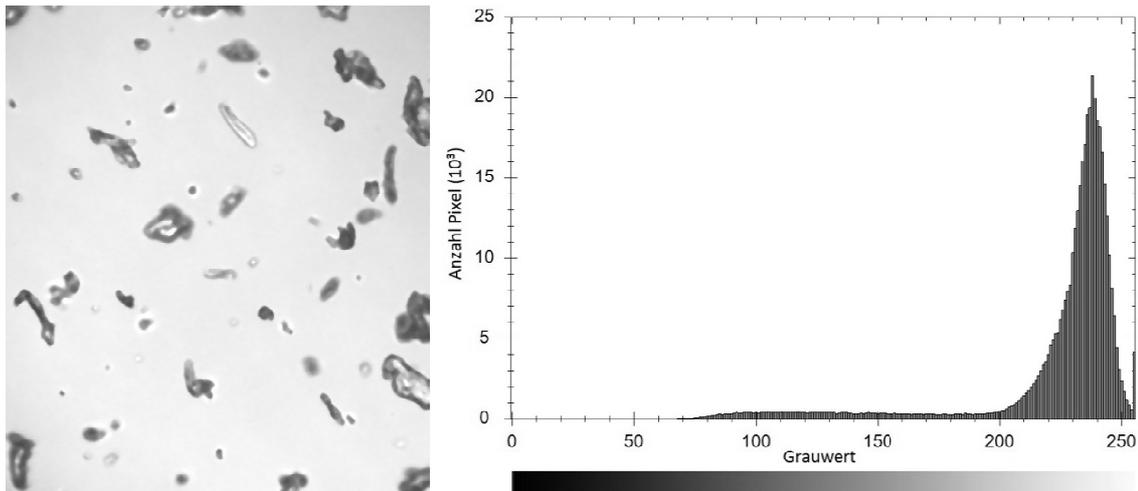


Abb. 24: In-situ-Mikroskopie Aufnahme nach Anwendung des Medianfilters und zugehöriges Grauwert-Histogramm.

Der große Peak im Bereich hoher Grauwerte gehört zu den Pixeln die im Hintergrund des Bildes liegen. Die Pixel mit Grauwerten zwischen 70 und 200 sind im Histogramm als niedriges Plateau zu erkennen. Diese Pixel sind deutlich dunkler als die Hintergrundpixel und gehören daher zu den Cellulosefasern. Auf Grundlage der Auswertung mehrerer solcher Grauwert-Histogramme wird der Schwellenwert für die Binarisierung auf den Grauwert 200 festgelegt.

Die Parameter für den Medianfilter und die Objektlöschung werden durch optischen Vergleich von Ergebnisbildern mit verschiedenen Einstellungen festgelegt. Als Werte für die vorliegenden Aufnahmen werden eine Fensterbreite von 7 für den Medianfilter und ein Schwellenwert von 75 Pixeln für die Objektlöschung festgelegt.

5.4.2.2 Überwachte Variablen

Aus den Daten, die in der Ergebnistabelle ausgegeben werden, müssen Variablen für die Überwachung des enzymatischen Abbaus festgelegt werden. Da es sich um einen Abbauprozess handelt, bietet sich die Anzahl der detektierbaren Objekte pro Aufnahme als zu überwachender Wert an. Da die Cellulosefasern durch die enzymatische Reaktion abgebaut werden, wird erwartet, dass dieser Wert im Verlauf des Prozesses abnimmt.

Des Weiteren wird erwartet, dass sich die Größenverteilung der erkannten Objekte im Verlauf der Hydrolyse verändert. Um hierfür einen einfach zu überwachenden Wert festzulegen, werden Größenverteilungen zu verschiedenen Zeitpunkten einer Modellhydrolyse mit Rohament CL untersucht. Da die Anzahl detektierbarer Objekte während des Versuchs nicht konstant bleibt, werden die Größenverteilungen

mit Formel (9), wie in Abschnitt 4.7 beschrieben, in Dichteverteilungen umgerechnet. Grafische Darstellungen dieser Dichteverteilungen sind in Abb. 25 zu sehen.

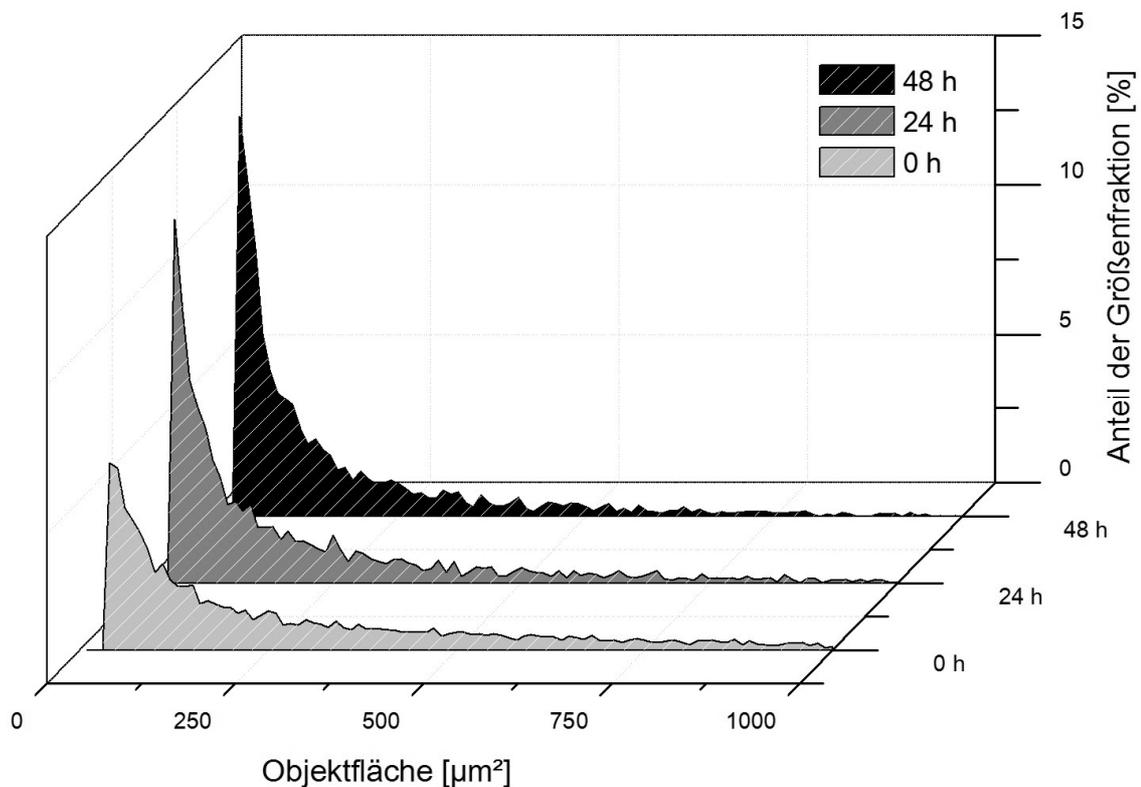


Abb. 25: Größenverteilungen der erkannten Objekte zu verschiedenen Zeitpunkten einer Modellhydrolyse mit Rohament CL, 50°C, 2,5 g/l Substrat, 0,125 g/l Enzym. Auflösung: 10 µm.

Zu erkennen ist, dass der Anteil großer Objekte im Verlauf der Hydrolyse abnimmt und nach 48 h kaum noch Objekte mit Größen von über 750 µm² vorhanden sind. Dafür nimmt der Anteil kleiner Objekte mit der Zeit zu. Oberhalb einer Objektfläche von 185 µm² sinkt der Anteil der Objekte über den gesamten Versuchszeitraum, während der Anteil von Objekten mit Flächen unter 185 µm² steigt. Für die Überwachung der Abbauprozesse wird deshalb der Anteil von kleinen Objekten unter 185 µm² als zweite zu überwachende Variable definiert. Es wird erwartet, dass der Wert im Laufe der Hydrolyseprozesse ansteigt und daher anhand dieses Wertes der Abbau von großen Cellulosefasern zu kleineren Fasern überwacht werden kann.

5.4.3 Versuchsaufbau

Die Versuche zum enzymatischen Abbau der Cellulose werden in einem Glasreaktor mit 25 mm Anschlussport für die ISM-Sonde durchgeführt. Es werden jeweils 2,5 g ARBOCEL BE 600-10 TG in 1 l Acetatpuffer vorgelegt. Für die Versuche zum enzymatischen Abbau wird Enzymlösung zugegeben bis eine Enzymproteinkon-

zentration von 0,125 g/l erreicht ist. Durchmischt wird das Prozessmedium durch einen Scheibenblattrührer, der über einen externen RW 20 DZM Laborrührer (IKA, Staufen) mit 160 rpm betrieben wird. Der Reaktor wird zur Temperaturregelung in ein Wasserbad eingelassen und auf 50°C geheizt. Überwacht wird die Temperatur durch die Sonde einer Biostat B Steuereinheit (Sartorius AG, Göttingen). Die Probenahme für offline Messungen erfolgt über einen in das Prozessmedium eingelassenen Schlauch mit angeschlossener EVA-Peristaltikpumpe (Eppendorf, Hamburg). Abb. 26 zeigt eine Aufnahme des Versuchsaufbaus. Die detaillierten Einstellungen für die ISM-Steuersoftware und die Bildverarbeitungssoftware sind im Anhang (Abschnitt 9.5) aufgeführt.

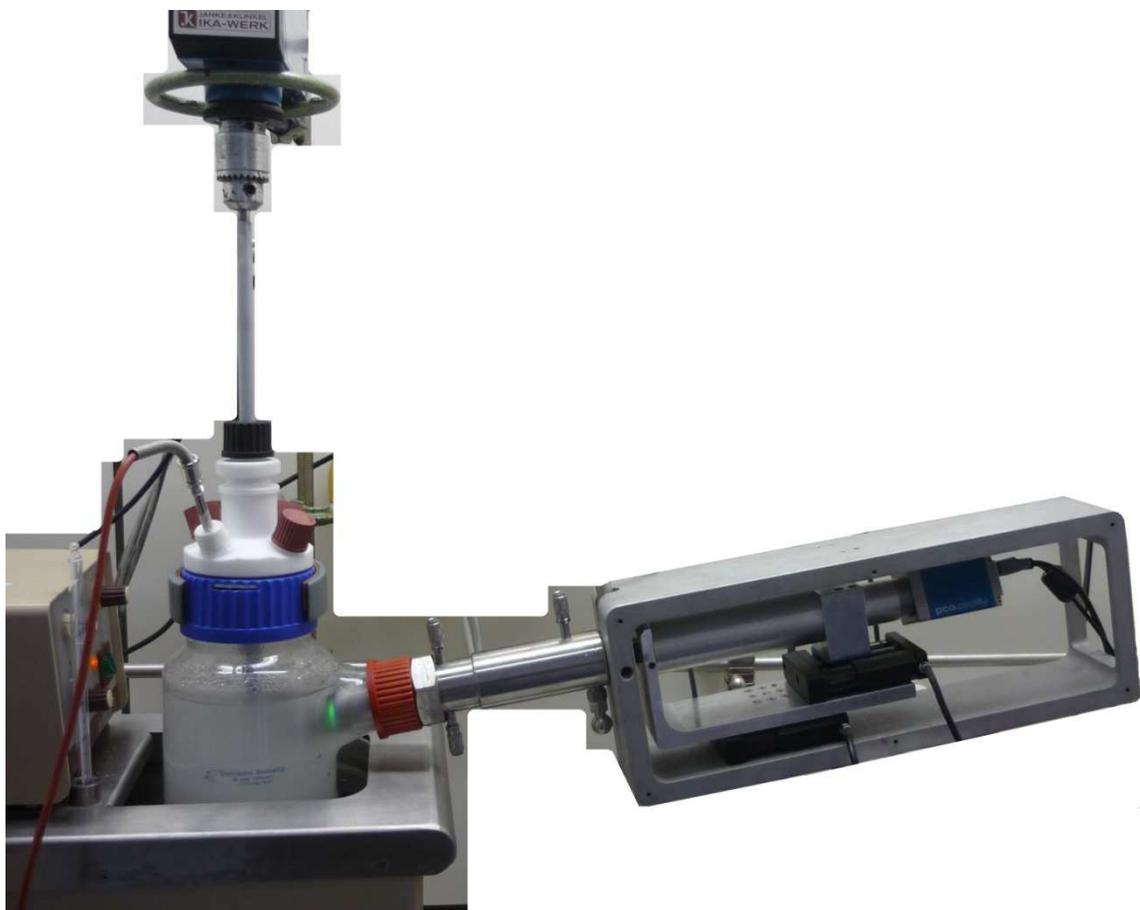


Abb. 26: Versuchsaufbau für die Überwachung enzymatischer Abbauprozesse von Cellulose, Links ist der Glasreaktor mit angeschlossnem Rührer zu sehen. Das ISM-TT ist über einen 25 mm Port an den Reaktor angeschlossen.

5.4.4 Referenzmessung ohne Enzymzugabe

Um den Einfluss des Rührens auf die Cellulosefasern zu untersuchen, wird ein Referenzversuch ohne Enzymzugabe durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 27 dargestellt.

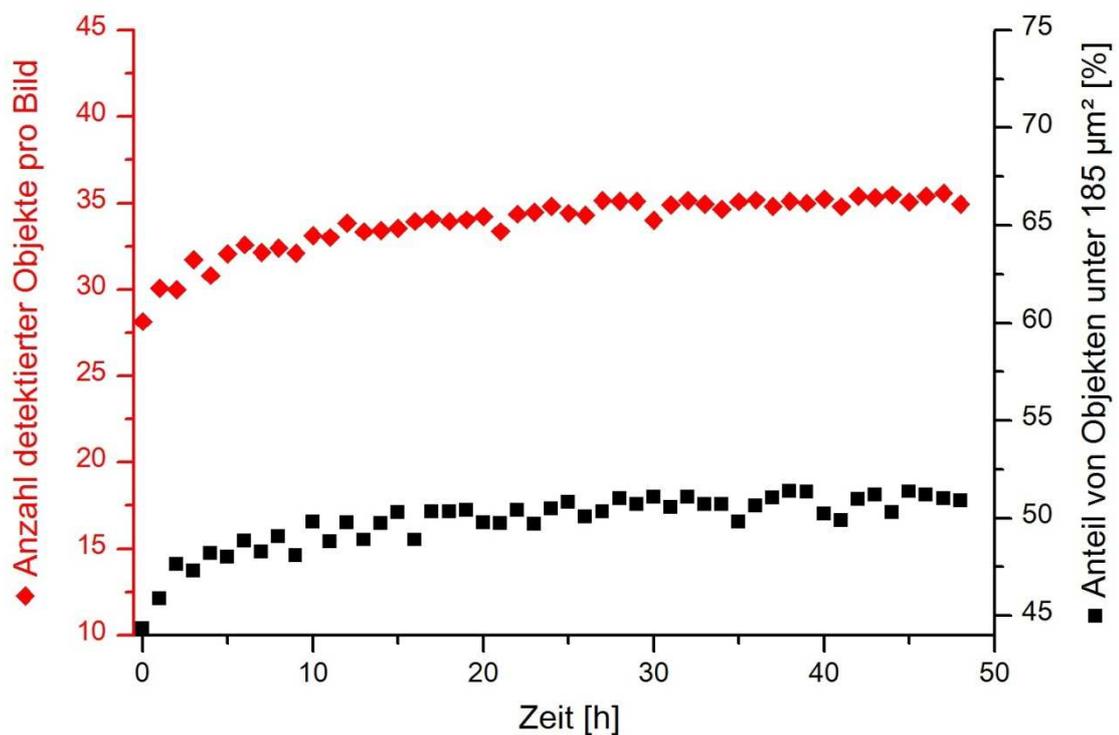


Abb. 27: Einfluss des Rührers auf die Anzahl detektierter Objekte und den Anteil kleiner Partikel.

In den ersten Stunden in denen die Cellulosefasern gerührt werden, steigt sowohl die Anzahl detektierter Objekte pro Aufnahme, als auch der Anteil von Partikeln unter $185 \mu\text{m}^2$ leicht an. Die Zunahme ist zu Beginn des Versuches am stärksten. Hier werden Celluloseagglomerate durch den Rührer zerschlagen. Dadurch vereinzeln sich die Cellulosefasern, was einen leichten Einfluss auf die Größenverteilung hat. Nach einem Tag Rühren verändern sich die Werte nicht weiter, sondern schwanken im Falle der Anzahl detektierter Objekte pro Bild mit einer Standardabweichung von 0,37 um einen Mittelwert von 35. Im Falle des Anteils von Objekten unter $185 \mu\text{m}$ schwanken die Werte nach 24 h mit einer Standardabweichung von 0,46% um einen Mittelwert von 50,7%. Damit liegt in beiden Fällen der prozentuale Fehler der Messung bei 1%.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird darauf geachtet, dass bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen vor der Enzymzugabe immer gleich lange gerührt wird. Um den Einfluss des Rührers gering zu halten und dennoch eine zügige Versuchsdurchführung zu gewährleisten, wird entschieden bei jedem Versuch eine Vorlaufzeit von 2 h mit angeschaltetem Rührer durchzuführen.

5.4.5 Enzymatische Hydrolyse mit Rohament CL

Die enzymatische Hydrolyse von Cellulose mit Rohament CL wird mit dem beschriebenen Versuchsaufbau untersucht. Zusätzlich zur Überwachung mit dem ISM-TT wird in Abständen von 4 h die Glukosekonzentration des Prozessmediums bestimmt. Hierfür werden Proben aus dem Reaktor mit einem YSI 2700 Biosensor (Yellow Springs, USA) untersucht. Eine grafische Darstellung aller Ergebnisse ist in Abb. 28 zu sehen.

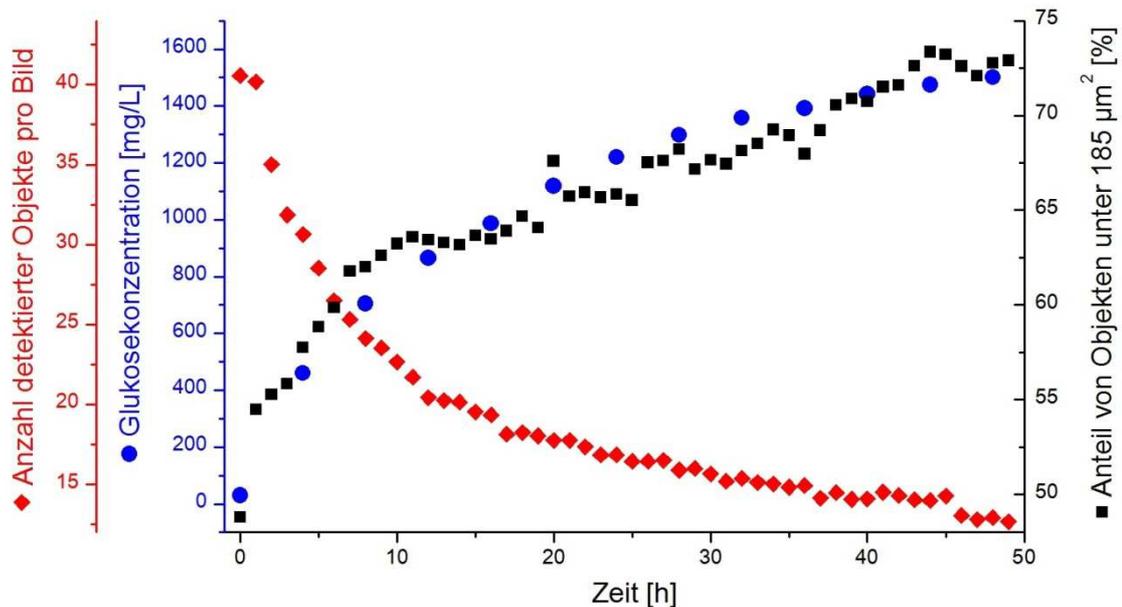


Abb. 28: Überwachung einer enzymatischen Cellulosehydrolyse mit Rohament CL; 50°C; 2,5 g/l Substrat; 0,125 g/l Enzym.

Wie erwartet nimmt die Anzahl detektierbarer Objekte im Versuchsverlauf ab. Hierzu trägt bei, dass mit dem *CelluloseAnalyzer* mit den gewählten Parametern Objekte mit Flächen unter $32 \mu\text{m}^2$ ($\cong 75$ Pixel) nicht mehr erkannt werden. Weiter ist zu beobachten, dass der Abbau der Objekte zu Beginn des Versuchs sehr schnell abläuft. Im weiteren Versuchsverlauf schwächt sich der Trend ab und die Zahl detektierbarer Objekte nimmt langsamer ab. Der Anteil von Objekten unter $185 \mu\text{m}^2$ und die Glukosekonzentration nehmen über die gesamte Versuchsdauer zu. Auch hier ist zu beobachten, dass die Zunahme zu Versuchsbeginn besonders stark ist und im weiteren Verlauf schwächer wird.

Ein Grund für die sinkende Reaktionsgeschwindigkeit könnte die im Laufe des Versuchs abnehmende Substratkonzentration sein. Möglicherweise liegt auch eine Produktinhibierung vor. In der Literatur sind inhibierende Effekte von Cellobiose und Glukose auf Cellulasen beschrieben [Mandels et al., 1965]. Beides sind Produkte die bei der Hydrolyse von Cellulose anfallen.

Die in Abb. 28 dargestellten Ergebnisse des Bildverarbeitungsalgorithmus lassen sich auch anhand der Originalbilddaten nachvollziehen. Abb. 29 zeigt ISM-Aufnahmen vor der Enzymzugabe sowie nach 24 h und 48 h Versuchsdauer.

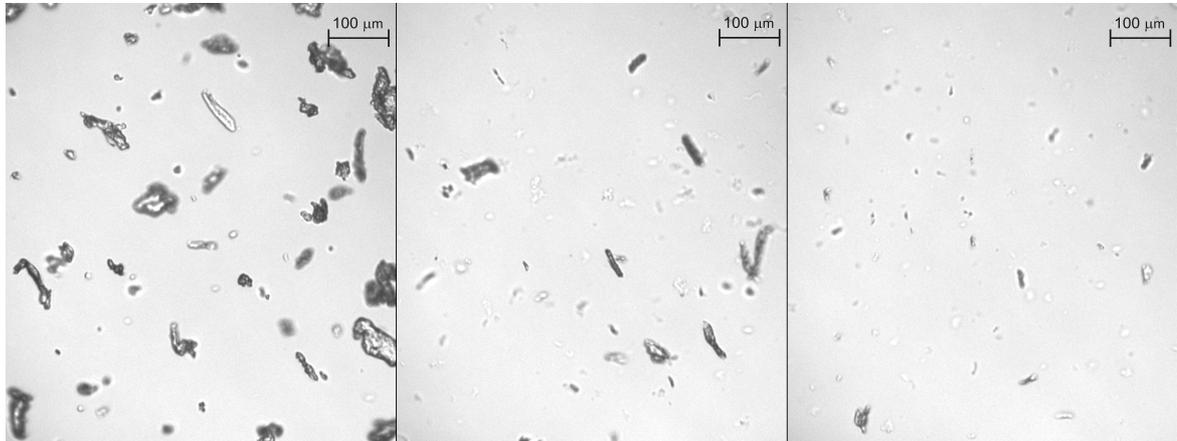


Abb. 29: ISM-Bilder von ARBOCEL BE 600-10 TG. Links vor Enzymzugabe, in der Mitte nach 24-stündiger und rechts nach 48-stündiger Hydrolyse mit Rohament CL.

Vor der Enzymzugabe sind viele große Cellulosefasern zu erkennen. Im nach 24-stündiger Hydrolyse aufgenommenen Bild sind nur noch wenige große Faser und dafür mehr kleine erkennbar. Einige kleine Fasern setzen sich nur sehr schwach vom Bildhintergrund ab. Diese werden vom Bildverarbeitungsalgorithmus nicht erkannt, was dazu führt, dass die Anzahl detektierbarer Objekte sinkt. Im nach 48-stündiger Hydrolyse aufgenommenen Bild rechts sind schließlich nur noch sehr kleine Objekte erkennbar.

5.4.6 Enzymatische Hydrolyse mit Ecostone C1

Der enzymatische Abbau von Cellulose wird mit Ecostone C1 wiederholt und die Prozessüberwachung wie für den oben beschriebenen Versuch durchgeführt. Da Ecostone C1 im Gegensatz zu Rohament CL die Cellulose nur teilweise abbaut, wird erwartet, dass sich der Verlauf der überwachten Werte deutlich von den oben beschriebenen Ergebnissen unterscheidet. Die Ergebnisse der Überwachung des enzymatischen Abbaus mit Ecostone C1 sind in Abb. 30 grafisch dargestellt.

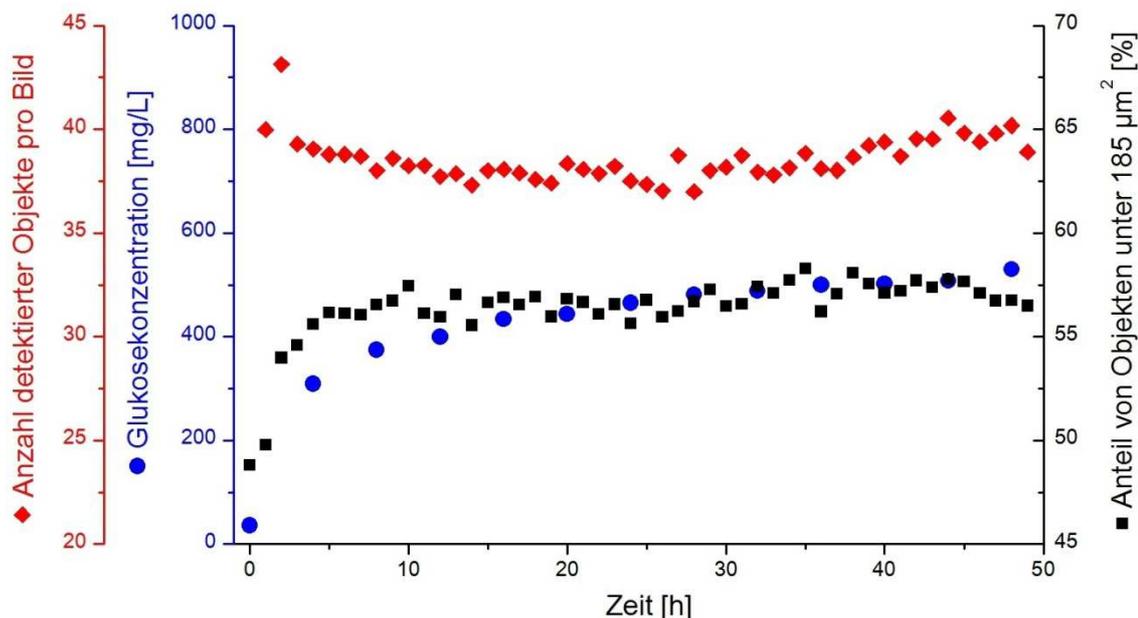


Abb. 30: Überwachung einer enzymatischen Cellulosehydrolyse mit Ecostone C1; 50°C; 2,5 g/l Substrat; 0,125 g/l Enzym.

Es ist zu erkennen, dass zu Beginn des Versuchs der Anteil von Objekten unter 185 µm² und die Glukosekonzentration steigen. Nach 10 h stagniert der Anteil von Objekten unter 185 µm². Die Glukosekonzentration steigt nach 10 h nur noch sehr langsam und die Anzahl detektierter Objekte bleibt über den gesamten Versuchverlauf nahezu konstant.

Der Prozessverlauf des enzymatischen Abbaus mit Ecostone C1 unterscheidet sich damit vom Prozessverlauf des enzymatischen Abbaus mit Rohament CL. Die Anzahl detektierter Objekte sinkt beim unvollständigen Abbau mit Ecostone C1 nicht wie beim vollständigen Abbau mit Rohament CL. Zum Ende des Versuchs liegt beim Abbau mit Ecostone C1 der Anteil von Objekten unter 185 µm² etwa 20% niedriger und die Glukosekonzentration erreicht nur etwa ein Drittel der Konzentration, die beim Abbau durch Rohament CL erreicht wird.

Die Unterschiede im Prozessverlauf werden auch in den ISM-Aufnahmen deutlich. In Abb. 31 sind ISM-Aufnahmen vor der Enzymzugabe sowie nach 24 h und 48 h enzymatischer Hydrolyse mit Ecostone C1 zu dargestellt.

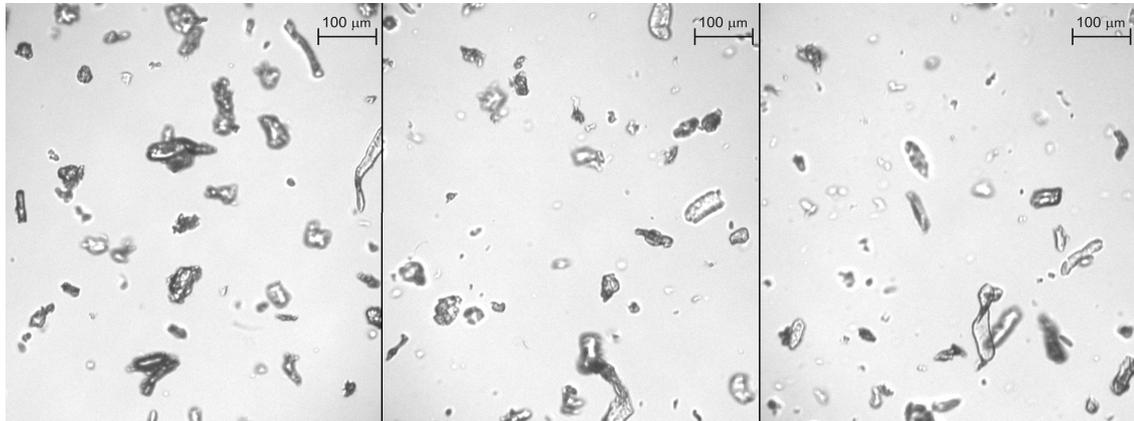


Abb. 31: ISM-Bilder von ARBOCEL BE 600–10 TG. Links vor Enzymzugabe, in der Mitte nach 24-stündiger und rechts nach 48-stündiger Hydrolyse mit Ecostone C1.

Vor der Enzymzugabe sind viele große Cellulosefasern zu erkennen. Diese werden im Vergleich zur Hydrolyse mit Rohament CL nicht vollständig abgebaut und sind auch auf den Aufnahmen der späteren Zeitpunkte zu sehen. Weiter sind viele sehr kleine Fasern zu sehen, die sich nur schwach vom Bildhintergrund absetzen. Aufgrund ihrer Größe werden nicht alle dieser kleinen Objekte erkannt, was dazu führt, dass die Gesamtzahl der erkannten Objekte im Versuchsverlauf konstant bleibt.

5.4.7 Vergleich mit Laserbeugungsspektroskopie

Um die mit dem ISM beobachteten Dichteverteilungen mit einer etablierten Technik zur Partikelgrößenbestimmung vergleichen zu können, werden Messungen mittels Laserbeugungsspektroskopie durchgeführt.⁷ Die ISM-Daten werden so generiert, dass in der Dichteverteilung jeder Datenpunkt einen gleichgroßen Flächenbereich von $10 \mu\text{m}^2$ abdeckt. Die mittels LBS erhaltenen Datenpunkte beziehen sich auf verschieden große Flächenbereiche. Daher werden diese in einem ersten Schritt anhand der folgenden Formel auf den ISM-Flächenbereich normiert, um die ISM-Ergebnisse mit denen der LBS vergleichen zu können:

$$\text{Normierter Anteil} = \frac{10 \mu\text{m}^2}{\text{vermessener Flächenbereich}} \times \text{gemessener Anteil} \quad (15)$$

⁷ Diese Messungen wurden vom Institut für Feststoffverfahrenstechnik und Partikeltechnologie der Technischen Universität Hamburg-Harburg durchgeführt.

Anhand der normierten Daten werden die Ergebnisse von LBS und ISM-TT verglichen. In Abb. 32 sind mit LBS und ISM-TT bestimmten Dichteverteilungen von un-behandelten Cellulosefasern dargestellt.

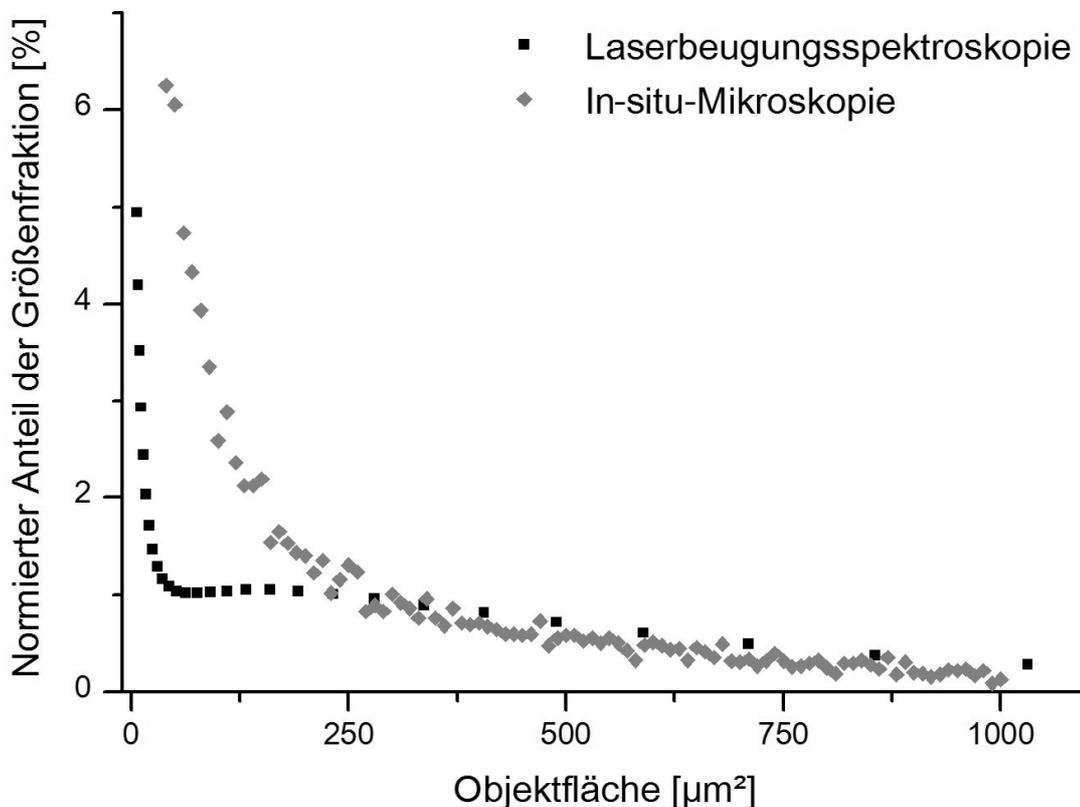


Abb. 32: Vergleich von mittels LBS und ISM-TT ermittelten Dichteverteilungen der Cellulosefasern.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass das ISM-TT im Bereich kleiner Objektgrößen mehr Objekte und dafür im Bereich großer Objektgrößen weniger Objekte erkennt als die LBS. Ein möglicher Grund für diese Abweichungen liegt in der Verarbeitung der Bilddaten. Der *CelluloseAnalyzer* ist so programmiert, dass auch Cellulosefasern, die nicht mit ihrer kompletten Fläche im Aufnahmebereich liegen, in die Auswertung mit einbezogen werden, um die Datengrundlage für die Auswertung zu erhöhen. Dies ist für eine exakte Bestimmung der Dichteverteilung nachteilig, da Cellulosefasern, die nicht komplett aufgenommen werden, in der Auswertung kleiner erscheinen als sie tatsächlich sind.

Um den Einfluss der Bildverarbeitung zu untersuchen, wird der *CelluloseAnalyzer* umprogrammiert, so dass Objekte, die den Rand der Aufnahmen berühren, nicht für die weitere Analyse berücksichtigt werden. Aus den hiermit erhaltenen Ergebnissen werden erneut Dichteverteilungen berechnet und mit den zuvor erhaltenen Dichteverteilungen verglichen. In Abb. 33 ist ein solcher Vergleich grafisch dargestellt.

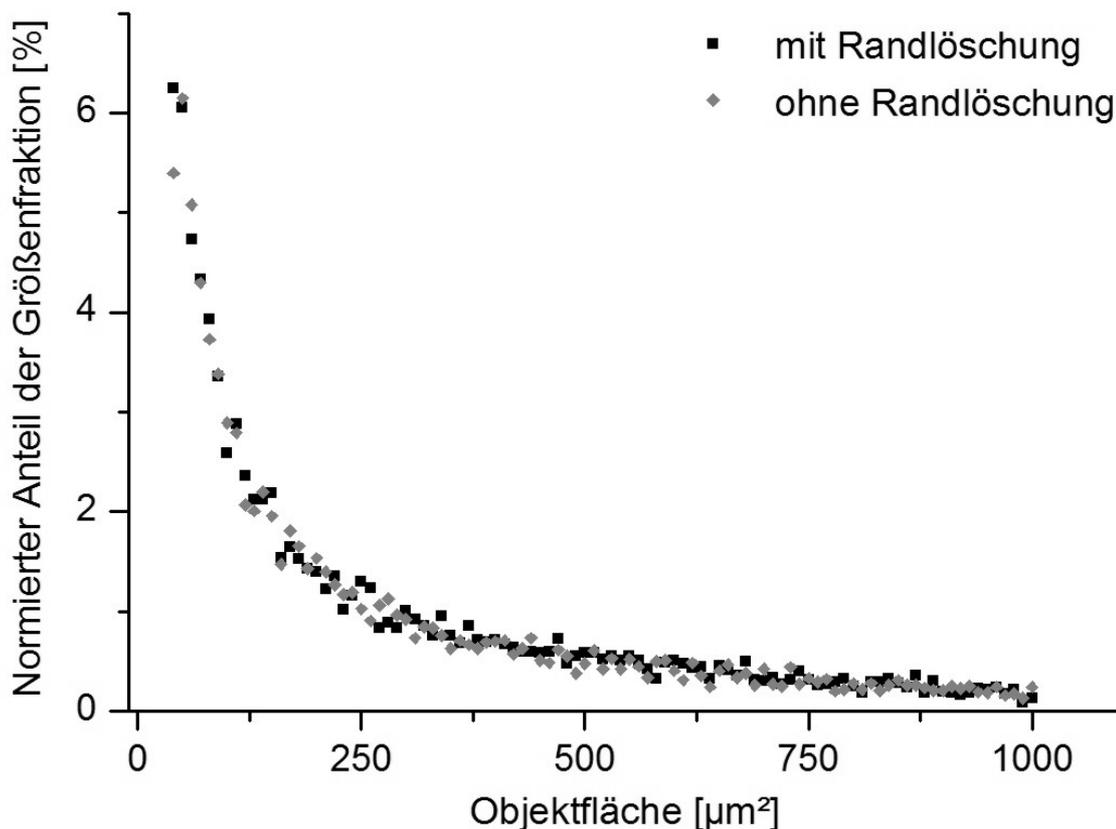


Abb. 33: Vergleich der mit mittels ISM-TT ermittelten Dichteverteilungen von Cellulosefasern mit und ohne Randlöschung im *CelluloseAnalyzer*.

In Abb. 33 ist zu erkennen, dass die Löschung der Randobjekte nur sehr geringen Einfluss auf die Dichteverteilung hat. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen von ISM-TT und Laserbeugungsspektroskopie muss also eine andere Ursache haben. Möglicherweise können kleinere Objekte einfacher ins Innere der Messzone vordringen als große Objekte. Da das Volumen in der Messzone dann nicht mehr dem Volumen im Reaktor gleicht, wird das Ergebnis der ISM-Messung verzerrt.

Um zu untersuchen, ob das In-situ-Mikroskop, trotz dieser Abweichungen, den Trend von großen hin zu kleinen Objekten messen kann, wird ein weiterer Vergleich zwischen ISM- und LBS-Messungen durchgeführt. Hierfür werden Werte von Dichteverteilungen, die vor einer Enzymzugabe aufgenommen wurden, mit Werten von Dichteverteilungen, die nach einer 48-stündigen Hydrolyse mit Rohament CL aufgenommen wurden, verwendet. Um den Trend der Dichteverteilungen herauszuarbeiten wird die Differenz der Anteile der Größenfraktionen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Differenz [\%]} = \text{Anteil nach der Reaktion [\%]} - \text{Anteil vor der Reaktion [\%]} \quad (16)$$

In Abb. 34 sind die Differenzen aller Größenfraktionen die mittels In-situ-Mikroskopie und LBS ermittelt wurden dargestellt.

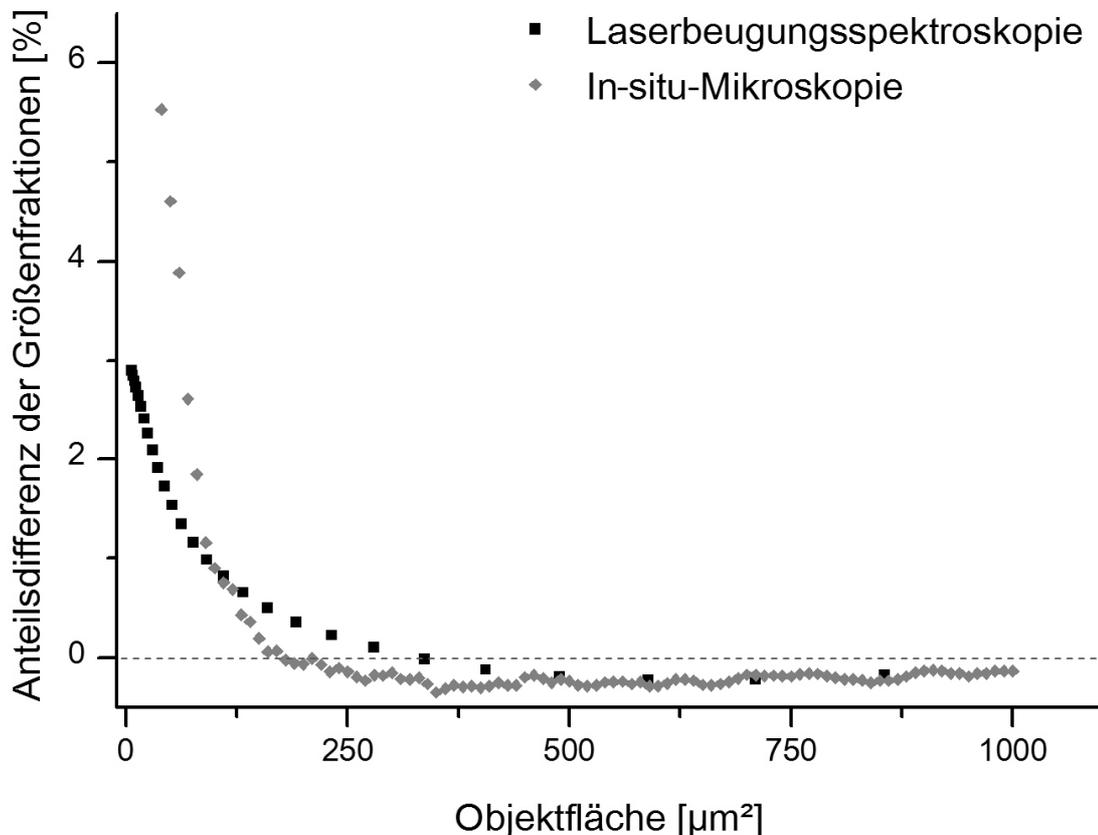


Abb. 34: Vergleich der Anteilsdifferenzen von Dichteverteilungen die mittels In-situ-Mikroskopie und LBS vor und nach 48-stündiger Hydrolyse mit Rohament CL ermittelt werden; 50°C; 2,5 g/l Substrat; 0,125 g/l Enzym.

In obigem Graphen stehen Werte über 0% für einen steigenden Anteil der Größenfraktion, während Werte unter 0% einen sinkenden Anteil anzeigen. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass mit beiden Methoden die Tendenz des steigenden Anteils kleiner und des gleichzeitig sinkenden Anteils großer Objekte beobachtet werden kann. Dennoch weichen die Ergebnisse der beiden Methoden voneinander ab. Das ISM-Ergebnis ergibt, dass der Anteil von Objekten von über 185 μm^2 im Versuchsverlauf abnimmt, während der Anteil von Objekten mit kleineren Flächen zunimmt. Mit der LBS wird die Objektfläche, oberhalb derer der Anteil der Größenfraktion abnimmt, als 235 μm^2 ermittelt.

Die In-situ-Mikroskopie kann demnach für die Überwachung von Veränderungen der Größenprofile von Cellulosefasern während enzymatischer Abbauprozesse verwendet werden. Eine exakte Bestimmung von Größenverteilungen im Größenbereich unter 500 μm^2 ist derzeit jedoch nicht möglich.

5.5 Überwachung von CHO-Zellkultivierungsprozessen

Im Folgenden werden die Einsatzmöglichkeiten des ISM-TT anhand der Überwachung von CHO-Zellkultivierungen demonstriert. Ihre Untersuchung ist von besonderem Interesse, da die biotechnologische Produktion von therapeutischen Proteinen hauptsächlich in Säugetierzellkulturen durchgeführt wird. Diese Zellen sind in der Lage biologisch aktive Proteine mit den notwendigen posttranslationalen Modifikationen herzustellen. *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen sind besonders geeignet, da sie in Hochzelldichte- und Suspensionskultur gehalten werden können. Knapp 70% aller rekombinant hergestellten Proteine wurden 2007 in CHO-Zellen hergestellt [Jayapal et al., 2007].

Das ISM-TT wird für die Überwachung von Zelldichte und Zellmorphologie eingesetzt. Informationen zur Durchführung der Zellkultivierungen und der Prozessanalytik sind im Anhang (Abschnitt 9.5) zu finden. Um die aufgenommenen Bilddaten verarbeiten zu können, werden geeignete Bildverarbeitungsalgorithmen entwickelt, die im Folgenden beschrieben werden.

5.5.1 Entwicklung des *CHOAnalyzer* Algorithmus

Für die Verarbeitung der ISM-Daten kann der Algorithmus *Live and Death* verwendet werden [Abel, 2009]. Dieser ist jedoch nicht in der Lage Zellcluster zu erkennen und auf die Zahl der im Cluster vorliegenden Zellen zu schließen. Dadurch wird die Zelldichtebestimmung, besonders im Bereich hoher Zelldichten, verzerrt. Darüber hinaus werden die Zellen mit diesem Algorithmus größer detektiert als sie tatsächlich sind. Für eine optimierte Auswertung wird daher der Bildverarbeitungsalgorithmus *CHOAnalyzer* entwickelt.⁸ Die einzelnen Schritte des Algorithmus werden im Folgenden erläutert.

1. Kantendetektion: Die Kanten von Objekten werden anhand von Grauwertgradienten bestimmt. Dafür kommt der Canny Algorithmus zum Einsatz [Canny, 1986].
2. Canny-Normierung: Der Grauwert jeder Kante wird an den maximalen Grauwert der Kante angeglichen. Auf diese Weise werden Kontrastunterschiede an zusammenliegenden Kanten verhindert. Nun werden alle Kanten, deren Grauwertgradient unter einem bestimmten Schwellenwert liegt, gelöscht. Dieser Schritt ist nötig, um nahe beieinander liegende Zellen wie in Abb. 35 dargestellt voneinander unterscheiden zu können.

⁸ Die Erarbeitung und Implementierung des Algorithmus in C# wurden im Rahmen der vom Autor betreuten Masterarbeit von Bernd Tscheschke durchgeführt [Tscheschke, 2011].



Abb. 35: Canny Normierung: Originalbild (A), Bild nach Kantendetektion mit Canny (B), Bild nach Canny Normierung (C).

3. Erkennung von geschlossenen Objekten: Entsteht nach den vorigen Schritten eine Kante, die ein geschlossene Form bildet, wird die umschlossene Fläche inklusive der Kante als Objekt erkannt. Erkannte Objekte werden in einer Liste gespeichert und aus dem Zwischenbild gelöscht.
4. Erkennung von nicht-geschlossenen Objekten: Alle im Zwischenbild verbliebenen Kanten bilden keine geschlossenen Formen. Auf jede dieser Kanten wird die Methode *Closing* aus *Aforge.NET* angewendet. Hierbei wird jede Kante um einen Pixel in jede Richtung erweitert (Dilation). Anschließend werden die äußeren Pixel jeder Kante wieder gelöscht (Erosion). Zusammenhängende Kanten werden dabei nicht getrennt. Auf diese Weise werden Kanten mit einem Abstand von bis zu zwei Pixeln verbunden. Werden hierdurch Kanten gebildet, die eine geschlossene Form bilden wird die umschlossene Fläche inklusive der Kante als Objekt erkannt. Erkannte Objekte werden in einer Liste gespeichert [Online 7].
5. Bearbeitung der geschlossenen Objekte: Auf alle Objekte, die in Schritt 3 erkannt wurden, wird die *Closing* Methode ebenfalls angewendet. Dies ist nötig, um Fehlerkennungen wie im linken Bild von Abb. 36 zu vermeiden.

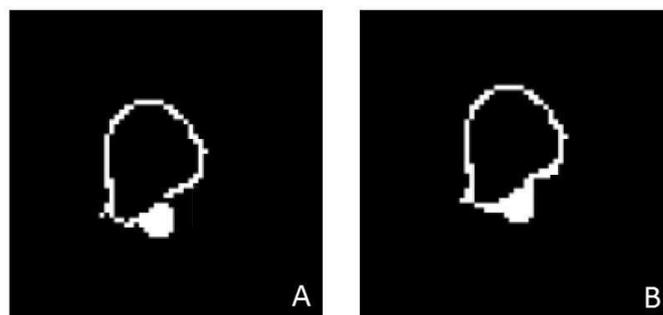


Abb. 36: Bearbeitung der geschlossenen Objekte: Das in A dargestellte Objekt besitzt am unteren Ende einen kleinen Bereich der eine geschlossene Form bildet. Erst durch die Anwendung der Methode *Closing* wird das Gesamtobjekt richtig erkannt.

6. Listenkombination: Die beiden Objektlisten werden zusammengeführt. Die entstehende Liste enthält alle erkannten Zellobjekte.

7. Objektfüllung: Viele der detektierten Objekte sind teilweise geschlossene Formen wie in Abb. 36 dargestellt. Um diese Objekte ebenfalls komplett zu füllen, wird die Dilation der *Closing*-Methode fünfmal hintereinander ausgeführt. Nun umschlossene Flächen werden ausgefüllt. Anschließend wird fünfmal die Erosion der *Closing*-Methode durchgeführt. Der Einfluss dieses Schrittes auf ein teilweise geschlossenes Objekt ist in Abb. 37 zu erkennen.

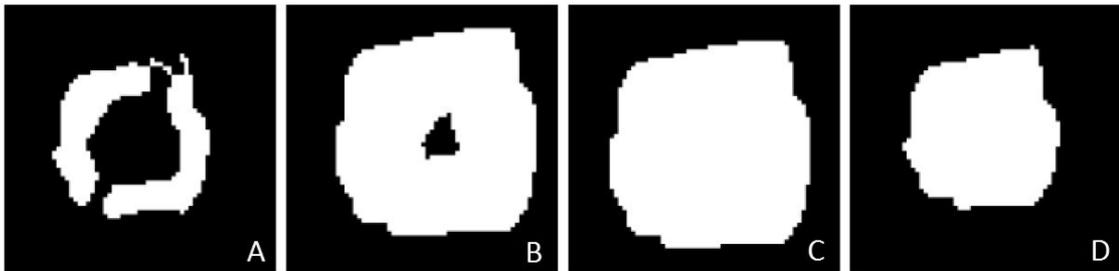


Abb. 37: Objektfüllung: Listenobjekt vor der Füllung (A), Objekt nach 5-facher Dilation (B), Objekt nach Füllungsschritt (C), Objekt nach 5-facher Erosion (D). Der Flächeninhalt von D liegt weitaus näher an der Fläche der untersuchten Zelle als der Flächeninhalt von A.

8. Ausgabe der Ergebnisse: Alle erkannten Objekte werden in ihrer bearbeiteten Form im Originalbild markiert. Ein Beispiel eines auf diese Weise entstehenden Resultatbild ist in Abb. 38 zu sehen. Darüber hinaus werden die Objekte mit den berechneten Eigenschaften sowie die Anzahl der insgesamt detektierten Zellen in einer Tabelle ausgegeben.

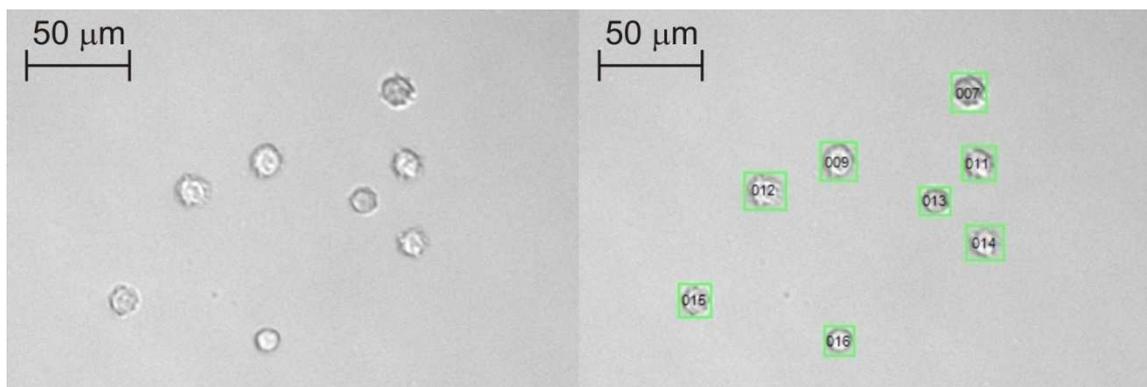


Abb. 38: Ausschnitt einer Original ISM-Aufnahme (links) und Resultatbild nach Bearbeitung mit dem *CHOAnalyzer* (rechts).

Die erkannten Zellen werden im Resultatbild farbig markiert und mit einer laufenden Nummer versehen. Im oben gezeigten Ausschnitt werden alle 8 CHO-Zellen vom Bildverarbeitungsalgorithmus erkannt. Im Vergleich zum bereits existieren-

den Algorithmus *Life and Death* wird eine um 15% genauere Bestimmung der Zellfläche erreicht.

5.5.2 Überwachung der Zelldichte von CHO-Zellkultivierungen

Prinzipiell ist es möglich die Zelldichte von Zellkulturen direkt anhand der Anzahl durchschnittlich pro ISM-Aufnahme detektierten Zellen zu berechnen, wenn die exakte Messzonentiefe bekannt ist. Dafür wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Zelldichte} = \frac{\text{Anzahl der durchsch. pro Bild detektierten Zellen}}{\text{Aufsichtsfläche des Mikroskops} \times \text{Messzonentiefe}} \quad (17)$$

Mit den neuen Lineartischen kann eine Position zwar reproduzierbar angefahren werden, bei jedem neuen Zusammensetzen des Mikroskops kann es jedoch zu leichten Verschiebungen der Bauteile untereinander kommen. Da es schwierig ist, die Tiefe der Messzone exakt zu bestimmen und sich bereits kleinere Abweichungen in gravierenden Unterschieden in der Zelldichte niederschlagen, muss in einer Kalibration die tatsächliche Messzonentiefe bestimmt werden. Hierfür können beliebige Zellsuspensionen mit definierter, niedriger Zelldichte verwendet werden. Nach Umstellen von Formel (17) ergibt sich:

$$\text{Messzonentiefe} = \frac{\text{Anzahl der durchsch. pro Bild detektierten Zellen}}{\text{Aufsichtsfläche des Mikroskops} \times \text{Zelldichte}} \quad (18)$$

Vor jeder Anwendung des ISM-TT wird eine Kalibration der Messzonentiefe mit mindestens 5 Messpunkten durchgeführt. Wird das Mikroskop für weitere Experimente verwendet, ohne auseinandergebaut zu werden, kann die Kalibration entfallen.

Das ISM-TT und der Bildverarbeitungsalgorithmus *CHOAnalyzer* werden verwendet, um die Zelldichte einer CHO-Zellkultivierung über ihren gesamten Verlauf zu überwachen. Hierfür werden CHO-K1 Zellen in einem 2 l-Bioreaktor in TC-42 Medium (Teutocell, Bielefeld) mit einem Zusatz von 8 mM L-Glutamin kultiviert. Das Animpfen des Reaktors erfolgt aus einer Vorkultur in exponentieller Phase mit einer Animpfdichte von 4×10^5 Zellen/ml. Weitere Informationen zum Kultivie-

rungsprozess, sowie die Einstellungen für die ISM-Steuersoftware und die Bildverarbeitungssoftware sind im Anhang (Abschnitt 9.5) zu finden.⁹

Als Referenzanalytik werden Proben aus dem Reaktor mithilfe einer Neubauer-Zählkammer manuell ausgezählt. In Abb. 39 werden die Ergebnisse der manuellen Auszählung mit aufgezeichneten Werten des ISM-TT verglichen.

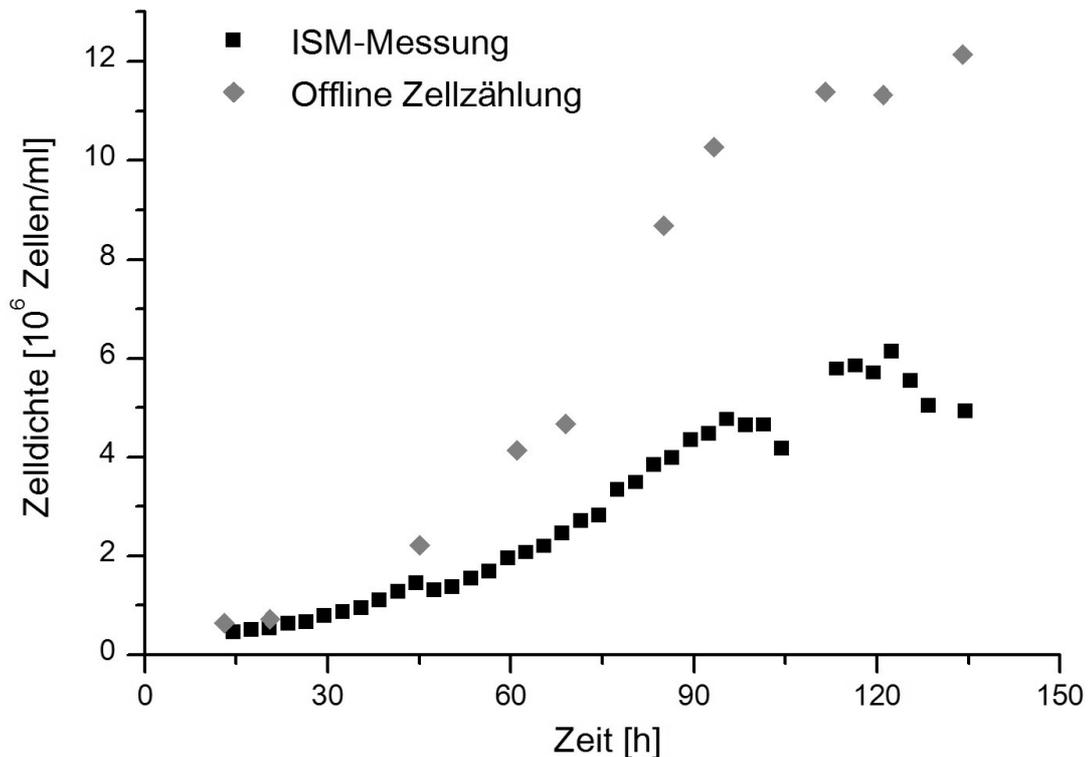


Abb. 39: Vergleich der Zelldichtebestimmung mit ISM-TT und Neubauer-Zählkammer.

Zu Beginn des Versuchs stimmen die mittels In-situ-Mikroskopie bestimmten Zelldichten noch gut mit den durch manuelle Auszählung bestimmten Werten überein. Bei Zelldichten von über 2×10^6 Zellen/ml ergeben sich Abweichungen zwischen den beiden Messmethoden, die im Laufe der Kultivierung immer größer werden. Nach einer Kultivierungsdauer von 105 h fehlen ISM-Messpunkte. Hier können die aufgenommenen Bilder nicht sinnvoll ausgewertet werden, da die Messzone komplett durch Zellagglomerate verblockt wird.

Die niedrigen Messwerte des ISM-TT werden zum Teil durch eine unzureichende Bildanalyse des *CHOAnalyzers* hervorgerufen. Bei der Untersuchung der durch den Algorithmus erzeugten Resultatbilder fällt auf, dass Zellcluster oft nur als einzelne Zelle detektiert werden. Daher wird, um die Bildverarbeitung zu optimieren, die

⁹ Die Kultivierung und die Prozessüberwachung wurden im Rahmen der vom Autor betreuten Masterarbeit von Bernd Tscheschke durchgeführt [Tscheschke, 2011].

optionale Funktion Clustererkennung in den *CHOAnalyzer* aufgenommen. Hierbei wird folgender Schritt vor der Ausgabe der Ergebnisse durchgeführt.

Optionale Clustererkennung: Alle Objekte mit einer Größe von über $205 \mu\text{m}^2$ und einer Exzentrizität von über 3,2 werden als Zellcluster erkannt. Die Exzentrizität berechnet sich wie in Formel (8) beschrieben. Aus allen Objekten, die nicht zu Clustern gehören, wird die durchschnittliche Zellgröße berechnet. Die Anzahl an Zellen in jedem Zellcluster wird vom Algorithmus anhand der folgenden Formel abgeschätzt. Dabei wird auf ganze Zahlen gerundet.

$$\text{Zellen im Cluster} = \frac{\text{Clusterfläche}}{\text{durchschnittl. Zellfläche}} \quad (19)$$

Um den Einfluss der Clustererkennung auf das Ergebnis der Bildverarbeitung zu ermitteln, werden Zellcluster in 100 ISM-Bildern manuell ausgezählt und die Ergebnisse mit denen des *CHOAnalyzers* verglichen.

Ohne Clustererkennung werden mit 62% über die Hälfte der in Clustern vorliegenden Zellen nicht erkannt. Mit der Clustererkennung werden nur noch 22% dieser Zellen nicht erkannt. Durch diese Optimierung nähert sich die mittels ISM-TT bestimmte Zelldichte den bestimmten Werten an. Bei hohen Zelldichten liegen die Werte dennoch weit auseinander. Dies kann durch bauliche Probleme am ISM-TT ausgelöst werden. Bei hohen Zelldichten können sich Zellen vor dem Eingang der Messzone sammeln und diese verblocken. Diese Vermutung wird durch die bei einer Kultivierungsdauer von 105 h beobachteten Probleme gestützt.

Aufgrund dieser Vermutung wird für weitere Experimente die neue Option „Auffahren zwischen Aufnahmezyklen“ in die Steuersoftware *InsituControl* aufgenommen. Zwischen den einzelnen Aufnahmezyklen kann die Messzone des ISM-TT hiermit 3 mm weit aufgefahren werden. Zellagglomerate können diese nun passieren und verblocken die Messzone beim Start des nächsten Zyklus nicht mehr. Dadurch sollen die Messungen des ISM-TT präziser und zuverlässiger werden.

Neben der Optimierung von ISM-TT und Auswertungsalgorithmus soll auch die Referenzanalytik verbessert werden. Die manuelle Auszählung per Neubauer-Zählkammer ist fehleranfällig und liefert selbst nur ungenaue Werte. Daher wird für die weiteren Experimente mit dem Cellometer Auto T4 Cell Counter (Nexcelom, Lawrence, USA) ein automatischer Zellzähler für die Bestimmung der Zelldichte verwendet.

5.5.3 Optimierte Überwachung der Zelldichte von CHO-Zellkultivierungen

Die im vorigen Abschnitt erarbeiteten Optimierungsmaßnahmen für das ISM-TT, die Bildverarbeitung und die Referenzanalytik werden umgesetzt. Um die Verbesserungen bewerten zu können, wird die Zelldichte einer weiteren CHO-Kultivierung mit dem neuen System überwacht. Hierfür werden CHO-K1 Zellen in einem Biostat C plus 10 l Reaktor (Sartorius AG, Göttingen) in TC-42 Medium mit einem Zusatz von 8 mM L-Glutamin kultiviert. Das Animpfen des Reaktors erfolgt aus einer Vorkultur in exponentieller Phase mit einer Animpfdichte von 4×10^6 Zellen/ml. Weitere Informationen zum Kultivierungsprozess, sowie die Einstellungen für die ISM-Steuersoftware und die Bildverarbeitungssoftware sind im Anhang (Abschnitt 9.5) zu finden.

In Abb. 40 werden die Ergebnisse der Zelldichtebestimmungen des ISM-TT und der offline Analytik miteinander verglichen.

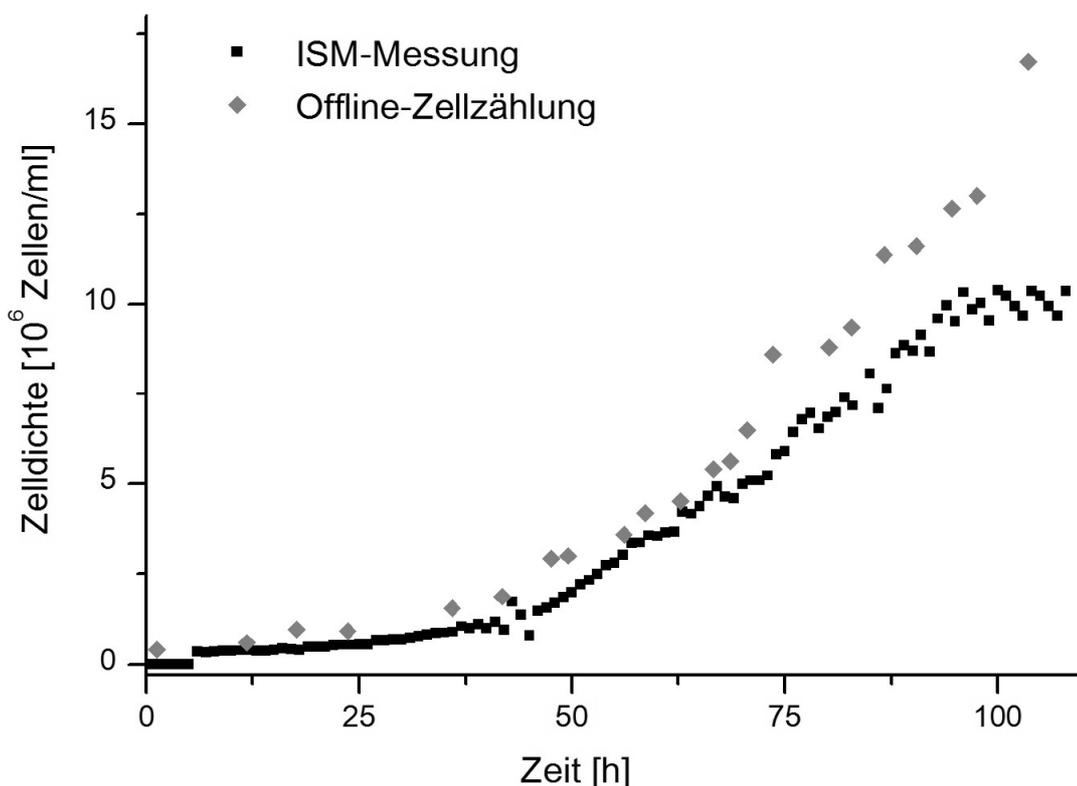


Abb. 40: Vergleich der Zelldichtebestimmung mit optimiertem ISM-TT und Cellometer.

Wie aus der Abbildung zu erkennen ist, sorgen die Verbesserungen dafür, dass die Zelldichte der CHO-Kultivierung in einem breiteren Zelldichtebereich verlässlich bestimmt werden kann. Bis zu einer Zelldichte von 6×10^6 Zellen/ml weichen die Ergebnisse der beiden Messmethoden kaum voneinander ab. Bei höheren Zelldich-

ten werden durch das ISM-TT wieder kleinere Zelldichten detektiert als mit der Referenzanalytik. Ab einer Zelldichte von über 1×10^7 Zellen/ml stagniert die vom ISM-TT bestimmte Zelldichte und die Abweichungen zur Referenzanalytik werden sehr groß. Darüber hinaus nimmt auch die Streuung der ISM-Messwerte zu.

Zum Teil werden diese Effekte durch die nicht erkannten Zellen in Zellclustern ausgelöst. Dieses Problem kann durch die Optimierung des Algorithmus zwar minimiert, jedoch nicht vollständig gelöst werden. Je höher die Zelldichte ist, je wahrscheinlicher werden Zellen in Clustern aufgenommen. Dadurch wird der Fehler bei steigender Zelldichte immer größer.

Dies allein kann nicht die vollständige Stagnation der Zelldichte bei 1×10^7 Zellen/ml erklären. Hier kommt vermutlich ein zweiter Effekt zum Tragen. Bei zunehmender Zelldichte steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Zellen zusammenhängend aufgenommen werden und das Konglomerat dabei den Rand des Bildes berührt. Da im Algorithmus eine vollständig geschlossene Fläche die Voraussetzung für die Detektion eines Objektes ist, werden diese Zellverbände nun nicht mehr erkannt. Bei weiter steigender Zelldichte sorgt dies dafür, dass schließlich immer weniger Zellen erkannt werden.

Um diese Hypothese zu bestätigen, werden Hochzelldichte-Kultivierungen von CHO-Zellen mit dem ISM-TT untersucht. Dies und die Anpassung von Bildaufnahme und Bildverarbeitungssoftware an höhere Zelldichten werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

5.5.4 Untersuchung von Hochzelldichte-Kultivierungen von CHO-Zellen

Um Daten für die Entwicklung eines neuen Bildverarbeitungsalgorithmus zu sammeln, werden Proben von CHO-Zellkultivierungen in einen Testreaktor gefüllt und bei 100 rpm mit einem Scheibenblattrührer gerührt. Mit dem ISM-TT werden Aufnahmen von den Zellsuspensionen gemacht. Die Hochzelldichte-Kultivierungen werden von einem industriellen Kooperationspartner durchgeführt. Die ISM-Messungen erfolgen jeweils 10 min nach den Probenahmen. Informationen über die Einstellungen für die ISM-Steuerungssoftware und die Bildverarbeitungssoftware sind im Anhang (Abschnitt 9.5) zu finden.

Neben normal fokussierten Aufnahmen werden von jeder Probe zusätzlich defokussierte Bilder aufgenommen, indem das Objektiv $60 \mu\text{m}$ von der LED entfernt wird. Damit liegt die Fokusebene des Mikroskops nicht mehr in der Mitte der Messzone sondern dahinter. Der Unterschied zwischen fokussierten und defokussierten Aufnahmen wird in Abb. 41 deutlich. Dort sind ISM-Bilder beider Aufnahmeverfahren von CHO-Zellproben mit unterschiedlichen Zelldichten dargestellt.

Die hier beschriebenen Zelldichten werden mit dem automatischen Zellszählsystem Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Brea, USA) bestimmt.

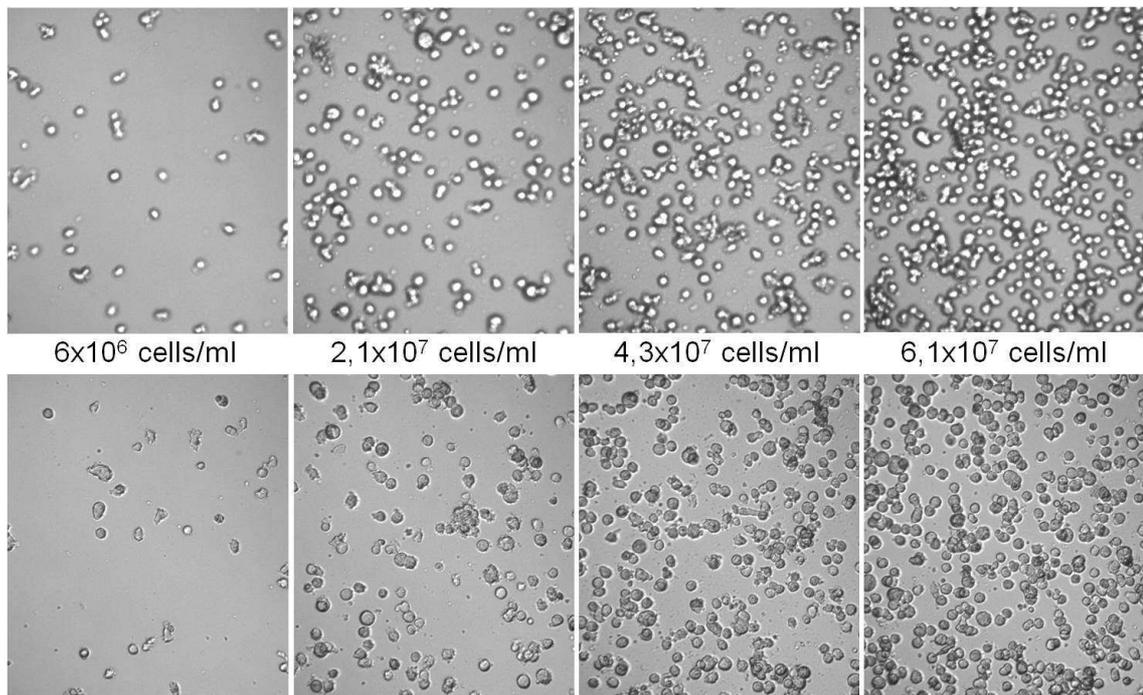


Abb. 41: ISM-Aufnahmen von CHO-Zellen bei unterschiedlichen Zelldichten. Oben: Defokussierte Aufnahmen; Unten: Fokussierte Aufnahmen.

Die Zellen selbst brechen das einfallende Licht und wirken daher in den defokussierten Aufnahmen als Linse. Sie sind im Bild als helle Flecken mit einem unscharfen, dunklen Rand zu erkennen. Im Vergleich zu den fokussierten Aufnahmen können auch Zellen, die zusammenhängend aufgenommen werden, durch ihren Rand noch unterschieden werden. Wenn also das Zellinnere als Objekt in einer Bildverarbeitungssoftware detektiert wird, sollte eine robuste Zelldichteanalyse bei hohen Zelldichten möglich sein. Hierfür kann der neu entwickelte Bildverarbeitungsalgorithmus *DefocussedAnalyzer* verwendet werden.¹⁰ Der Algorithmus arbeitet die folgenden Schritte zur Zellerkennung auf den ISM-Aufnahmen ab:

1. Binarisierung: Alle Pixel, deren Grauwert über einem bestimmten Schwellenwert liegt, werden als Objektpixel erkannt und in einem Zwischenbild als weiße Pixel markiert. Alle anderen Pixel werden schwarz markiert.
2. Objekterkennung: Mit einer Kantenverfolgung werden zusammenliegende Objektpixel zu Objekten zusammengefasst.
3. Randobjektlöschung: Objekte die Pixel enthalten, die den Rand des Bildes berühren, werden gelöscht.

¹⁰ Die Implementierung des Algorithmus in C# wurde von Dr. Patrick Lindner durchgeführt.

4. Größenausschluss: Objekte mit einer Gesamtfläche von unter $201 \mu\text{m}^2$ werden gelöscht.
5. Kompaktheitsausschluss: Objekte mit einer Kompaktheit von über 3 werden gelöscht. Die Kompaktheit eines Objektes wird mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Kompaktheit} = \frac{\text{Objektumfang}^2}{(4 \times \text{Objektfläche} \times \pi)} \quad (20)$$

Demnach hat ein idealer Kreis eine Kompaktheit von 1. Je weiter die Objektform von diesem abweicht, je größer wird der Wert für die Kompaktheit [O’Gorman et al., 2008].

6. Flächenberechnung von Einzelzellen: Die durchschnittliche Fläche von Objekten mit einer Kompaktheit von unter 1,5 wird berechnet.
7. Clusterbestimmung: Die Fläche aller Objekte mit einer Kompaktheit von über 1,5 wird durch die in Schritt 6 bestimmte Einzelzellfläche geteilt. Das Ergebnis wird gerundet und ergibt damit die Anzahl im Cluster vorliegenden Zellen.
8. Datenausgabe: Die Ergebnisse werden in einer Tabelle ausgegeben.

Ein Bildschirmfoto der Bildverarbeitungssoftware ist in Abb. 42 zu sehen. Dargestellt sind das Originalbild, die Zwischenbilder nach Schritt 1 und Schritt 7, sowie die Ergebnistabelle.

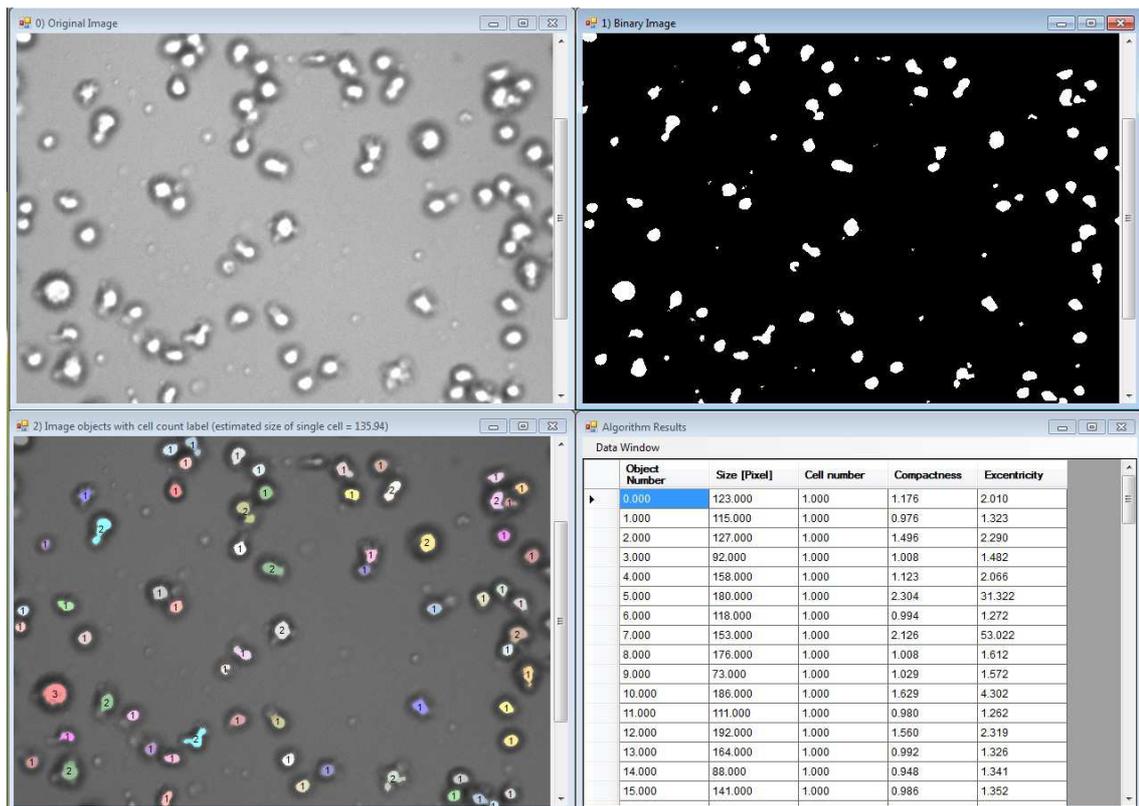


Abb. 42: Bildschirmfoto des *DefocusedAnalyzer*. Oben-links: Originalbild, oben-rechts: binarisiertes Bild, unten-links: Ergebnisbild mit Objektbeschriftung, unten-rechts: Ergebnistabelle.

Die farbige Kennzeichnung der erkannten Objekte im Ergebnisbild dient der besseren Unterscheidung von aneinander liegenden Objekten. Es ist zu sehen, dass der Großteil der auf dem Originalbild zu erkennenden Zellen vom Bildverarbeitungsalgorithmus detektiert und markiert wird. Lediglich eine sehr unförmige Zelle, die am oberen Bildrand mittig liegt, wird nicht erkannt.

Um einen geeigneten Binarisierungsschwellenwert für den ersten Schritt des *DefocusedAnalyzer* zu finden, werden Grauwertistogramme von verschiedenen ISM-Aufnahmen untersucht. In Abb. 43 sind eine defokussierte Aufnahme und das zugehörige Grauwertistogramm abgebildet.

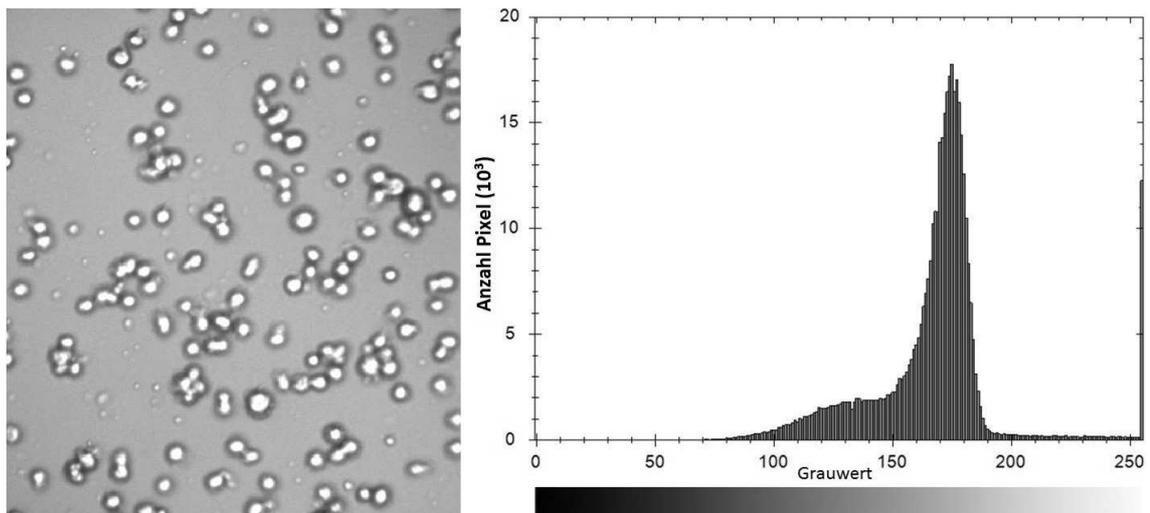


Abb. 43: Defokussierte ISM-Aufnahme einer CHO-Zellsuspension ($\sim 21 \times 10^6$ Zellen/ml) und zugehöriges Grauwerthistogramm.

Die Hintergrundpixel bilden den Peak im Bereich von Grauwerten zwischen 150 und 190. Die im Histogramm ganz rechts gelegenen Pixel bei einem Grauwert von 255 sind die hellen Pixel, die im Inneren der Zellen liegen. Der Bereich von Grauwerten zwischen 80 und 150 wird aus den Pixeln gebildet, die die Zellränder darstellen.

Alle untersuchten Grauwertistogramme zeigen die oben beschriebene charakteristische Form. Dabei unterscheidet sich nur die Höhe der unterschiedlichen Peaks entsprechend der vorliegenden Zelldichte. Aus den Histogrammen geht hervor, dass der Schwellenwert für die Binarisierung im Bereich zwischen 190 und 250 liegen kann. Für die weiteren Experimente wird ein Schwellenwert von 200 gewählt.

Proben mit Zelldichten zwischen 6×10^6 und 7×10^7 Zellen werden mit dem ISM-TT vermessen. Für die Analyse einer Probe werden 200 Bilder aufgenommen. Es werden sowohl fokussierte Bilder aufgenommen, die mit dem *CHOAnalyzer* ausgewertet werden, als auch defokussierte Bilder, die mit dem *DefocussedAnalyzer* ausgewertet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 44 dargestellt.

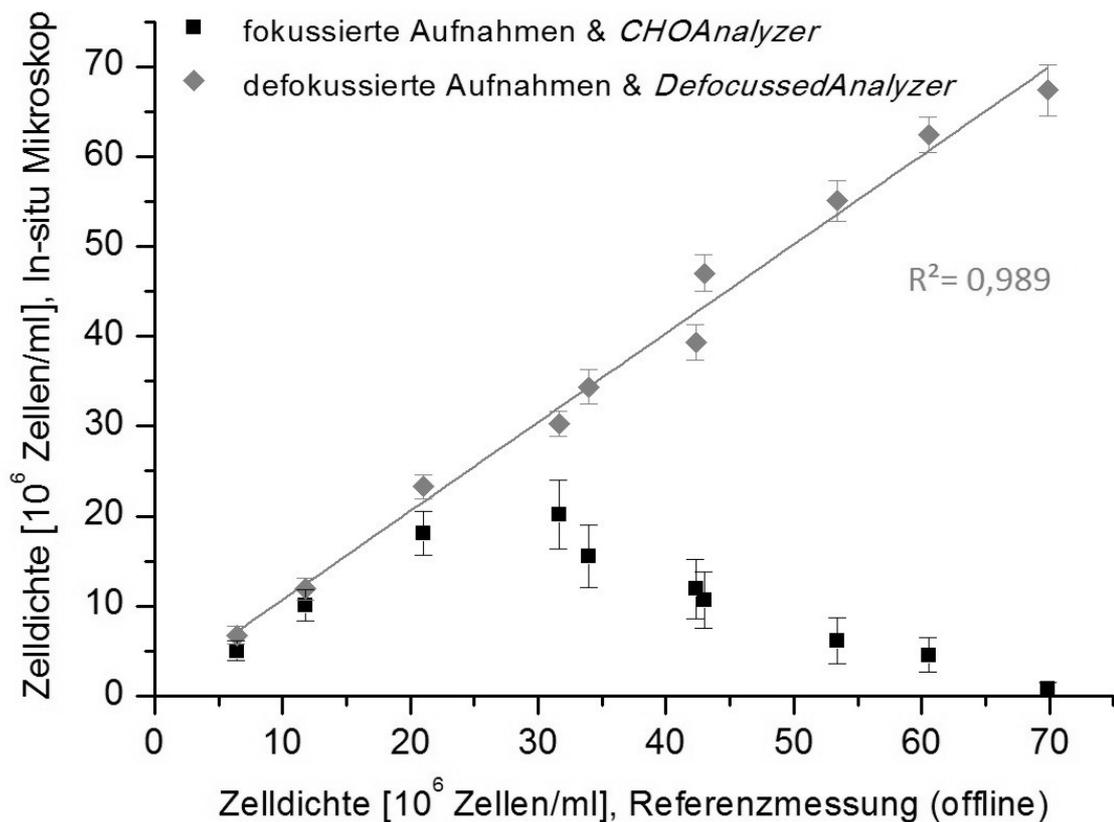


Abb. 44: Ergebnis der Zelldichtebestimmung mit den zwei unterschiedlichen Aufnahmevarianten im Vergleich mit der Referenzanalytik. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung.

Es ist zu erkennen, dass die fokussierten Aufnahmen in Zusammenarbeit mit dem *CHOAnalyzer* für eine Zelldichtebestimmung bei niedrigen Zelldichten bis etwa 10×10^6 Zellen/ml eingesetzt werden können. Bei höheren Zelldichten werden mit dieser ISM-Methode zu niedrige Zelldichten gemessen. Es zeigt sich sogar, dass ab einer kritischen Zelldichte von etwa 3×10^7 Zellen/ml die mithilfe des *CHOAnalyzers* detektierte Zelldichte wieder sinkt. Bei 7×10^7 Zellen/ml werden fast gar keine Zellen mehr auf den ISM-Bildern erkannt.

Bei der Analyse der defokussierten ISM-Aufnahmen mit dem *DefocussedAnalyzer* hingegen zeigt sich, dass über den gesamten untersuchten Zelldichtebereich eine starke lineare Korrelation zwischen den mittels In-situ-Mikroskopie erhaltenen Werten und den durch die Referenzanalytik erhaltenen Werten besteht. Darüber hinaus ist die prozentuale Standardabweichung der Messungen mit den defokussierten Aufnahmen geringer als mit den fokussierten Aufnahmen. Sie liegt für die defokussierten Aufnahmen bei etwa 5% im untersuchten Zelldichtebereich. Bei den fokussierten Aufnahmen liegt sie zwischen 13% und 22% im Zelldichtebereich bis 2×10^7 Zellen/ml und bei höheren Zelldichten sogar deutlich darüber.

Für die Bestimmung der Zelldichte ist die Kombination der defokussierten ISM-Aufnahmen mit anschließender Analyse durch den *DefocussedAnalyzer* geeignet.

Im Vergleich zu den fokussierten Aufnahmen gehen Informationen über die Morphologie der Zellen verloren, da die Zellen unscharf aufgenommen werden. Für die Untersuchung der Zellmorphologie muss daher auf die fokussierten Aufnahmen mit der Bildanalyse durch den *CHOAnalyzer* zurückgegriffen werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Algorithmus nur bis zu Zelldichten von 1×10^7 Zellen/ml verlässliche Ergebnisse liefert.

5.5.5 Untersuchung von Zellmorphologie und Zellviabilität

Neben der Zelldichte ist die Zellmorphologie eine wichtige Variable die mittels In-situ-Mikroskopie überwacht werden kann. Der *CHOAnalyzer* ist darauf ausgelegt die Umrisse von Zellen genau zu erkennen. In Abschnitt 5.5.1 wurde bereits gezeigt, dass sich die Fläche der beobachteten Zellen mit ihm sehr genau bestimmen lässt.

In der Literatur wird beschrieben, dass bei apoptotischen Zellen häufig eine Verkleinerung des Zellvolumens beobachtet werden kann [Galluzzi et al., 2007]. Es soll untersucht werden, ob eine Viabilitätsbestimmung mit dem ISM-TT über eine Analyse der Zelldurchmesser möglich ist. Hierfür werden CHO-K1 Zellen in einem 2 l-Bioreaktor in TC-42 Medium mit einem Zusatz von 4 mM L-Glutamin kultiviert. Das Animpfen des Reaktors erfolgt aus einer Vorkultur in exponentieller Phase mit einer Animpfdichte von 4×10^5 Zellen/ml. Weitere Informationen zum Kultivierungsprozess, sowie die Einstellungen für die ISM-Steuersoftware und die Bildverarbeitungssoftware sind im Anhang (Abschnitt 9.5) zu finden.¹¹

Im Verlauf der Zellkultivierung wird der durchschnittliche Zelldurchmesser der Zellen aus der detektierten Fläche berechnet. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Zellen als ideale Kreise abgebildet werden. Aus der laufenden Kultivierung werden Proben genommen und mit Trypanblau versetzt. Trypanblau ist ein Zellfarbstoff, der nur in tote Zellen eindringen kann und diese blau färbt. Die Viabilität der Zellkultur kann anschließend bestimmt werden, indem die Zellen unter einem Standard-Mikroskop ausgezählt werden. Für die Bestimmung der Glukosekonzentration werden Proben aus der Kultivierung zentrifugiert und der zellfreie Überstand mit einem YSI 2700 Biosensor (Yellow Springs, USA) vermessen.

In Abb. 45 sind der durchschnittliche Zelldurchmesser sowie die Viabilität der Zellen im Kultivierungsverlauf abgebildet. Zusätzlich sind die durch Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmte Zelldichte der Kultur und die Glukosekonzentration aufgetragen.

¹¹ Die Kultivierung und die Prozessüberwachung wurden im Rahmen der vom Autor betreuten Masterarbeit von Bernd Tscheschke durchgeführt [Tscheschke, 2011].

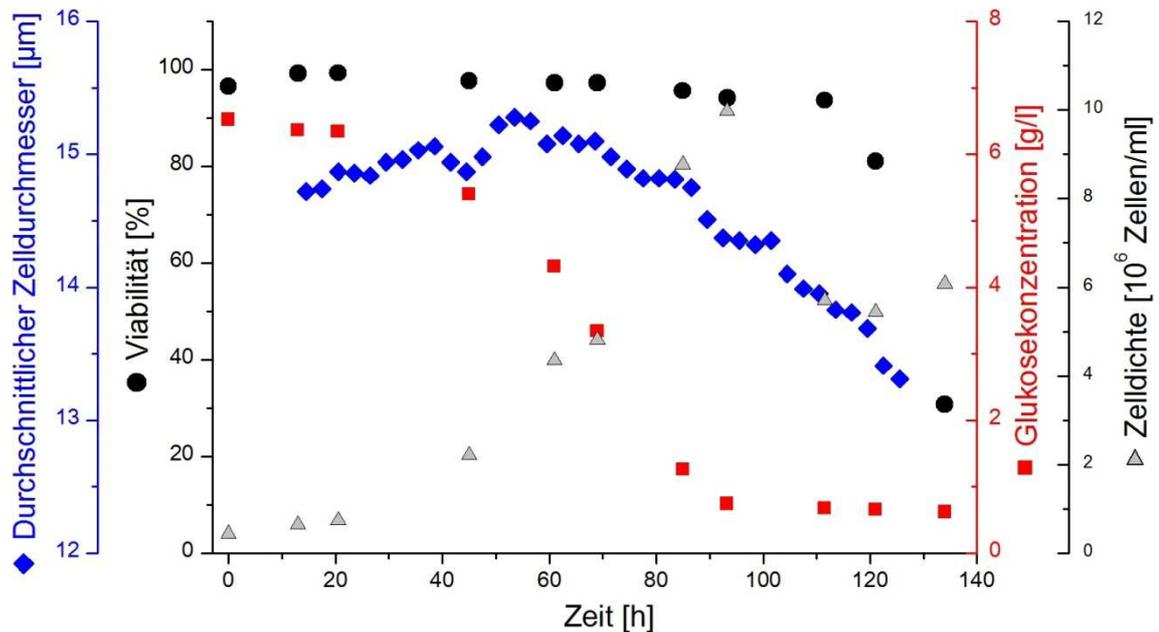


Abb. 45: Mit dem ISM-TT bestimmter durchschnittlicher Zelldurchmesser und mittels Trypanblau Färbung bestimmte Viabilität im Kultivierungsverlauf. Zusätzlich dargestellt sind die Glukosekonzentration im Medium und die mittels Neubauer-Zählkammer bestimmte Zelldichte.

Der durchschnittliche Zelldurchmesser steigt vom Beginn der Überwachung bis zu einer Kultivierungsdauer von etwa 55 h leicht an. Anschließend nimmt er leicht ab bis er nach 90 h das Startniveau erreicht. Von diesem Punkt an sinkt der durchschnittliche Zelldurchmesser schneller. Anhand der erreichten Zelldichte ist zu erkennen, dass bei etwa 90 h die stationäre Phase der Kultivierung erreicht ist. Etwa 30 h später beginnen die Zellen abzusterben. Der durchschnittliche Zelldurchmesser sinkt währenddessen weiter.

Eine direkte Korrelation zwischen der Größe der Zellen und ihrer Viabilität ist nicht zu beobachten. Dennoch scheint sich der durchschnittliche Zelldurchmesser als interessanter Ansatzpunkt für die Überwachung von CHO-Zellkultivierungen zu sein. Bei großem Nährstoffangebot steigt der Zelldurchmesser, während er sobald das Substrat im Medium verbraucht ist, stark abnimmt. Damit kann er als Indiz für eine sich abzeichnende Substratverknappung im Kulturmedium verwendet werden.

5.6 Zwischenfazit

Der neuentwickelte ISM-Prototyp ermöglichte einfachere, genauere und verlässlichere Überwachungen von biotechnologischen Prozessen als das Vorgängermodell. Die Konzepte der Unendlich-Optik und der "Tisch-auf-Tisch"-Bauweise konnten hierfür erfolgreich umgesetzt werden. Durch den Einbau von Präzisionslinear-

tischen war eine exakte und vor allem reproduzierbare Einstellung der Messzonentiefe möglich. Die Anschlussmöglichkeit des Mikroskops per USB-Schnittstelle und die Neugestaltung der Steuersoftware *InsituControl* sorgten für eine benutzerfreundlichere Bedienung im Vergleich zum Vorgängermodell.

Die durchgeführten Vorversuche zeigen, dass die berechneten Abbildungsmaßstäbe der Objektive gültig sind. Darüber hinaus konnte die thermische Belastbarkeit der Mikroskopkomponenten bis 70°C demonstriert werden.

Zur Demonstration der verbesserten Eigenschaften wurden enzymatische Abbauprozesse von Cellulose und Kultivierungen von CHO-Zellen mit dem ISM-TT überwacht. Dafür wurden neue Bildverarbeitungsalgorithmen entworfen, die zu überwachenden Variablen bestimmt und die verwendeten Parameter optimiert. Es wurden zwei verschiedene Enzympräparate für den enzymatischen Abbau untersucht. Rohament CL baute das verwendete Substrat schnell und vollständig ab. Es kommt daher im Rahmen einer Bioraffinerie für die Totalhydrolyse von Cellulose in Betracht. Ecostone C1 hingegen sorgte für den Aufbau einer Cellulosefraktion mit kleinem Molekulargewicht. Diese Fraktion kann möglicherweise für eine Weiterverarbeitung in der Kosmetikindustrie verwendet werden.

Die Prozessverläufe konnten mit dem ISM-TT überwacht werden. Dabei korrelierte der Abbau von großen Cellulosefasern zu kleineren mit der Entstehung von Glukose. Auch die Tendenzen in der Verschiebung der Objektgrößendichteverteilungen konnten mit dem ISM-TT verfolgt werden. Hier zeigten sich im Vergleich zur Laserbeugungsspektroskopie Unterschiede in den Ergebnissen. Nachdem die Bildverarbeitung als Auslöser für diese Unterschiede ausgeschlossen werden konnte, wurde diese Diskrepanz nicht weiter untersucht.

Mit der ISM-Methode konnten die Tendenzen der Größenprofile im Reaktor und deutlich zeitsparender untersucht werden als mit allgemein für diesen Zweck verwendeten Methoden, wie Laserbeugungsspektroskopie oder Größenausschlusschromatografie. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch die kinetischen Reaktionsparameter der Abbauprozesse mittels In-situ-Mikroskopie bestimmt werden können [Pietsch, 2012]. Das hierbei aufgetretene Problem der Messzonenverblockung konnte durch den Einsatz des neuen ISM-TT gelöst werden, indem zwischen den Messzyklen die Messzone weit geöffnet wurde. Da die neuen Lineartische umkehrspielfrei arbeiten, war es dabei möglich die Messzonentiefe für jede Messung konstant zu halten.

Bei der Überwachung der Zelldichte von CHO-Zellkultivierungen zeigte sich, dass mit dem ISM-TT bei über 2×10^6 Zellen/ml zu geringe Zelldichten erkannt wurden. Durch den Einbau einer Clustererkennung in den Bildverarbeitungsalgorithmus

konnte die Anzahl erkannter Zellen in Clustern um 40% gesteigert werden. Diese Optimierung und das Auffahren der Messzone zwischen den Aufnahmezyklen ermöglichten die Überwachung von Zelldichten bis zu 1×10^7 Zellen/ml.

Für die Untersuchung von CHO-Hochzelldichte-Kultivierungen wurde eine neue ISM-Technik etabliert, bei der die Zellen defokussiert aufgenommen werden. Um die entstehenden Bilder analysieren zu können, wurde der Bildverarbeitungsalgorithmus *DefocussedAnalyzer* entwickelt und die optimalen Auswertungsparameter anhand von Grauwertistogrammen der ISM-Aufnahmen ermittelt. CHO-Zellproben mit Zelldichten zwischen 6×10^6 und 7×10^7 Zellen/ml wurden mit den beiden Aufnahmeverfahren und den zugehörigen Algorithmen untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Über den gesamten untersuchten Zelldichtebereich war eine lineare Korrelation ($R^2=0,989$) der ISM-Ergebnisse, die in defokussierter Weise aufgenommen wurden, mit den Ergebnissen der Referenzanalytik zu erkennen. Im Gegensatz zu der Variante mit fokussierten Aufnahmen ermöglicht die neue Aufnahmetechnik die Überwachung der Zelldichte von CHO-Kultivierungen bis zu einer Zelldichte von 7×10^7 Zellen/ml.

Die fokussierten Aufnahmen mit anschließender Bildverarbeitung durch den Algorithmus *CHOAnalyzer* eigneten sich für die Bestimmung des durchschnittlichen Zelldurchmessers der CHO-Zellen. Eine direkte Viabilitätsbestimmung der Zellkultur über die Bestimmung des Zelldurchmessers war nicht möglich. Für die Zukunft bietet sich der Zelldurchmesser als Indikator für den Zustand der Kultivierung, insbesondere für das Nährstoffangebot im Medium, an.

Für die Untersuchung der Viabilität müssen Zellfarbstoffe verwendet werden. Ihr Einsatz in Bioreaktoren ist jedoch problematisch, da die Zellkulturen möglichst nicht beeinflusst werden sollen. Hier bietet sich die Verwendung von automatischen Probenahmesystemen mit anschließender Zugabe des Farbstoffs an. Für die Analyse der Proben ist dann ein an den Bioreaktor angeschlossenes Durchfluss-Mikroskop notwendig. Häufig werden Fluoreszenzfarbstoffe für die Einfärbung der Zellen verwendet. Daher sollte ein entsprechendes Durchfluss-Mikroskop möglichst in der Lage sein Fluoreszenz in einem breiten Wellenlängenbereich zu detektieren. Die Entwicklung eines solchen Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

6 Entwicklung eines Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops

Dieser Abschnitt beschreibt die Prototypenentwicklung eines Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops (DFFM). Der Prototyp ist als Durchflussmikroskop konzipiert, um größere optische Bauteile in das Mikroskop integrieren zu können.

Bei Durchfluss-Mikroskopen kann der Gesamtdurchmesser des Außentubus beliebig groß werden, da das Mikroskop nicht über einen Port in einen Reaktor integriert werden muss. Dies ermöglicht den Einsatz von Objektiven mit größeren Durchmessern, die für die Fluoreszenzmikroskopie optimiert sind, verbesserte optische Eigenschaften aufweisen und hohe Vergrößerungsfaktoren bieten. Darüber hinaus können stärkere Lichtquellen als die in In-situ-Mikroskopen verwendeten LED über Lichtwellenleiter in das Mikroskop eingekoppelt werden. Auch der Austausch der Lichtquelle ist einfacher möglich.

Damit über die klassische Mikroskopie hinaus Fluoreszenzuntersuchungen durchführen werden können wird das DFFM mit optischen Filtern ausgerüstet. Der Exzitationsfilter vor der Messzone ist durchlässig für Licht, das für die Anregung von fluoreszensaktiven Stoffen verwendet wird. Der Emissionsfilter hinter der Messzone ist nur durchlässig für das durch die Fluoreszenz erzeugte Licht.

Die Filter können über Filterräder in den Strahlengang eingebracht werden. Dies ermöglicht die Auswahl verschiedener Filterkombinationen ohne die Prozessüberwachung unterbrechen zu müssen. Das DFFM wird wie das ISM-TT mit Unendlich-Objektiven ausgerüstet, damit zwischen Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie gewechselt werden kann, ohne die Abstände der optischen Bauteile zueinander verändern zu müssen. Als Beleuchtungsvariante kommt für das DFFM die bei den In-situ-Mikroskopen erfolgreich verwendete Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung zum Einsatz.

6.1 Aufbau des Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops

Das DFFM ist modular aufgebaut, so dass bei Bedarf einzelne Komponenten ausgetauscht werden können. Die Durchflusszelle des Mikroskops ist mechanisch begrenzt und in ihrer Tiefe variabel. Eine schematische Seitenansicht des DFFM ist in Abb. 46 dargestellt.

- 1: Durchflusszelle
- 2: Saphirglasscheiben
- 3: Unterer Lineartischmotor
- 4: Innentubus
- 5: Oberer Lineartischmotor
- 6: Neo Kamera
- 7: Objektivtubus
- 8: Objektiv (austauschbar)
- 9: Rahmen
- 10: Außentubus
- 11: Kondensorlinse
- 12: Exzitationsfilterrad
- 13: Emissionsfilterrad

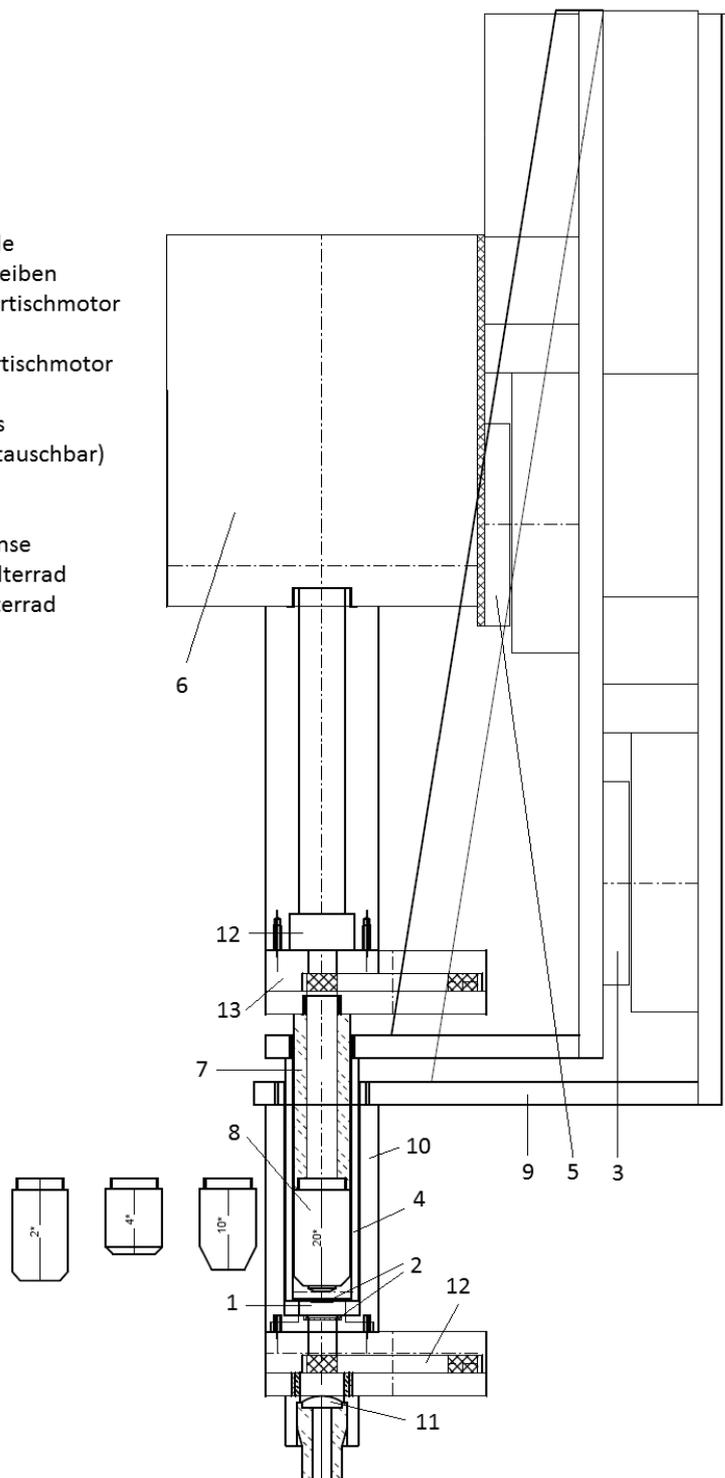


Abb. 46: Schematische Seitenansicht des Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops. Das 20-fach Objektiv ist eingebaut, die 2-, 4- und 10-fach Objektive sind darüber gezeigt.

Das Kernstück des Mikroskops ist eine Durchflusszelle (1), durch die Flüssigkeit hindurch gepumpt werden kann. Dabei liegt die Flussrichtung senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops. Die Tiefe der Durchflusszelle wird durch zwei Scheiben aus Saphirglas (2) definiert. Dabei ist die im Strahlengang der Lichtquelle am nächsten befindliche Scheibe feststehend, während die hintere Scheibe mechanisch verfahren werden kann. Dadurch kann die Tiefe der Durchflusszelle für Experimente mit Objekten unterschiedlicher Größe angepasst werden.

Die Mechanik des Mikroskops wird von zwei M-404.1DG Lineartischmotoren (Physik Instrumente, Karlsruhe) betrieben. Der untere Motor (3) verfährt den Innentubus (4) des Mikroskops, durch den die Tiefe der Messzone festgelegt wird. Der obere Motor (5) verfährt die Kamera (6). Da diese über den Objektivtubus (7) mit dem Objektiv (8) verbunden ist, kann hierdurch die Fokusebene des Mikroskops festgelegt werden. Der untere Motor ist auf dem Rahmen (9) des Mikroskops, welcher den Außentubus (10) hält, angebracht. Der obere Motor ist mit einer Platte auf dem unteren Motor angebracht. Dies erlaubt ein Auffahren der Durchflusszelle, ohne dass der relative Abstand der Fokusebene zur hinteren Saphirglasscheibe verändert wird.

An das Mikroskop ist eine Neo sCMOS-Kamera (Andor Technology, Belfast, Großbritannien) über ein C-Mount-Gewinde angeschlossen. Die Kamera ist mit einer Platte auf dem oberen Lineartischmotor verschraubt.

Als Lichtquelle wird ein Flexilux 600 Longlife Lichtleiter (Schölly Fiberoptic, Denzlingen) mit einer 150 W, 20 V Halogenlampe (Osram, München) verwendet. Die Lichtquelle und der Lichtwellenleiter sind nicht in der Zeichnung aufgeführt. Eine hinter dem Lichtwellenleiter angebrachte Kondensorlinse (11) sorgt für eine gleichmäßige Durchleuchtung der Durchflusszelle.

Zwischen Kondensorlinse und Durchflusszelle liegt das Exzitationsfilterrad (12). Das Filterrad besitzt vier Aussparungen, in die optische Filter mit 12,5 mm Durchmesser eingesetzt werden. Durch Drehung des Rades kann für eine Messung jeweils einer der Filter in den Strahlengang eingebracht werden. Es werden optische Interferenzfilter (Edmund Optics, Karlsruhe) mit Halbwertbreiten von 10 nm verwendet. Je nach Anwendung kann das Filterrad mit verschiedenen Filtern belegt werden. In Abb. 47 ist eine Skizze des Filterrads dargestellt.

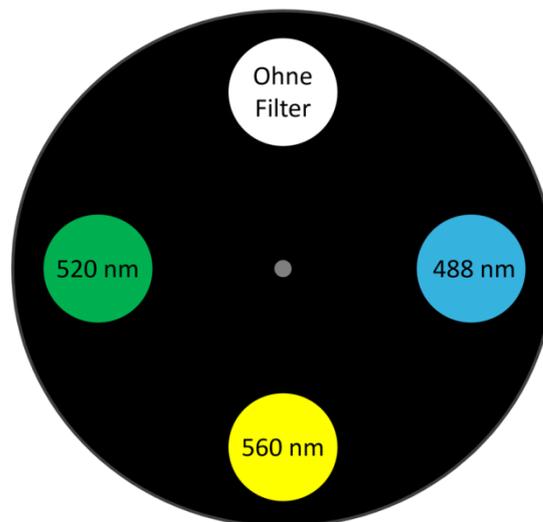


Abb. 47: Schematische Darstellung eines Filtrerrads mit Filterbelegung (Beispiel).

Im Strahlengang des Mikroskops befindet sich zwischen Objektiv (8) und Tubuslinse (12) ein baugleiches Emissionsfiltrerrad (13). Aufgrund des Prinzips der Unendlich-Optik stört dieses Filtrerrad die mikroskopische Untersuchung nicht. Als Objektive (Olympus Deutschland, Hamburg) werden Universal Planfluorit-Objektive mit 4- und 10-facher Vergrößerung, sowie Planachromat-Objektive mit 2- und 20-facher Vergrößerung verwendet. Alle Tuben des Mikroskops sind aus Aluminium (EN AW-7022) gefertigt. Tubusbauteile, die an den Strahlengang des Mikroskops grenzen, sind schwarz eloxiert, um Lichtreflexionen zu vermindern.

Um Proben mit dem DFFM zu vermessen, werden sie in einem gerührten oder geschüttelten Behälter vorgelegt. Aus diesem wird die Probe von einer EVA-Pump Peristaltikpumpe (Eppendorf, Hamburg) über Silikonschläuche zur Durchflusszelle des Mikroskops geleitet. Von dort fließt die Probe wieder zurück zum Behälter.

6.2 Steuersoftware

Die Steuerung der Lineartischmotoren erfolgt über eine weiterentwickelte Version der für die In-situ-Mikroskope verwendeten Steuersoftware *InsituControl*. Sie ermöglicht die notwendige Initialisierung und Steuerung der Lineartische. Damit kann die gewünschte Tiefe der Messzone eingestellt und die Objektive auf den jeweils erforderlichen Arbeitsabstand gefahren werden.¹²

¹² Die Steuersoftware wurde von Dr. Patrick Lindner entwickelt.

Die sCMOS Kamera wird durch die vom Hersteller mitgelieferte Steuersoftware *AndorSolis* betrieben. Hiermit können der Aufnahmemodus und alle Parameter für die Bildaufnahme festgelegt werden. Die aufgenommenen Bilder können als BMP-, TIFF- oder JPEG-Datei für die weitere Bildverarbeitung exportiert werden. In Abb. 48 ist ein Bildschirmfoto der beiden Programme zu sehen.

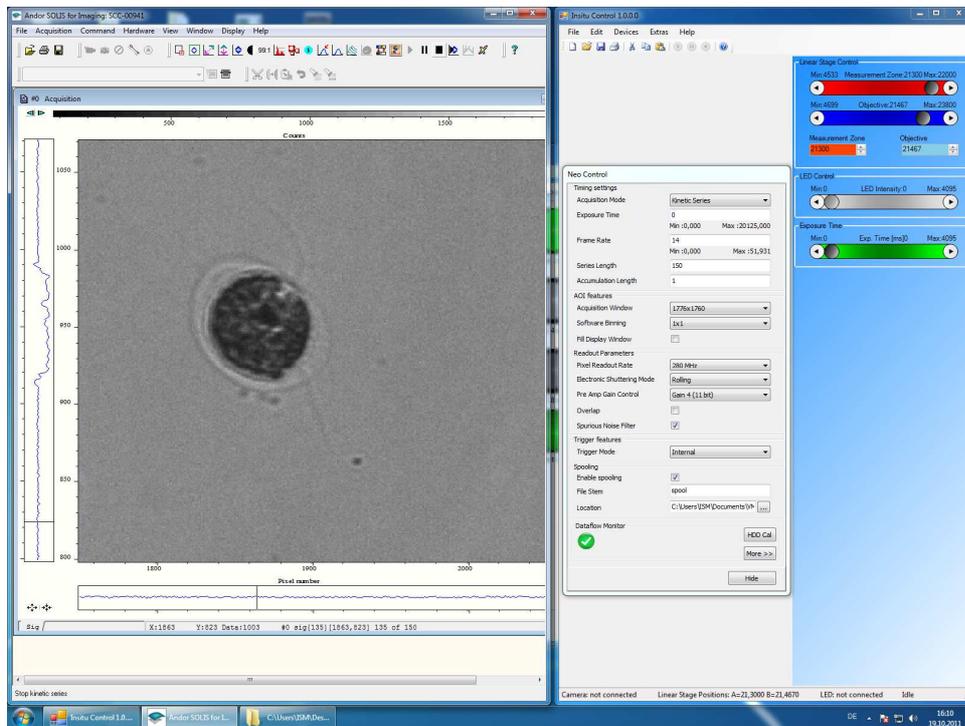


Abb. 48: Bildschirmfoto der Steuerungsprogramme. Auf der rechten Seite *In Situ Control* für die Bedienung der Lineratschmotoren. Auf der linken Seite *AndorSolis* für die Kamerasteuerung. Im Vorschaubild ist eine *Haematococcus pluvialis* Zelle zu sehen. Das Bild wurde mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv aufgenommen.

6.3 Optimierung des Strahlengangs

Trotz der Eloxierung aller Tuben, die den Strahlengang begrenzen, sind in den Aufnahmen des DFFM Spiegelungseffekte zu erkennen. In Abb. 49 ist ein mit dem 10-fach Objektiv aufgenommenes DFFM-Bild ohne Objekte zu sehen.

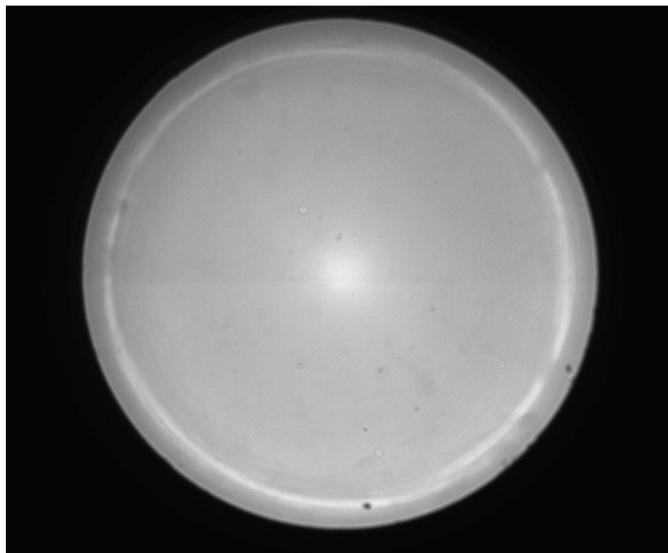


Abb. 49: Mit 10-fach Objektiv aufgenommenes DFFM-Bild.

Der helle Bereich in der Bildmitte und helle Ring am Rand des beleuchteten Bereichs wird durch Spiegelung des einfallenden Lichtes am Objektiv- und Kamertubus hervorgerufen. Auf diese Weise aufgenommene Bilder rufen bei der Bildverarbeitung Artefakte hervor, da die Algorithmen auf der Auswertung von Grauwerten und Grauwertgradienten basieren. Es ist daher notwendig die Messzone möglichst gleichmäßig auszuleuchten. Hierfür werden die den Strahlengang begrenzenden Tuben mit Samtpapier ausgekleidet. In Abb. 50 sind die hierdurch erreichten Effekte zu erkennen.

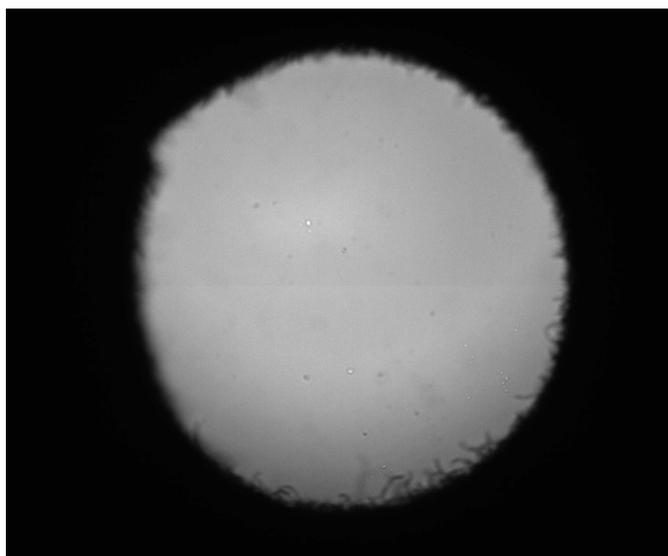


Abb. 50: Mit 10-fach Objektiv aufgenommenes Bild nach Auskleidung der Tuben mit Samtpapier.

Durch die Auskleidung der Tuben mit Samtpapier lässt sich ein homogen ausgeleuchtetes Bild erreichen. Dafür nimmt die maximal mögliche Aufsichtsfläche des Mikroskops von 3,1 Megapixel auf 2,3 Megapixel ab.

Um dem entgegenzuwirken, wird der Objektivtubus aufgebohrt und der Innendurchmesser auf den Durchmesser der optischen Filter von 12,5 mm erhöht. Ein mit dem optimierten Strahlengang aufgenommenes DFFM-Bild ist in Abb. 51 zu sehen.

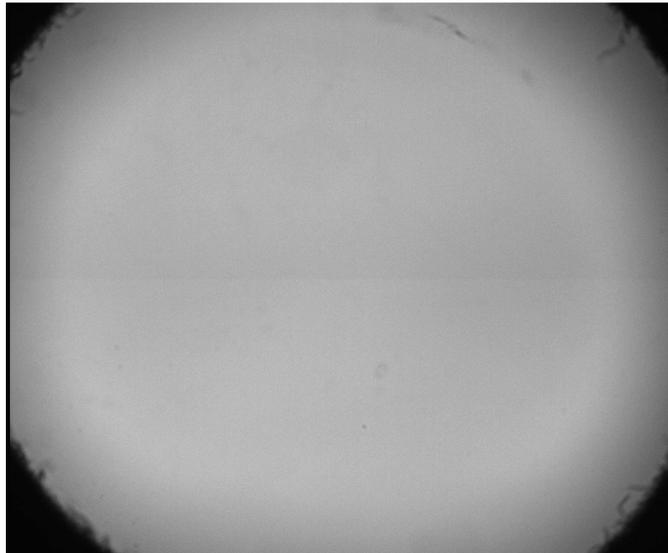


Abb. 51: Mit 10-fach Objektiv aufgenommenes DFFM-Bild nach der Optimierung des Strahlengangs.

Es wird sowohl eine homogene Ausleuchtung der Messzone, als auch eine maximale Aufsichtsfläche von 5,3 Megapixel erreicht. Das entspricht einer Fläche von $2,24 \text{ mm}^2$ beim Einsatz des 10-fach Objektivs. Dieser optimierte Strahlengang wird für alle weiteren Versuche verwendet.

6.4 Charakterisierung des Mikroskops

Bevor das DFFM für Bioprozessüberwachungen zum Einsatz kommt werden die wichtigsten optischen Eigenschaften charakterisiert und im Anschluss die Eignung des Mikroskops für Fluoreszenzmessungen untersucht.

6.4.1 Optische Eigenschaften

Entsprechend des in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Ablaufs werden die Abbildungsmaßstäbe der verwendeten Objektive mit einem Objektmikrometer untersucht. Die Kantenlänge eines Pixels auf dem CCD-Chip der verwendeten Andor NEO Kamera beträgt $6,5 \text{ }\mu\text{m}$ und der Chip der Kamera besitzt 2560×2160 Pixel. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Optische Eigenschaften des DFFM bei Verwendung verschiedener Objektive.

	2-fach Objektiv	4-fach Objektiv
100 Objektmikrometerstriche ($\cong 1 \text{ mm}$)	311,3 Pixel	624,9 Pixel
errechnete Bildpixel Kantenlänge	3,21 μm	1,60 μm
errechneter Abbildungsmaßstab	2,02	4,06
Abweichung zum erwarteten Wert	1,2%	1,5%
größtmögliche Aufsichtsfläche	56,98 mm^2	14,16 mm^2
	10-fach Objektiv	20-fach Objektiv
40 Objektmikrometerstriche ($\cong 400 \mu\text{m}$)	625,5 Pixel	1.260 Pixel
errechnete Bildpixel Kantenlänge	0,64 μm	0,32 μm
errechneter Abbildungsmaßstab	10,16	20,31
Abweichung zum erwarteten Wert	1,6%	1,6%
größtmögliche Aufsichtsfläche	3,54 mm^2	0,57 mm^2

Abgesehen von kleinen Abweichungen vergrößern die Objektive wie erwartet. Die Abweichungen liegen im Bereich des Messfehlers, weshalb sie für weitere Berechnungen vernachlässigt werden.

Mit einem Diodenarrayspektrometer (Dr. Gröbel UV-Elektronik, Ettlingen) wird das Emissionsspektrum der für die Beleuchtung des Mikroskops verwendeten Halogenlampe bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 52 dargestellt.

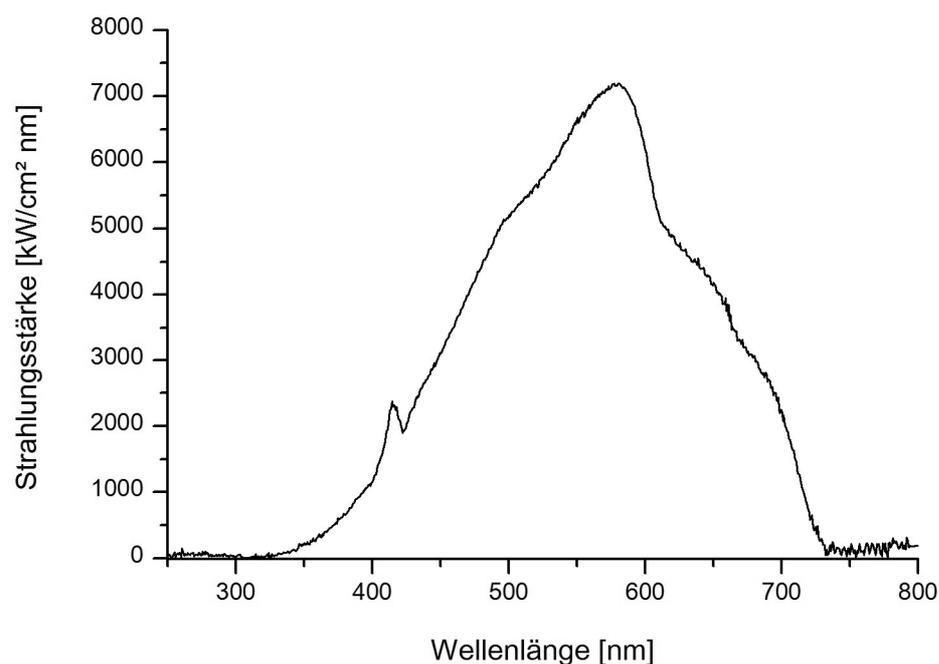


Abb. 52: Emissionsspektrum der verwendeten Halogenlampe.

Es ist zu sehen, dass die verwendete Halogenlampe im Wellenlängenbereich von 345 nm bis 725 nm Licht emittiert. Das Strahlungsmaximum liegt bei 570 nm.

Mit einem Cary 50 Spektrophotometer (Agilent, Santa Clara, USA) werden die Absorptionsspektren des verwendeten Lichtleiters und der Kondensorlinse aufgenommen, um zu untersuchen, ob diese das zur Verfügung stehende Lichtwellenspektrum weiter einschränken. Die Absorptionsspektren sind in Abb. 53 dargestellt.

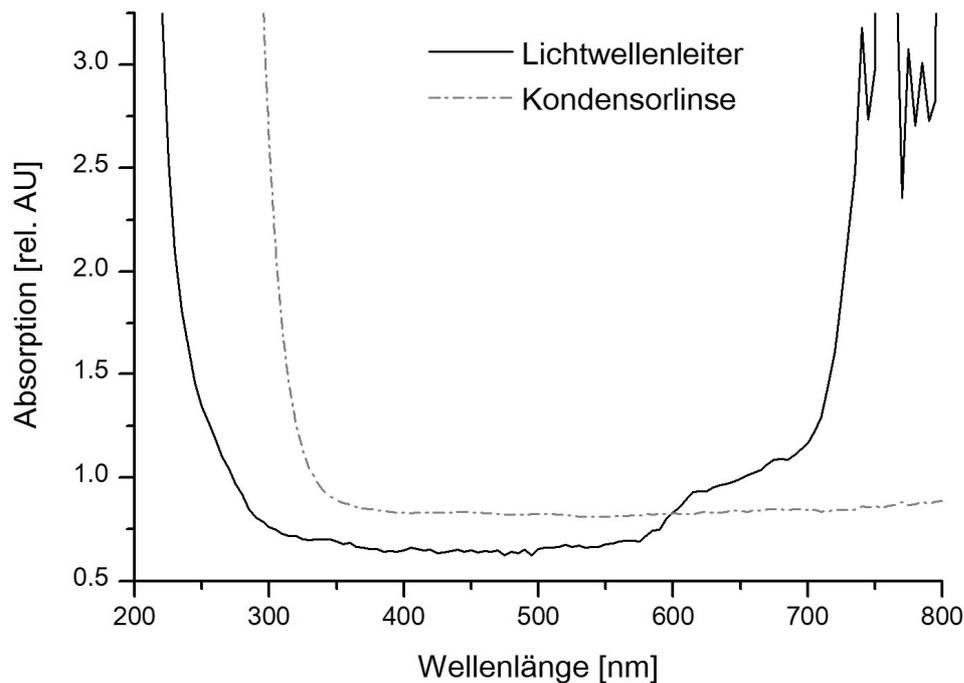


Abb. 53: Absorptionsspektren des Lichtwellenleiters und der Kondensorlinse.

Das Material des Lichtwellenleiters absorbiert stark unter 250 nm und über 710 nm. Das Material der Kondensorlinse absorbiert stark unter 320 nm. Damit ergibt sich für das DFFM, dass Fluoreszenzuntersuchungen bei Anregungswellenlängen zwischen 345 nm und 710 nm möglich sind. Am Rand dieses Spektrums ist die Lichtintensität jedoch schwach. Die stärksten Anregungsintensitäten werden zwischen 450 nm und 600 nm erreicht.

6.4.2 Eignungstest für Fluoreszenzuntersuchungen

Um die Eignung des Systems für Fluoreszenzanwendungen zu untersuchen, werden Fluoresceinlösungen unterschiedlicher Konzentration mit dem DFFM vermessen. Es wird ein Exzitationsfilter mit einer Transmission bei 490 nm und ein Emissionsfilter mit einer Transmission bei 514,5 nm verwendet. Die Einstellungen werden zwischen den Messungen nicht verändert. Von jeder Lösung werden 3 Bil-

der mit 8-bit Graustufen aufgenommen. Beispielbilder von 6 Konzentrationen sind in Abb. 54 dargestellt.

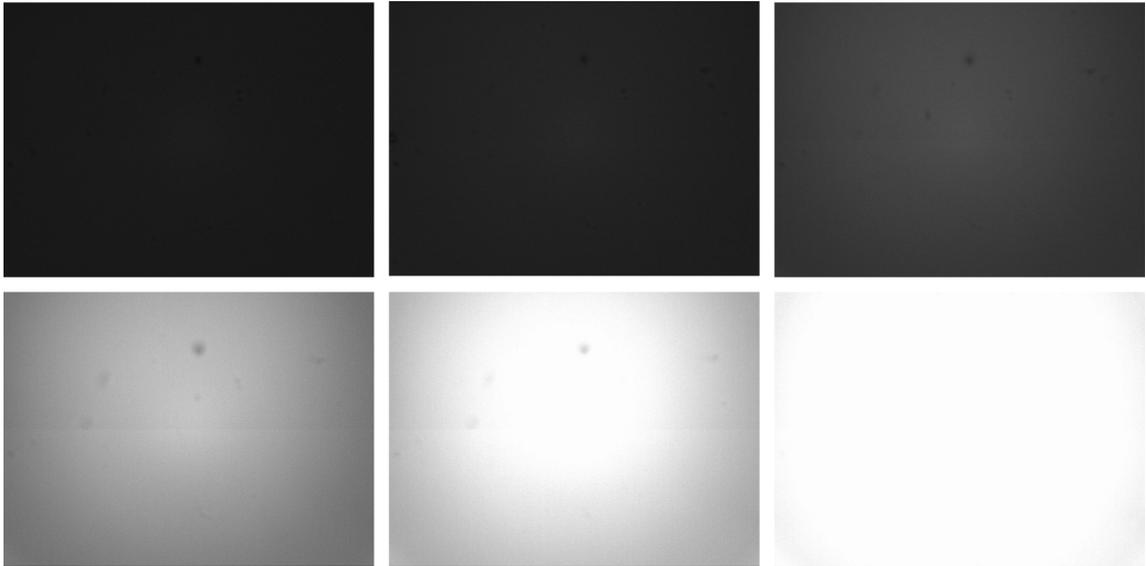


Abb. 54: DFFM-Aufnahmen von Fluoresceinlösungen unterschiedlicher Konzentration. Obere Reihe v.l.n.r.: 0 μM , 1 μM , 2,5 μM ; Untere Reihe v.l.n.r.: 10 μM , 20 μM , 50 μM .

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Image J* wird der mittlere Grauwert der Bilder bestimmt. In Abb. 55 ist der mittlere Grauwert der Bilder in Abhängigkeit der Fluoresceinkonzentration aufgetragen.

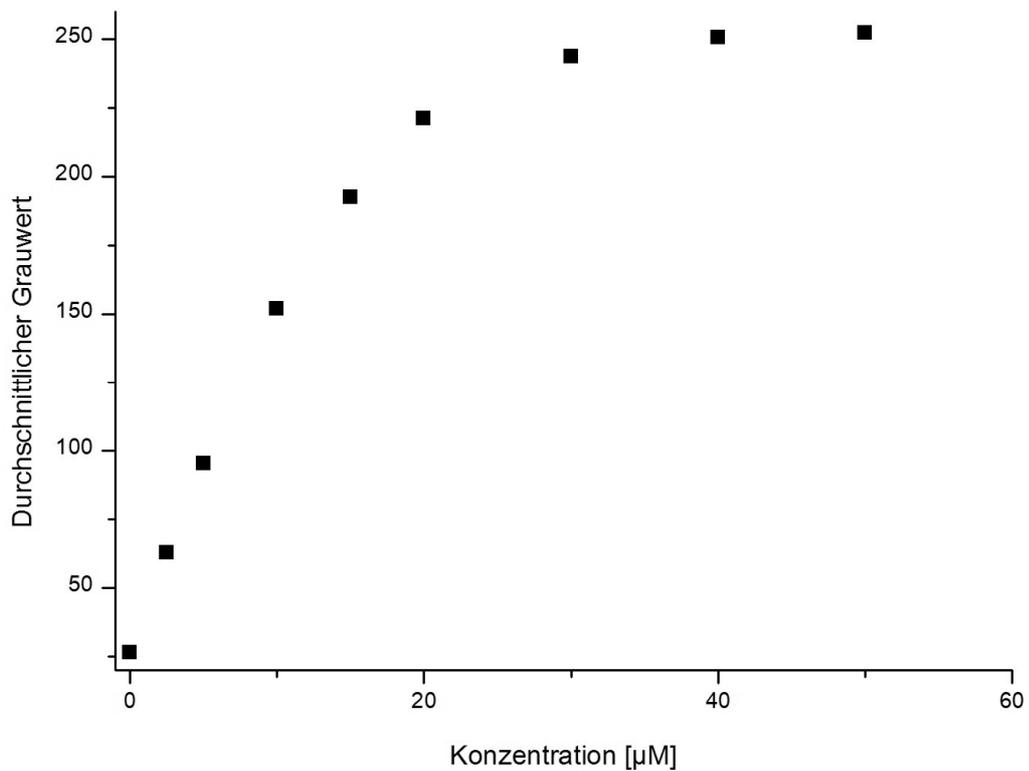


Abb. 55: Mittlerer Grauwert der DFFM-Bilder in Abhängigkeit der Fluoresceinkonzentration der Lösungen.

Bis zu einer Fluoresceinkonzentration von 15 μM ist eine lineare Abhängigkeit des mittleren Grauwerts von der Konzentration zu erkennen. Bei höheren Konzentrationen sind viele Bildpunkte bereits überbelichtet. In Abb. 55 ist daher eine Sättigung zu erkennen, die dem maximalen Grauwert von 255 entgegenläuft.

Die Ergebnisse zeigen, dass das DFFM für die Detektion von Fluoreszenz geeignet ist. Bis die ersten Pixel auf dem Sensor überbelichtet werden, ist eine lineare Abhängigkeit des mittleren Grauwerts der Aufnahmen zur Fluoreszenzintensität des Analyten gegeben. Um eine optimale Ausnutzung der Möglichkeiten zur Fluoreszenzanalyse zu gewährleisten, müssen die Beleuchtungsintensität und Kameraeinstellungen wie die Belichtungszeit an den vorliegenden Konzentrationsbereich angepasst werden.

6.5 Untersuchung von CHO-Zellkultivierungsprozessen

Um zu demonstrieren, dass das DFFM für die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden kann, werden CHO-Zellen mit Acetoxymethyl-Calcein (Calcein AM) versetzt. Dieser Farbstoff kann die Zellmembran passieren und wird durch zellinterne Esterasen zum fluoreszierenden Calcein umgesetzt. In der Durchflusszytometrie wird Calcein AM für Zytotoxizitätstests verwendet [Levesque et al., 1995].

Abb. 56 zeigt einen Vergleich von zwei DFFM-Aufnahmen von mit Calcein AM gefärbten CHO-Zellen. Für das linke Bild wurde nur ein Exzitationsfilter bei 488 nm verwendet. Das rechte Bild wurde mit einem zusätzlichen Emissionsfilter bei 514,5 nm aufgenommen.

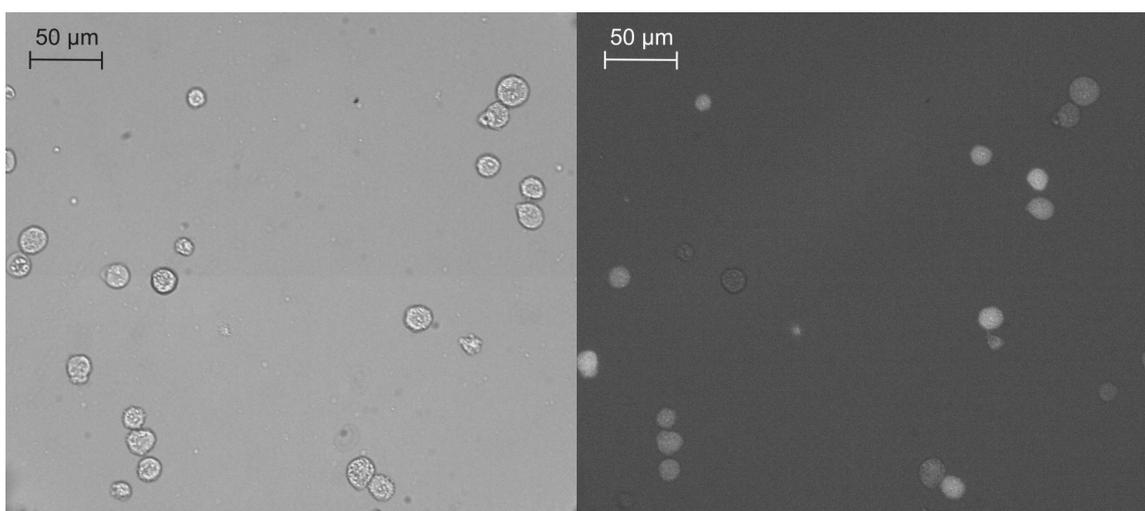


Abb. 56: Vergleich von zwei DFFM-Aufnahmen. Das linke Bild wurde nur mit Exzitationsfilter aufgenommen. Das rechte Bild mit Exzitations- und Emissionsfilter.

Wird nur der Exzitationsfilter verwendet, erreicht annähernd monochromatisches Licht die Messzone und den CCD-Chip. Der Bildhintergrund erscheint hell und die Zellen werden scharf aufgenommen. Die Fluoreszenz der Zellen wird jedoch vom Bildhintergrund überstrahlt. Damit können die lebendigen Zellen nicht von den toten Zellen unterschieden werden.

Wenn zusätzlich der Emissionsfilter verwendet wird, erreicht das einfallende Licht nur noch die Messzone. Der Bildhintergrund erscheint dunkel und die Fluoreszenz der Zellen, die das Substrat zu fluoreszierendem Calcein umgesetzt haben, erscheint im Bild hell. Diese Zellen werden als lebendig gewertet, da ihre zellinternen Esterasen offensichtlich aktiv sind und sie eine intakte Zellmembran aufweisen. Zellen, die sich hingegen kaum vom Bildhintergrund abheben, wie im rechten Bild auf mittlerer Höhe halb links zu sehen, werden als tot gewertet.

6.5.1 Entwicklung des *DFFMAnalyzer* Algorithmus

Für die automatische Auswertung der gewonnenen Daten wird der Bildverarbeitungsalgorithmus *DFFMAnalyzer* entwickelt.¹³

Aus Vorversuchen ergibt sich, dass der Algorithmus aufgrund der starken Unterschiede zwischen fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Zellen in verschiedene Abschnitte geteilt werden muss. Die Flächen von Zellen, die während eines Abschnittes detektiert werden, werden für die Weiterverarbeitung des Bildes gelöscht, damit dieselbe Zelle nicht mehrmals erkannt werden kann. Im Algorithmus geschieht dies durch Schritt 6 (Objekte ausschneiden).

Der Algorithmus ist in vier Abschnitte unterteilt. Er beginnt mit einer Vorverarbeitung der Bilder. Im zweiten Abschnitt werden Zellen mit starkem Kontrast zum Hintergrund erkannt. Im dritten Abschnitt werden Zellen mit schwachem Kontrast detektiert. Schließlich wird anhand des Grauwerts festgelegt, ob die detektierten Objekte tote oder lebendige Zellen darstellen.

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte des Algorithmus im Detail erklärt. Die Auswertungsparameter wurden für verschiedene Versuche angepasst und sind im Anhang (Abschnitt 9.5) detailliert beschrieben.

Vorverarbeitung:

1. Medianfilter: Auf das Originalbild wird ein Medianfilter mit einer Fensterbreite von 7 Pixeln angewendet. Dieser Schritt ist notwendig, um das Hintergrundrauschen im Bild zu eliminieren.

¹³ Die Implementierung des Algorithmus in C# wurde von Christian Lüder durchgeführt.

2. Kantendetektion: Mithilfe des Sobel-Operators werden Kanten im Bild detektiert. Kanten, die sich durch einen starken Grauwertgradienten auszeichnen, werden im Sobel-Zwischenbild hell dargestellt. Schwach ausgeprägte Kanten werden dunkler dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung des Sobeloperators kann in der Literatur gefunden werden [Online 8].

Detektion von Zellen mit starkem Kontrast:

3. Objekterkennung: Das Sobel-Zwischenbild wird binarisiert. Das bedeutet, jeder Pixel, dessen Grauwert über einem bestimmten Schwellenwert liegt, wird als zu einem Objekt gehörend erkannt. Da vom Sobel-Zwischenbild ausgegangen wird, werden nur Kanten, deren Kontrast zum Bildhintergrund stark genug ist, erkannt.
4. Objekterfassung: Alle aneinander liegenden Objektpixel werden zu Objekten zusammengefasst. Vollständig umschlossene Flächen werden ausgefüllt und als Teil des Objektes gewertet.
5. Objektlöschung: Alle Objekte mit einer Größe unter $15,8 \mu\text{m}^2$ werden gelöscht. Anschließend werden alle Objekte mit einer Kompaktheit von über 2 gelöscht. Hierdurch fallen kleinere Verschmutzungen und Objekte, die aufgrund ihrer Form nicht als Zellen gewertet werden, aus der Auswertung heraus. Die Kompaktheit wird wie in Abschnitt 5.5.4 beschrieben mit Formel (20) berechnet. Alle nicht gelöschten Objekte werden im Anschluss in einer Liste gespeichert.
6. Objekte ausschneiden: Das aus der Vorverarbeitung entstandene Sobel-Zwischenbild wird geladen. Die Flächen aller bis jetzt erkannten Objekte werden aus dem Bild ausgeschnitten und schwarz gefärbt.
7. Wiederholung der Schritte 3 – 5 mit veränderten Parametern. Es wird ein höherer Schwellenwert für die Binarisierung verwendet. Die Objektlöschung wird auf Objekte unter $21,1 \mu\text{m}^2$ und auf Objekte mit einer Kompaktheit von über 5 angewendet. Nur durch diese Wiederholung kann gewährleistet werden, dass alle Zellen erkannt und Zellcluster voneinander getrennt werden können.

Detektion von Zellen mit schwachem Kontrast:

8. Es werden die Schritte 3 – 7 wie für die Zellen mit starkem Kontrast durchgeführt. Dabei werden niedrigere Werte für die Binarisierung des Sobel-Zwischenbildes verwendet. Dadurch werden auch Zellen mit niedrigerem Kontrast erkannt. Für die Objektlöschung werden andere Parameter verwendet.

Da bei niedrigen Schwellenwerten im Binarisierungsschritt die Konturen der Zellen nur schlecht erkannt werden, wird, statt bei der Objektzusammenfassung (Schritt 4) die umschlossenen Flächen aufzufüllen, die Methode *Convex Hull* auf die Objekte angewendet. Diese füllt die Fläche so aus, dass das Objekt den kleinstmöglichen Umfang erhält, in dem alle ursprünglichen

Pixel enthalten sind. Dadurch werden unförmige Objekte an kreisförmige Objekte angenähert.

Objektklassifizierung:

9. Von allen erkannten Objekten wird der durchschnittliche Grauwert errechnet. Liegt dieser über einem bestimmten Schwellenwert werden die Zellen als lebendig erkannt. Die Ergebnisse werden in einer Tabelle ausgegeben.

Die für diesen Algorithmus notwendigen Schwellenwerte wurden durch manuelle Auswertung von 500 DFFM-Bildern von verschiedenen Versuchsreihen bestimmt. In Abb. 57 sind die Schritte des Algorithmus anhand der Bearbeitung eines Beispielbildes illustriert.

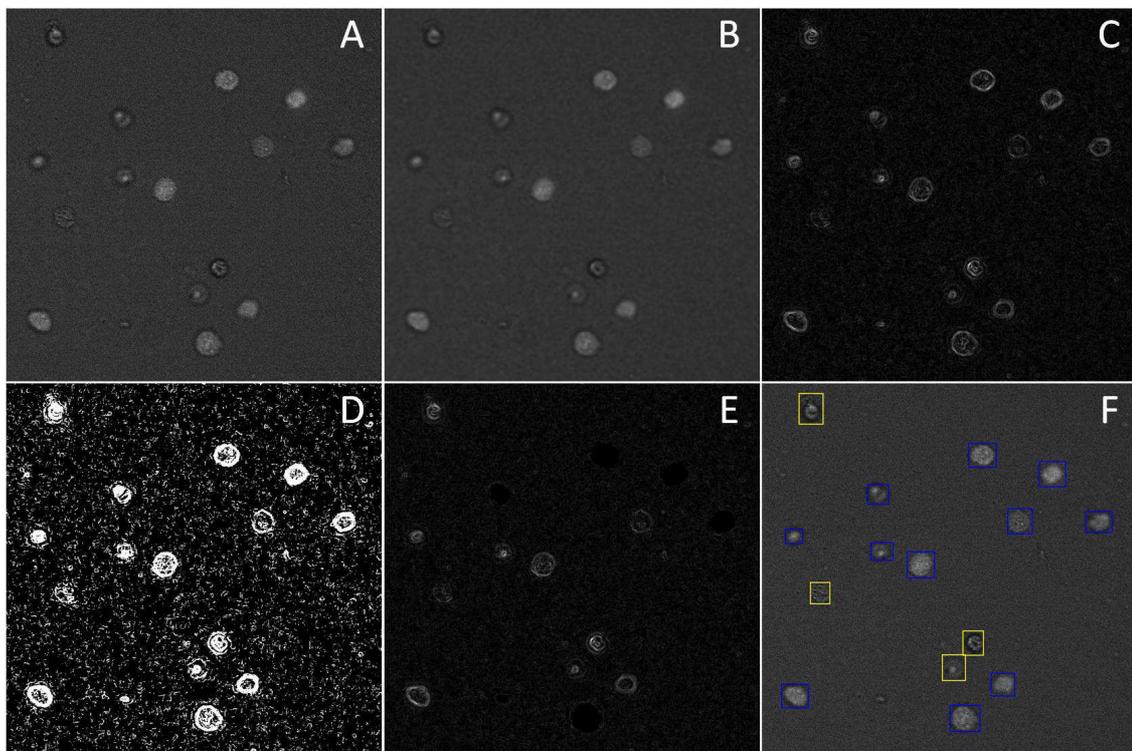


Abb. 57: Bearbeitung einer DFFM-Aufnahme mit dem *DFFMAnalyzer*, A: Originalbild, B: Medianfilter, C: Sobelkantendetektion, D: Binarisierungsschritt, E: Ausschneiden detektierter Objekte, F: Resultatbild (gelbe Markierung: tote Zelle, blaue Markierung: lebendige Zelle).

Zuerst wird das Originalbild (A) in den Speicher eingelesen. Nach der Anwendung des Medianfilters (Schritt 1) wirkt das Bild zwar verschwommener, dafür ist der Bildhintergrund homogener (B). Auf dieses Zwischenbild wird der Sobeloperator angewendet (Schritt 2). Je deutlicher die Kanten durch den Sobel-Operator erkannt werden, je heller werden sie im Zwischenbild (C) dargestellt. Durch einen Binarisierungsschritt (Schritt 3) werden Pixel als zu einem Objekt gehörend definiert und in einem Zwischenbild (D) weiß markiert. Durch Zusammenfassung dieser Pixel werden Objekte generiert (Schritt 4). Zu kleine oder unförmige Objekte wer-

den gelöscht (Schritt 5), alle anderen Objekte werden in einer Liste abgespeichert. Die Flächen dieser erkannten Objekte werden aus dem Sobelzwischenbild (C) ausgeschnitten (Schritt 6). Das hieraus entstehende Zwischenbild (E) dient als Vorlage für weitere Binarisierungs- und Objekterkennungsschritte (Schritt 7 + 8). Schließlich werden alle erkannten Objekte anhand ihres Grauwertes in die Kategorien „lebendig“ und „tot“ eingeteilt (Schritt 9). Erkannte Zellen werden entsprechend ihrer Klassifizierung in einem Resultatbild (F) markiert.

Im vorliegenden Beispiel werden 11 lebende Zellen (blaue Markierung) und 4 tote Zellen (gelbe Markierung) von der Bildverarbeitungssoftware erkannt.

6.5.2 Zelldichte- und Viabilitätsmessungen

Die Viabilität und Zelldichte von CHO-Zellkulturen in der Wachstumsphase und in der späten Absterbephase wird mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblaufärbung bestimmt. Die hierfür verwendeten CHO-K1 Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator (Hera cell 240, Thermo Scientific, Dreieich) kultiviert. Als Kultivierungsmedium wird TeutoCell TC42 mit einem Zusatz von 4-6 mM L-Glutamin verwendet.¹⁴

Proben aus diesen Kulturen werden vermischt, um Zellproben mit unterschiedlicher Viabilität und Zelldichte zu erhalten. Die Zellproben werden mit Calcein AM-Lösung versetzt und im Thermoschüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend werden die Zellproben am DFFM vermessen. Es wird ein Exzitationsfilter mit einer Transmission bei 490 nm und ein Emissionsfilter mit einer Transmission bei 514,5 nm verwendet. Ein detailliertes Messprotokoll findet sich im Anhang (Abschnitt 9.5).

Die entstandenen DFFM-Aufnahmen werden im Anschluss mit dem Bildverarbeitungsalgorithmus *DFFMAnalyzer* weiterverarbeitet. Dieser wertet die Bilder aus, bestimmt die durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Bild und die Viabilität der aufgenommenen Zellen anhand ihres Grauwerts.

In Abb. 58 wird die Anzahl der durchschnittlich detektierten Zellen pro Bild mit der manuell bestimmten Zelldichte verglichen.

¹⁴ Die Zellkultivierungen wurden von Alexander Babitzky durchgeführt.

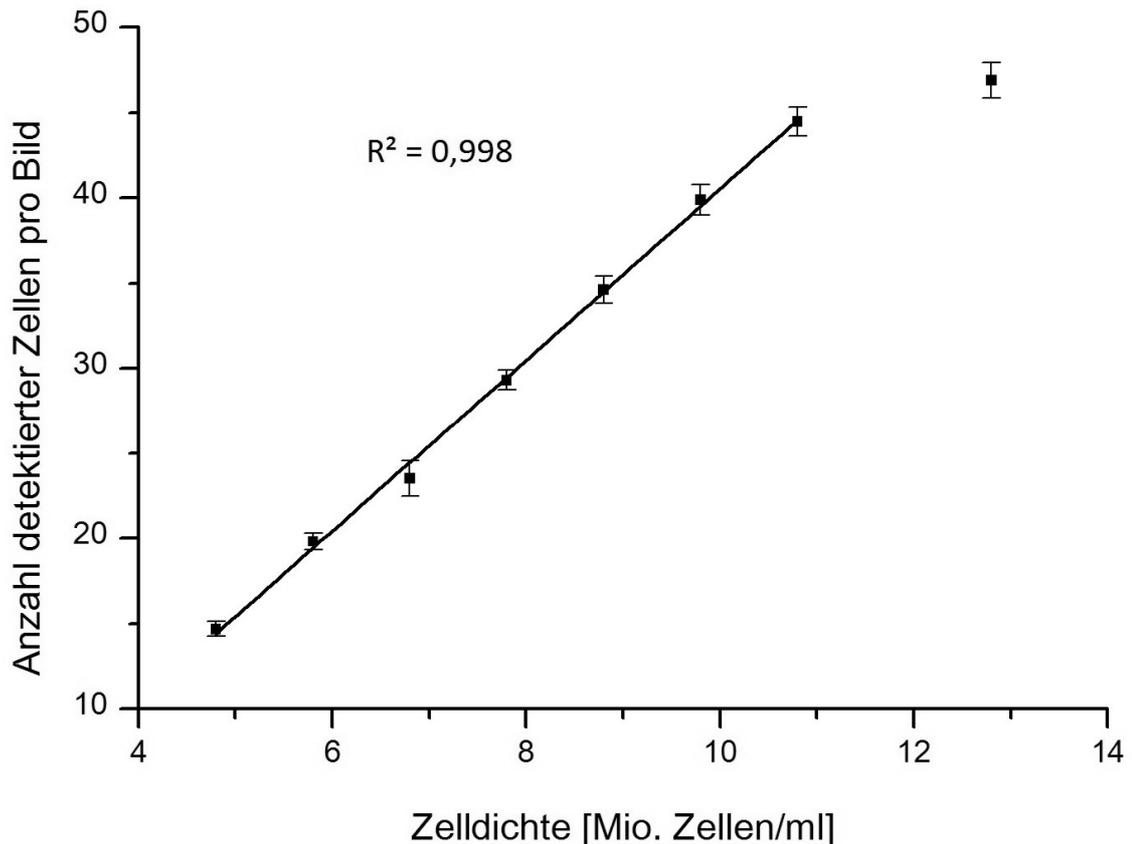


Abb. 58: Vergleich der vom *DFFMAnalyzer* detektierten Zelldichte mit der manuell bestimmten Zelldichte. Der letzte Datenpunkt wurde für die Berechnung der Ausgleichsgeraden nicht verwendet. Fehlerbalken: \pm Standardfehler.

In Abb. 58 ist zu erkennen, dass im Zelldichtebereich von 4×10^6 - $1,1 \times 10^7$ Zellen/ml ein linearer Zusammenhang zwischen der mittels *DFFMAnalyzer* detektierten Zellen pro Bild und der mittels manueller Zellzählung bestimmten Zelldichte besteht. Weiter ist zu erkennen, dass beim Messpunkt mit der höchsten Zelldichte das DFFM zu wenig Zellen erkennt. Dies liegt daran, dass der verwendete Detektionsalgorithmus zusammenhängende und überlappende Zellen als ein Objekt erkennt. Dadurch werden bei hohen Zelldichten weniger Zellen erkannt als tatsächlich vorhanden sind.

Proben mit Zelldichten von unter 4×10^6 Zellen/ml können ebenfalls vermessen werden. Da hierbei die Anzahl aufgenommener Zellen pro Bild sinkt, müssen mehr Bilder pro Messzyklus aufgenommen und ausgewertet werden, um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

In Abb. 59 wird die vom Algorithmus detektierte Viabilität der Zellprobe mit der manuell bestimmten Viabilität verglichen.

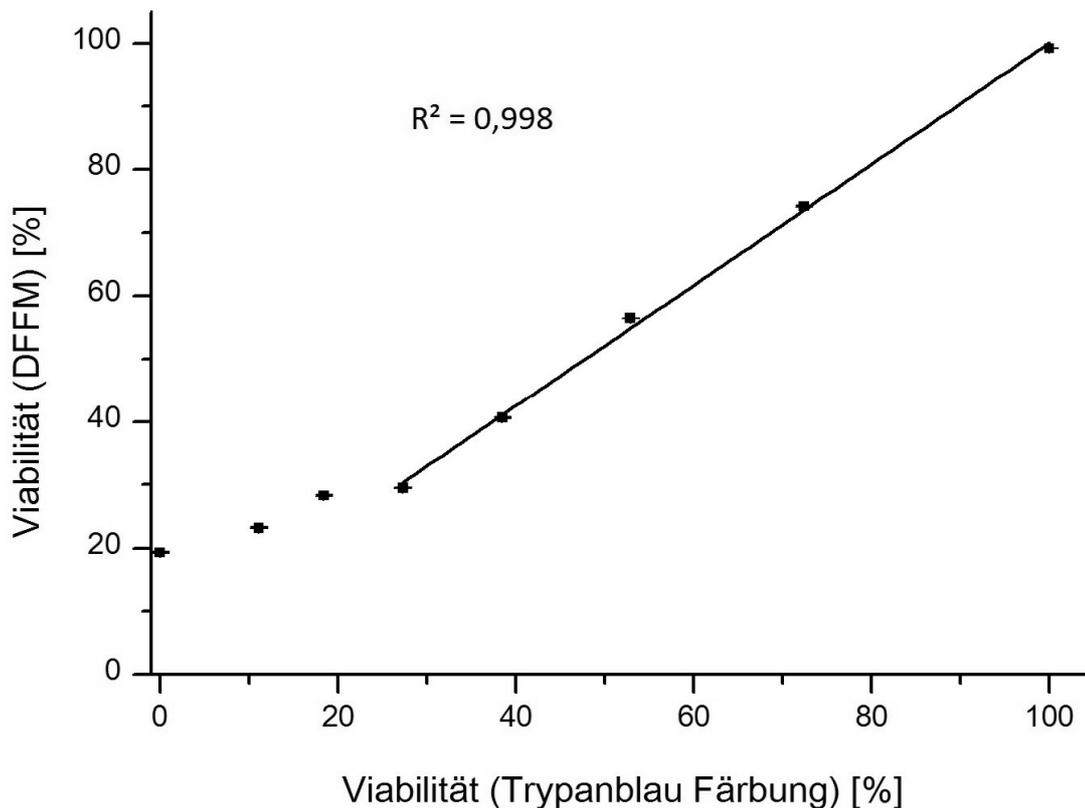


Abb. 59: Vergleich der vom *DFFMAnalyzer* errechneten Viabilität mit der manuell mittels Trypanblaufärbung bestimmten Viabilität. Die ersten drei Datenpunkte wurden für die Berechnung der Ausgleichsgeraden nicht verwendet. Fehlerbalken: \pm Standardfehler.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass die mittels DFFM bestimmte Viabilität bei hohen Viabilitäten gut mit der mittels Trypanblaufärbung bestimmten Viabilität übereinstimmt. Bei einer Viabilität von über 30% werden nahezu identische Ergebnisse erhalten. Bei Viabilitäten von unter 30% misst das DFFM zu hohe Viabilitätswerte. Dies kann durch eine Anpassung der Auswertungsparameter im *DFFMAnalyzer* geändert werden, geht dann aber zu Lasten der Genauigkeit im Bereich hoher Viabilitäten.

Die für die dargestellte Auswertung verwendeten Parameter sind für hohe Viabilitätswerte optimiert, da diese für Zellkultivierungen von größerem Interesse ist. Werden sie verwendet, ist die beschriebene Methode für die Überwachung der Viabilität im Bereich von 30 – 100% geeignet.

6.6 Zwischenfazit

Der Prototyp eines Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops wurde entwickelt. Der Prototyp ermöglichte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellsuspensio-

nen in 4 Vergrößerungsstufen mit beliebigen Filterkombinationen für Fluoreszenzexcitation und -emission.

Durch die Optimierung des Strahlengangs konnte eine für die weitere Bildverarbeitung geeignete Bildqualität ohne Lichtreflexionen erreicht werden. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass alle verwendeten Objektive die erwarteten Abbildungsmaßstäbe erreichen. Weiter konnte gezeigt werden, dass das DFFM für Fluoreszenzuntersuchungen geeignet ist. Auch die Untersuchung von mit Calcein AM angefärbten CHO-Zellen war mit dem DFFM möglich. Hierfür konnte der neu entwickelte Bildverarbeitungsalgorithmus *DFFMAnalyzer*, der Zellobjekte mittels Sobel-Kantendetektion erkennt, verwendet werden.

CHO-Zellproben mit einer Zelldichte bis 1×10^7 Zellen/ml konnten am DFFM unverdünnt vermessen werden. Zellproben mit höheren Zelldichten konnten vermessen werden, wenn die Zellproben mit PBS verdünnt wurden. Bei Zelldichten unter 4×10^6 Zellen/ml waren Messungen zwar möglich, allerdings sank die Anzahl der Zellen pro Bild und damit auch die statistische Aussagekraft der Messung.

Durch die Zellfärbung mit Calcein AM konnte mithilfe des DFFM die Viabilität der untersuchten Zellen festgestellt werden. Die zur Auswertung mittels *DFFMAnalyzer* verwendeten Parameter wurden für Zellkulturen mit hohen Viabilitätswerten optimiert. Daher konnten mit der beschriebenen Methode Viabilitäten von unter 30% nicht bestimmt werden.

Das DFFM ist in einigen Punkten noch optimierungsbedürftig. Es können zurzeit nur stark fluoreszierende Objekte untersucht werden können. Schwache Fluoreszenz, wie beispielsweise die natürliche Fluoreszenz von Chlorophyll aus Mikroalgen, kann mit dem DFFM nicht aufgenommen werden, da es hierfür nicht sensitiv genug ist. Durch den Betrieb mit Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung wird verhältnismäßig viel Licht, das durch Fluoreszenz außerhalb der Fokusebene erzeugt wird, aufgenommen. Dies lässt die untersuchten Objekte unscharf erscheinen. Eine Umstellung auf Auflicht-Beleuchtung könnte daher für bessere Aufnahmen sorgen.

Die zurzeit verwendete Steuersoftware konnte erfolgreich für die Überwachung von Bioprozessen verwendet werden. Sie ist jedoch noch nicht benutzerfreundlich gestaltet und bietet wenige Optionen. Eine Integration aller Systemkomponenten in das Steuerprogramm *InsituControl* ist daher wünschenswert.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Weiter- und Neuentwicklung von In-situ- und Durchfluss-Mikroskopen zur Überwachung von biotechnologischen Prozessen präsentiert. Anhand ausgewählter Beispiele wurde das Anwendungspotential dieser Mikroskope demonstriert.

Für das ISM III-XTF wurden neue Objektive mit kleinen Abbildungsmaßstäben entwickelt und charakterisiert. Hierdurch konnte die max. Aufsichtsfläche des Mikroskops von zuvor $0,83 \text{ mm}^2$ auf bis zu $17,7 \text{ mm}^2$ gesteigert und Überwachungen von Objekten mit Durchmessern von über 1 mm ermöglicht werden.

Es wurde gezeigt, dass das ISM III-XTF erfolgreich zur Untersuchung der mechanischen Stabilität von Lewatit-Partikeln verwendet werden kann. Bei diesem und weiteren untersuchten Anwendungsbeispielen wurden auch Schwächen des Mikroskops aufgedeckt. Besonders die nur ungenau einstellbare Messzone und die technisch überholten Anschlussmöglichkeiten des Mikroskops erschwerten die Messungen.

Auf Grundlage der mit dem ISM III-XTF gesammelten Erfahrungen wurde ein neuer ISM-Prototyp (ISM-TT) entworfen. Es wurden exaktere Lineartische verbaut, die eine Position reproduzierbar und ohne Umkehrspiel anfahren können. Darüber hinaus wurden Unendlich-Objektive und eine neue Kamera verwendet. Die Steuerung des gesamten Systems wurde über die Software *InsituControl* realisiert. Der Anschluss des ISM-TT an einen Computer erfolgte ausschließlich über USB-Schnittstellen.

Das ISM-TT konnte für die Überwachung von Tierzellkultivierungen verwendet werden. Durch Optimierung des Mikroskops und der Bildverarbeitungssoftware *CHOAnalyzer* war es möglich die Zelldichte von CHO-Zellkultivierungen bis 1×10^7 Zellen/ml zu überwachen. Darüber hinaus konnten Informationen über den Zustand der Kultur durch eine Morphologieanalyse der aufgenommenen Zellen gewonnen werden. Hier wurde das Potential der In-situ-Mikroskopie noch nicht vollständig ausgeschöpft. In Zukunft könnte die Morphologieanalyse auch zur in-situ-Untersuchung der Viabilität von Zellen verwendet werden. Untersuchungen an Hybridomazellen zeigen, dass dies prinzipiell möglich ist [Guez et al., 2010; Wiedemann et al., 2011]. Für detailliertere Morphologieanalysen von CHO-Zellen können in Zukunft Objektive mit höheren Abbildungsmaßstäben verwendet werden.

Um CHO-Kultivierungen auch bei höheren Zelldichten überwachen zu können, wurde eine neue ISM-Aufnahmevariante verwendet. Hierbei wurden die Zellen defokussiert aufgenommen und im Anschluss mit dem neuentwickelten Bildverarbeitungsalgorithmus *DefocussedAnalyzer* ausgewertet. Geeignete Parameter für den neuen Algorithmus wurden anhand von Grauwerthistogrammen der ISM-Aufnahmen ermittelt. Es wurde gezeigt, dass mit der neuen Methode die Zelldichte bis 7×10^7 Zellen/ml erfolgreich gemessen werden kann. Vermutlich lassen sich auch bei noch höheren Zelldichten positive Ergebnisse erreichen. Hier sind weitere Experimente notwendig, um die Messgrenzen der Methode zu erfassen.

Durch die defokussierten Aufnahmen gingen allerdings auch Informationen über die Morphologie der Zellen verloren, da diese nur noch unscharf auf den ISM-Bildern zu erkennen waren. Falls für eine Prozessüberwachung Zelldichte und Zellmorphologie gemeinsam untersucht werden sollen, kann dies durch eine Kombination der beiden Aufnahmevarianten erreicht werden. Hierfür muss die Steuerungssoftware *InsituControl* umgeschrieben werden, um solche Kombinationsmessungen zu ermöglichen. Darüber hinaus muss der *CHOAnalyzer* weiter optimiert werden, um auch bei den fokussierten Aufnahmen bei hohen Zelldichten verlässliche Ergebnisse liefern zu können.

Das ISM-TT wurde an die Überwachung enzymatischer Abbauprozesse von Cellulose adaptiert. Damit konnte das Anwendungsspektrum der In-situ-Mikroskopie erfolgreich auf den Bereich der Biokatalyse erweitert werden. Im Vergleich zu etablierten Methoden wie bspw. der Größenausschlusschromatografie ermöglichte die In-situ-Mikroskopie eine schnellere und einfachere Überwachung der enzymatischen Reaktion. Es wurde bereits gezeigt, dass sich die In-situ-Mikroskopie für die Bestimmung kinetischer Reaktionsparameter eignet [Pietsch, 2012]. Das Problem einer verblockten Messzone konnte mit dem ISM-TT durch Auf- und Zufahren der Messzone vor einem Aufnahmezyklus beseitigt werden. In Zukunft ist ein Einsatz des ISM-TT auch im Rahmen einer enzymatischen Prozesssteuerung denkbar.

Das ISM-TT besitzt ebenfalls Potential für die Überwachung von Mehrphasenprozessen. Viele Messmethoden versagen bei der Untersuchung komplexer Mehrphasensysteme. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die In-situ-Mikroskopie für die Bestimmung von Phasengrenzflächen in Emulsionen in Betracht kommt [Prediger 2011].

Um Fluoreszenzexperimente zu ermöglichen, wurde der Prototyp eines Durchfluss-Fluoreszenz-Mikroskops (DFFM) entwickelt. Die optischen Eigenschaften des DFFM wurden charakterisiert und gezeigt, dass das DFFM für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Anregungswellenlängen im Bereich zwischen

345 nm und 710 nm geeignet ist. Dieses Spektrum kann in Zukunft durch die Verwendung von neuen Beleuchtungsmethoden sowie anderen Lichtwellenleitern und Kondensorlinsen erweitert werden.

Das Anwendungspotential des DFFM wurde anhand der Untersuchung von CHO-Zellkultivierungen demonstriert. Hierfür wurde der Bildverarbeitungsalgorithmus *DFFMAnalyzer* entwickelt und Calcein AM als Zellfarbstoff verwendet, um die Viabilität der Zellkulturen mit dem DFFM bestimmen zu können. Die Messgrenzen des DFFM für Zelldichte und Zellviabilität wurden ermittelt.

Das DFFM wurde soweit untersucht, dass es in Zukunft für weitere Versuche in ein Fließanalysesystem integriert werden kann. Über Pumpen und Ventile kann so eine automatische Probenahme, -verarbeitung und -analyse erreicht werden. Des Weiteren können die gewonnenen Erfahrungen auf die Entwicklung eines für Fluoreszenzuntersuchungen geeigneten In-situ-Mikroskops übertragen werden. Hierfür ist eine Miniaturisierung der Einzelbauteile notwendig, wenn das Mikroskop wie bisher über 25 mm Standardports in Reaktoren integrierbar sein soll. Außerdem sollte für das nächste Fluoreszenzmikroskop eine Auflicht-Beleuchtung verwendet werden. Hierbei wird nur die Fokusebene des Mikroskops beleuchtet, wodurch fluoreszierende Objekte schärfer abgebildet werden als bei einer Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung.

Es kann zusammengefasst werden, dass durch diese Arbeit das Anwendungsspektrum des ISM-XTF erfolgreich erweitert werden konnte. Darüber hinaus wurden zwei vollständig neue Mikroskop-Prototypen entwickelt und in ersten biotechnologischen Anwendungen zum Einsatz gebracht. Mit dem DFFM wurde ein Durchfluss-Mikroskop für fluoreszenzmikroskopische Analysen entwickelt. Das ISM-TT ermöglichte präzisere und benutzerfreundlichere Messungen als seine Vorgängermodelle. Zelldichtemessungen von CHO-Zellen waren mit dem neuen System bis zu 7×10^7 Zellen/ml möglich. Außerdem konnte die In-situ-Mikroskopie erfolgreich für die Untersuchung von biokatalytischen Prozessen verwendet werden.

8 Literaturverzeichnis

- Abel, A. 2009. Untersuchung zur kontinuierlichen Mikroskopierung von Zellsuspensionen. Diplomarbeit: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- Akin, M., A. Prediger, M. Yuksel, T. Höpfner, D. O. Demirkol, S. Beutel, S. Timur, T. Scheper. 2011. A new set up for multi-analyte sensing: At-line bio-process monitoring. *Biosensors & Bioelectronics* 26:4532-4537.
- Bittner, C. 1994. Ein neues Verfahren zur On-line-Bestimmung der Biomasse bei Kultivierungsprozessen. Dissertation: Universität Hannover.
- Bittner, C., G. Wehnert, T. Scheper. 1998. In situ microscopy for on-line determination of biomass. *Biotechnology and Bioengineering* 60:24-35.
- Bluma, A. 2009. Adaption inline mikroskopischer Verfahren an die Überwachung und Charakterisierung biotechnologischer Kristallisationsprozesse. Dissertation: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- Bluma, A., T. Höpfner, P. Lindner, C. Rehbock, S. Beutel, D. Riechers, B. Hitzmann, T. Scheper. 2010. In-situ imaging sensors for bioprocess monitoring: state of the art. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398:2429-2438.
- Bluma, A., T. Höpfner, G. Rudolph, P. Lindner, S. Beutel, B. Hitzmann, T. Scheper. 2009. Adaptation of in-situ microscopy for crystallization processes. *Journal of Crystal Growth* 311:4193-4198.
- Brückerhoff, C. 2006. Bildbasiertes Inline-Monitoring von Kultivierungsprozessen mit einem optimierten In-situ Mikroskopsystem. Dissertation: Universität Hannover.
- Canny, J. 1986. A Computational Approach to Edge-Detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 8:679-698.
- Eibl, R., S. Kaiser, R. Lombriser, D. Eibl. 2010. Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:41-49.
- Frerichs, J. G., K. Joeris, K. Konstantinov, T. Scheper. 2002. Use of an in-situ microscope for on-line observation of animal cell cultures. *Chemie Ingenieur Technik* 74:1629-1633.

Galluzzi, L., M. C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, G. Kroemer. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation* 14:1237-1266.

Guez, J. S., J. P. Cassar, F. Wartelle, P. Dhulster, H. Suhr. 2010. The viability of animal cell cultures in bioreactors: Can it be estimated online by using in situ microscopy? *Process Biochemistry* 45:288-291.

Hilterhaus, L., O. Thum, A. Liese. 2008. Reactor concept for lipase-catalyzed solvent-free conversion of highly viscous reactants forming two-phase systems. *Organic Process Research & Development* 12:618-625.

Hitzmann, B., T. Scheper. 2011. Bioprozessanalytik und -steuerung. In *Bioprozesstechnik*. H. Chmiel, 263-294.

Horvath, J. J., S. A. Glazier, C. J. Spangler. 1993 In Situ Fluorescence Cell Mass Measurements of *Saccharomyces cerevisiae* Using Cellular Tryptophan. *Biotechnology Progress* 9:666-670.

Jayapal, K. R., K. F. Wlaschin, W. S. Hu, M. G. S. Yap. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress* 103:40-47.

Joeris, K., J. G. Frerichs, K. Konstantinov, T. Scheper. 2002. In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. *Cytotechnology* 38:129-134.

Kiviharju, K., K. Salonen, U. Moilanen, E. Meskanen, M. Leisolay, T. Eerikainen. 2007. On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34:561-566.

Krabichler, C. 2005. Erkennen von Hefezellen in der In-situ-Mikroskopie mit Methoden der Bildverarbeitung. Diplomarbeit: Fachhochschule Weihenstephan.

Larsen, J., M. O. Haven, L. Thirup. 2012. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. In *Biomass and Bioenergy*. K. Maniatis, D. Chiaramonti, 36-45.

Lee, H. L. T., P. Boccazzi, N. Gorret, R. J. Ram, A. J. Sinskey. 2004. In situ bioprocess monitoring of *Escherichia coli* bioreactions using Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 35:131-137.

Levesque, A., A. Paquet, M. Page. 1995. Measurement of Tumor-Necrosis-Factor Activity by Flow-Cytometry. *Cytometry* 20:181-184.

Limayem, A., S. C. Ricke. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38:449-467.

Lindner, P. 2006. Entwicklung von Software-Systemen zur Planung, Datenaufnahme und -auswertung von Bioprozessen. Dissertation: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Mandels, M., E. T. Reese. 1965. Inhibition of Cellulases. *Annual Review of Phytopathology* 3: 85-102.

Martinez, G., J. G. Frerichs, K. Joeris, K. Konstantinov, T. Scheper. 2005. Cell density estimation from a still image for in-situ microscopy. 2005 IEEE International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing 2:497-500.

Martinez, G., J. G. Frerichs, G. Rudolph, T. Scheper. 2008. Three-Dimensional Cell Counting for In-Situ Microscopy. 19th International Conference on Pattern Recognition 1-6:1454-1457.

Mered, B., P. Albrecht, H. E. Hopps. 1980. Cell-Growth Optimization in Microcarrier Culture. *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* 16:859-865.

Neves, A. A., D. A. Pereira, L. M. Vieira, J. C. Menezes. 2000. Real time monitoring biomass concentration in *Streptomyces clavuligerus* cultivations with industrial media using a capacitance probe. *Journal of Biotechnology* 84:45-52.

O’Gorman, L., M. J. Sammon, M. Seul. 2008. Practical Algorithms for Image Analysis, 2:155.

PCO AG. 2010. Pixelfly USB Benutzerhandbuch, Version 1.0.0.

Physik Instrumente GmbH & Co. KG. 2007. Benutzerhandbuch M-122 Mikrostelltisch, Version 1.0.0.

Pietsch, S. 2012. Bestimmung kinetischer Parameter für die enzymatische partielle Hydrolyse von Cellulose. Bachelorarbeit: Technische Universität Hamburg-Harburg.

Prediger, A. 2010. Anwendungen der In-situ Mikroskopie zur Überwachung von biotechnologischen Prozessen. Masterarbeit: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Prediger, A., A. Bluma, T. Hopfner, P. Lindner, S. Beutel, T. Scheper, J. J. Muller, L. Hilterhaus, A. Liese. 2011. In Situ Microscopy for Online Monitoring of Enzyme Carriers and Two-Phase Processes. *Chemical Engineering & Technology* 34:837-840.

Rehbock, C. 2009. Entwicklung eines Durchfluss-Multitestersystems zur Beobachtung von Kultivierungsprozessen in der Biotechnologie. Dissertation: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Rehbock, C., D. Riechers, T. Hopfner, A. Bluma, P. Lindner, B. Hitzmann, S. Beutel, T. Scheper. 2010. Development of a flow-through microscopic multitesting system for parallel monitoring of cell samples in biotechnological cultivation processes. *Journal of Biotechnology* 150:87-93.

Rudolph, G. 2007. Entwicklung und Einsatz inline-mikroskopischer Verfahren zur Beobachtung biotechnologischer Prozesse. Dissertation: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Rudolph, G., P. Lindner, A. Gierse, A. Bluma, G. Martinez, B. Hitzmann, T. Scheper. 2008. Online monitoring of microcarrier based fibroblast cultivations with in situ microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* 99:136-145.

Sanford, K. K., W. R. Earle, V. J. Evans, H. K. Waltz, J. E. Shannon. 1951. The Measurement of Proliferation in Tissue Cultures by Enumeration of Cell Nuclei. *Journal of the National Cancer Institute* 11:773-795.

Sonnleitner, B., G. Locher, A. Fiechter. 1992. Biomass Determination. *Journal of Biotechnology* 25:5-22.

Steinbrecher, R. 2006. Bildverarbeitung in der Praxis, 2:231.

Suhr, H., G. Wehnert, W. Storhas, P. Speil. 1991. In situ Mikroskopsonde und Messverfahren. DE Patent 40 32 002 A1.

Tscheschke, B. 2011. Optische Sensoren zur Überwachung von Säugetierzellkultivierungen. Masterarbeit: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

van der Velden-de Groot, C. A. M. 1995. Microcarrier technology, present status and perspective. *Cytotechnology* 18:51-56.

Wiedemann, P., J. S. Guez, H. B. Wiegemann, F. Egner, J. C. Quintana, D. Asanza-Maldonado, M. Filipaki, J. Wilkesman, C. Schwiebert, J. P. Cassar, P. Dhulster, H. Suhr. 2011. In Situ Microscopic Cytometry Enables Noninvasive Viability Assessment of Animal Cells by Measuring Entropy States. *Biotechnology and Bioengineering* 108:2884-2893.

Wiemann, L. O., R. Nieguth, M. Eckstein, M. Naumann, O. Thum, M. B. Ansorge-Schumacher. 2009. Composite Particles of Novozyme 435 and Silicone: Advancing Technical Applicability of Macroporous Enzyme Carriers. *Chemcatchem* 1:455-462.

8.1 Online-Quellen

[Online 1] <http://www.hightech-strategie.de/de/92.php>, 13.03.13

[Online 2] vci.de/Downloads/PDF/Biotechnologie-Statistik%202010.pdf, 07.12.12

[Online 3] bioraffinerie2021.de/cms/?page=Weitere_Wertprodukte, 28.09.12

[Online 4] abenzymes.com, 23.09.12

[Online 5] agfdt.de/loads/st10/muellabb.pdf, 27.09.12

[Online 6] abenzymes.com/products/technical-enzymes/denim-wash-and-bio-finishing, 27.09.12

[Online 7] aforgenet.com/, 19.10.12

[Online 8] <http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/HIPR2/sobel.htm>, 29.12.12

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BMP	<i>Windows Bitmap</i>
bspw.	beispielsweise
°C	Grad Celsius
Calcein AM	Acetoxymethyl-Calcein
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
cd	Candela
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
DFFM	Durchfluss-Fluoreszenz Mikroskop
durchschnittl.	durchschnittlich
ECU	<i>Endo-Cellulose-Unit</i>
et al.	et alii
F	objektseitiger Brennpunkt
F'	bildseitiger Brennpunkt
f	Brennweite
f'	Brennweite
fps	<i>frames per second</i>
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
I	Stromstärke
l	Liter
lat.	lateinisch
LBS	Laserbeugungsspektroskopie
max.	maximal
min	Minute
m	Meter
M	molar
NCU	<i>Novo-Cellulase-Unit</i>
IR	Infrarot
ISM	In-situ-Mikroskop
ISM-TT	"Tisch-auf-Tisch" In-situ-Mikroskop
LED	lichtemittierende Diode
rpm	<i>revolutions per minute</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß
RS-232	<i>recommended standard 232</i>
s	Sekunde
S. cerevisiae	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sCMOS	<i>scientific complementary metal oxide semiconductor</i>
T	Tubuslänge
TIFF	<i>Tagged Image File Format</i>
USA	<i>United States of America</i>
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
V	Volt
v.l.n.r.	von links nach rechts
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

9.2 Liste der an dieser Arbeit beteiligten Personen und Institutionen

Entwicklung der ISM-Steuersoftware sowie Implementierung der Bildverarbeitungsalgorithmen <i>Cellulose Analyzer</i> und <i>Defocussed Analyzer</i> in C#	Dr. Patrick Lindner
Entwicklung und Implementierung des Bildverarbeitungsalgorithmus <i>CHO Analyzer</i> in C#	Bernd Tscheschke
Implementierung des Bildverarbeitungsalgorithmus <i>DFFM Analyzer</i> in C#	Christian Lüder
Kultivierung von CHO K1 Zellen für die Analyse im DFFM	Alexander Babitzky
Durchführung der Laserbeugungsspektroskopie-Messungen	Institut für Feststoffverfahrenstechnik und Partikeltechnologie, TU Hamburg-Harburg
Hochzelldichte-Kultivierungen	Industrieller Kooperationspartner
Vom Autor betreute Versuchsdurchführungen im Rahmen von Bachelor- und Masterarbeiten:	
Untersuchung der mechanischen Stabilität von Enzymträgern	Daniel Marquard
Überwachung von CHO-Zellkultivierungsprozessen (ISM-TT) sowie Untersuchung von Zellmorphologie und Zellviabilität	Bernd Tscheschke

9.3 Technische Daten der verwendeten Kameras

Kamera	Sony XCD SX910	PCO Pixelfly	Andor Neo sCMOS
Max. Auflösung [Pixel]	1.280 · 960	1.392 · 1.040	2.560 · 2.160
Bildaufnahmerate bei max. Auflösung [fps]	15	13,5	30 (100 mit internem RAM-Speicher)
Max. Aufnahme rate [fps]	15	40,4	1.098 (1.616 mit internem RAM-Speicher)
Deckfläche [mm]	5,95 · 4,46	8,978 · 6,708	16,64 · 14,04
Pixel-Kantenlänge [μm]	4,65	6,45	6,5
Pixel-Kantenlänge [μm]	4,65	6,45	6,5

9.4 Aufnahme-Eigenschaften der Mikroskope

ISM III-XTF:

Kamera	Sony XCD SX910		PCO Pixelfly	
Objektiv	4x	10x	4x	10x
Abbildungsmaßstab	5,7	12,6	5,7	12,6
Kantenlänge Bildpixel [μm]	0,82	0,37	1,13	0,51
Max. Aufsichtsfläche [mm^2]	0,83	0,17	1,85	0,38

ISM-TT:

Kamera	Sony XCD SX910		PCO Pixelfly	
Objektiv	4x	10x	4x	10x
Abbildungsmaßstab	4	10	4	10
Kantenlänge Bildpixel [μm]	1,16	0,47	1,61	0,65
Max. Aufsichtsfläche [mm^2]	1,65	0,27	3,75	0,61

DFFM:

Kamera	Andor Neo sCMOS				PCO Pixelfly			
Objektiv	2x	4x	10x	20x	2x	4x	10x	20x
Abbildungsmaßstab	2	4	10	20	2	4	10	20
Kantenlänge Bildpixel [μm]	3,25	1,625	0,65	0,325	3,225	1,613	0,645	0,323
Max. Aufsichtsfläche [mm^2]	58,40	14,60	2,34	0,58	15,06	3,77	0,60	0,15

9.5 Material und Methoden

Untersuchung der mechanischen Stabilität von Enzymträgern

Es wurden jeweils 2 g Lewatit VP OC 1600 Partikel (Lanxess, Leverkusen) und 450 ml Dispersionsmedium eingesetzt. Wenn nicht anders beschrieben wurde für die Versuche eine Rührgeschwindigkeit von 80 rpm verwendet. Der verwendete Testreaktor ist aus austenitischem Edelstahl (X5CrNi18-10, Werkstoff-Nr. 1.4301, V2A) gefertigt. Die beiden 25 mm Seitenports ermöglichen den Anschluss von zwei ISM-Systemen. Der Antriebsmotor einer Biostat B Einheit wird nicht direkt auf die Rührwelle, sondern separat auf einen dafür angebrachten Aufsatz gesetzt. Der Antrieb erfolgt nun indirekt indem ein O-Ring den Antriebsmotor mit einem Rad verbindet, das in der Mitte des Kristallisationsreaktors sitzt und dessen Antriebswelle bewegt. Der Übersetzungsfaktor vom Biostat B Antriebsmotor auf die Antriebswelle des Reaktors beträgt 7,35. Eine detailliertere Beschreibung des Reaktors sowie eine reaktionstechnische Charakterisierung finden sich in der Arbeit von Bluma [Bluma, 2009].

Kameraeinstellungen Sony XCD-SX910CR

Für alle Versuche verwendete Einstellungen:

Helligkeit: 256

Kontrast: 600

Belichtungszeit: 100 μ s (49 μ s bei Versuchen in Myristinsäure)

Aufnahmerate: 15,15 fps

Videomodus: 1280 x 960 Pixel

LED-Helligkeit: 100%

Anzahl Bilder pro Aufnahmezyklus: 300

Zeit zwischen Bildaufnahmen: 1 s

Zeit zwischen Aufnahmezyklen: 15 - 30 min

Programmparameter *ParticleAnalyzer*

Für alle Versuche verwendete Parameter:

Binarisierungsschwellenwert: 120 (145 bei Versuchen in Myristinsäure)

Größenausschlusschwellenwert: 220 Pixel

Klassifizierungsschwellenwert: 1,3

Pixel to μ m ratio: 2,11

Überwachung enzymatischer Abbauprozesse von Cellulose

Für die Herstellung des Acetatpuffers werden 32,24 ml NaOH (1M) mit 50 ml Essigsäure (1M) versetzt und anschließend mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Einstellungen *InsituControl 3.1*

Für alle Versuche verwendete Einstellungen:

Messzonentiefe: 100 μm

Objektiv fokussiert auf die Mitte der Messzone

Belichtungszeit: 160 μs

Area of interest: user defined: 269,217,600,700 (600 x 700 Pixel)

Anzahl Bilder pro Aufnahmezyklus: 250

Zeit zwischen Bildaufnahmen: 1 s

Zeit zwischen Aufnahmezyklen: 60 min

Zwischen den Aufnahmezyklen wird die Messzone auf 3 mm aufgefahren.

Programmparameter *CelluloseAnalyzer*

Für alle Versuche verwendete Parameter:

Binarisierungsschwellenwert: 200

Größenausschlusschwellenwert: 75 Pixel

Pixel to μm ratio: 0,65

Median: 7

Mit Edge-Elimination

Überwachung von CHO-Zellkultivierungsprozessen (ISM-TT)

Es wurde die Kamera XCD-SX910CR von Sony verwendet.

Einstellungen *InsituControl 2.1*

Helligkeit: 256

Kontrast: 500

Belichtungszeit: 676 μ s

Aufnahmerate: 15,15 fps

Videomodus: 768x768 Pixel, zentriert

LED-Helligkeit: 100%

Anzahl Bilder pro Aufnahmezyklus: 300

Zeit zwischen Bildaufnahmen: 2 s

Zeit zwischen Aufnahmezyklen: 180 min

Messzonentiefe: 90 μ m

Programmparameter *CHOAnalyzer*

Unterer Canny-Grenzwert: 27

Oberer Canny-Grenzwert: 27

Canny-Sigma Wert: 2

Canny Binarisierungsschwellenwert: 100

Minimale Objektgröße: 100

Kultivierung der CHO-Zellen

Bioreaktor: 2l-Edelstahlreaktor

Steuereinheit: Biostat B plus (Sartorius AG, Göttingen)

Rührgeschwindigkeit: 100 rpm

Temperatur: 37°C

pH-Wert: 7,1 geregelt mit NaCO₃ und CO₂-Kopfraumbegasung

Begasung: Mit Ringsparger, Reiner Sauerstoff

Antischaum: kein

Referenzanalytik zur Zelldichte

Zur optischen Bestimmung der Zelldichte wurde eine Neubauer improved Zählkammer (Brand GmbH + Co. KG, Wertheim) verwendet. Zur Zellzahlbestimmung wurden alle vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Optimierte Überwachung von CHO-Zellkultivierungsprozessen (ISM-TT)

Für die optimierte Überwachung wurde die Kamera Pixelfly von PCO verwendet.

Einstellungen *InsituControl 3.1*

Messzonentiefe: 50 μm

Objektiv fokussiert auf die Mitte der Messzone

Belichtungszeit: 125 μs

Area of interest: zentriert, 768x768 Pixel

Anzahl Bilder pro Aufnahmezyklus: 200

Zeit zwischen Bildaufnahmen: 1 s

Zeit zwischen Aufnahmezyklen: 60 min

Zwischen den Aufnahmezyklen wird die Messzone auf 3 mm aufgeföhren

Programmparameter *CHOAnalyzer*

Unterer Canny-Grenzwert: 27

Oberer Canny-Grenzwert: 27

Canny-Sigma Wert: 2

Canny Binarisierungsschwellenwert: 100

Minimale Objektgröße: 200

Kultivierung der CHO-Zellen

Bioreaktor: Biostat C plus 10 l (Sartorius AG, Göttingen)

Kulturmedium: TC-42 Medium (Teutocell, Bielefeld) + 8mM L-Glutamin

Rührwerk: Zwei 6-Blatt Rushton Turbine, 200 rpm

Temperatur: 37°C

pH-Wert: 7,1 geregelt mit CO_2 und Na_2CO_3 (1M)

Begasung über Ringsparger: geregelt auf $\text{pO}_2 = 40\%$

Anfangs Begasung nur mit Luft, im Verlauf der Kultivierung dann mit einem Luft/Sauerstoffgemisch. Der Sauerstoffgehalt in dem Gemisch wurde immer um 10% erhöht, sobald die Begasung 0,3 l/min übersteigt.

Überdruck: 0,1 bar

Antischaum: 4 ml/l Antischaum Pluronic® F68

Animpfdichte: 4×10^6 Zellen/ml, CHO-K1 Zellen aus Vorkultur in exponentieller Phase

Probenahme am Biostat C

Vor der eigentlichen Probenentnahme muss das Probenahmeventil sterilisiert werden. Vor der Probenahme muss mindestens 30 min gewartet werden, bis das Ventil auf etwa 30°C abgekühlt ist, damit die Zellen während der Probenahme nicht beschädigt werden. Um dieses zu gewährleisten, wird das Probenahmeventil direkt nach einer Probenentnahme für die darauffolgende sterilisiert.

Der erste Teil der Probe enthält noch Kondensat von der Sterilisation. Deswegen werden die ersten 15 ml Probe verworfen. Anschließend werden weitere 15 ml Probe entnommen und für die weiteren Analysen bereit gestellt. Das Ventil wird nun wieder geschlossen. Hierbei ist zu beachten, dass der Stopfen des Ventils ist mit einem O-Ring gedichtet ist.

Nach erfolgreicher Probeentnahme wird der Dampfablauschlauch wieder am Probenahmeventil angebracht. Es erfolgt sofort eine erneute Sterilisation für 20 min.

Referenzanalytik zur Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung

Nach der Probenentnahme aus dem Reaktor erfolgt die Zellzahlbestimmung mithilfe eines Cellometer Auto T4 Cell Counter (Nexcelom, Lawrence, USA). Dazu werden 100 µl Probe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Färbung der Zellen werden 100 µl Trypanblau (0,2%ige Lösung) zugegeben und durchmischt.

Besonders wichtig ist es die Probe ausreichend zu homogenisieren. Für die Zellzahlbestimmung werden 20 µl der gefärbten Probe auf ein Cellometer Slide aufgetragen, so dass die Kapillare des Slides vollständig benetzt ist. Der Slide wird anschließend in das Gerät eingeführt, der Start der Zellzählung erfolgt per Software. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Überwachung von CHO-Hochzelldichte-Kultivierungen

Verwendete Kamera: PCO Pixelfly

Verwendetes Objektiv: 10-fach

Einstellungen *InsituControl 3.1*

Messzonentiefe: 32,25 μm

Objektiv fokussiert auf die Mitte der Messzone für fokussierte Bilder und 60 μm weiter von der LED entfernt für defokussierte Bilder

Belichtungszeit: 100 μs

Area of interest: defined: 269,217,600,700 (600 x 700 Pixel)

Anzahl Messzyklen: 10

Anzahl Bilder pro Aufnahmezyklus: 20

Zeit zwischen Bildaufnahmen: 1 s

Zeit zwischen Aufnahmezyklen: 1 min

Zwischen Aufnahmezyklen wird die Messzone auf 3 mm aufgefahren und anschließend im Bereich von $\pm 1,5$ mm verfahren.

Programmparameter *DefocussedAnalyzer*

Binarisierungsschwellenwert: 200

Minimaler Objektdurchmesser [μm]: 8

Maximale Kompaktheit: 3

Kultivierung der CHO-Zellen

Wurde vom Kooperationspartner durchgeführt. Für die Versuche wurden jeweils 450 μl Zellsuspensionsprobe in den Testreaktor gefüllt und dort bei 100 rpm gerührt. Der Testreaktor ist der selbe, der für die Versuche in Kapitel 4.2 verwendet wird. Der einzige Unterschied ist, dass das Rührwerk durch einen Schrittmotor angetrieben wird. Nach der Probenentnahme aus dem Reaktor erfolgt die Zellzahlbestimmung mit dem automatischen Zellzählssystem Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Brea, USA).

Untersuchung von Zellmorphologie und Zellviabilität

Es wurde die Kamera XCD-SX910CR von Sony verwendet.

Einstellungen *InsituControl 2.1*

Helligkeit: 256

Kontrast: 500

Belichtungszeit: 676 μ s

Aufnahmerate: 15,15 fps

Videomodus: 768x768 Pixel, zentriert

LED-Helligkeit: 100%

Anzahl Bilder pro Aufnahmezyklus: 300

Zeit zwischen Bildaufnahmen: 2 s

Zeit zwischen Aufnahmezyklen: 180 min

Messzonentiefe: 90 μ m

Programmparameter *CHOAnalyzer*

Unterer Canny-Grenzwert: 27

Oberer Canny-Grenzwert: 27

Canny-Sigma Wert: 2

Canny Binarisierungsschwellenwert: 100

Minimale Objektgröße: 100

Kultivierung der CHO-Zellen

Bioreaktor: 2l-Edelstahlreaktor

Steuereinheit: Biostat B plus (Sartorius AG, Göttingen)

Rührgeschwindigkeit: 120 rpm

Temperatur: 37°C

pH-Wert: 7,1 geregelt mit NaOH (1M) und CO₂-Kopfraumbegasung

Begasung: Mit Ringsparger, Luft-/O₂-Gemisch auf pO₂=40%

Antischaum: 4 ml/l Antischaum Pluronic® F68

Referenzanalytik zur Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung

Zur optischen Bestimmung der Zelldichte und Viabilität wurde eine Neubauer improved Zählkammer (Brand GmbH + Co. KG, Wertheim) verwendet. Die Zellsuspension wurde 1:2 mit 0,4%iger Trypanblau-Lösung verdünnt und unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden alle vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Konstruktion und Optimierung des DFFM

Saphirglasscheibenklebung

Für die Klebung der Saphirglasscheiben auf Edelstahltuben wird der Epoxid-Klebstoff Polytec EP 653 verwendet. 10 Teile von Komponente A werden mit 1 Teil von Komponente B vermischt. Dieses Gemisch wird in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zum Kleben wird ein Reaktionsgefäß aufgetaut und die zu klebenden Oberflächen mit Isopropanol gereinigt. Kleine Tropfen der Mischung werden auf den Oberflächen ausgestrichen. Die Aushärtung erfolgt für 2 h bei 180°C im Trockenschrank.

Optimierung des Strahlengangs

Für die Aufnahmen zur Optimierung des Strahlengangs wurde das 10-fach Objektiv verwendet. Folgende Einstellungen wurden verwendet:

Belichtungszeit: 0,001 s

Area of interest: Full image

Binning: 1x1

Data Mode: Min-Max

Beleuchtung: Halogenlampe Stufe 1, halbe Iris

Charakterisierung des DFFM

Erste Fluoreszenzanwendung:

Die Fluorescein-Verdünnungsreihe wurde aus seiner Fluorescein-Stammlösung ($c = 1\text{mM}$) und Tris-Puffer ($c = 0,05\text{ M}$, Ionenstärke: 0,015, pH-Wert bei 22°C = 8,41) hergestellt.

Kameraeinstellungen:

Belichtungszeit: 0,5 s

Area of interest: 1392x1040 Pixel

Binning: 1x1

Data Mode: Custom: 0-2000

Filterkombination: 490 nm / 514,5 nm (Bandpass-Interferenzfilter, 10 nm Bandweite)

Beleuchtung: Halogenlampe Stufe 1, volle Iris

Messzonenlineartisch auf Position 20,00, Fokuslineartisch auf Position 21,50

Untersuchung von CHO-Zellkultivierungsprozessen (DFFM)

Zellfärbung mit Calcein AM:

Calcein AM Stock-Lösung wird in wasserfreiem DMSO (99,8%) angesetzt (c= 1mM). Die Lösung wird bei -20°C für maximal 2 Monate gelagert. Für die Färbung wird 1 ml Zellprobe mit 5 µl Calcein AM-Stock-Lösung versetzt. Die Probe wird im Anschluss für 30 min im Thermoschüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg) bei 30°C und 700 rpm inkubiert. Im Anschluss wird die Probe durch das DFFM gepumpt. Das Pumpen wird alle 10 Sekunden für 3 Sekunden ausgesetzt. In dieser Pause erfolgt jeweils eine Bildaufnahme.

DFFM Einstellungen:

Objektiv: 20-fach

Exzitationsfilter: 488 nm und Emissionsfilter: 514,5 nm

Messzonentisch auf Position 22,32 // Fokuslineartisch auf Position 21,525

Belichtungszeit: 0,5 s // Frame rate: 0,1

Beleuchtung: Halogenlampe Stufe 2, volle Iris

Area of interest: 1392x1040 Pixel

24-bit .tiff Aufnahmen // Binning: 1x1 // Data range: 100-300

Anzahl der Aufnahmen pro Messpunkt:

Für Zelldichte und Viabilitätsmessungen: 60

Verwendetes FIA-Master Skript:

Zeit	Pumpbefehl
1	S0
7	S99
10	

Programmparameter *DFFMAnalyzer*

Sobel-Parameter, hoch: 120

Sobel-Parameter, niedrig: 30

Viabilitätsgrenzwert: 56

9.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am 15.01.1985 in Hannover

Familienstand: ledig

Anschrift: Andreas Prediger, Sudersenstr. 1, 30451 Hannover

E-Mail Adresse: prediger@iftc.uni-hannover.de

Berufserfahrung

- | | |
|--------------------------|--|
| Juni 2010 - Juni 2013 | Promotion im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover <ul style="list-style-type: none">• Betreuung der Promotion: Prof. Scheper• Seit Januar 2011 Hauptverantwortlicher für Projekte im Bereich In-situ-Mikroskopie |
| Juni 2009 – Oktober 2009 | Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover <ul style="list-style-type: none">• Aufreinigung und Analyse von Naturstoffen |

Ausbildung

- | | |
|---------------------------|---|
| Oktober 2007 – April 2010 | Studium an der Leibniz Universität Hannover
Studiengang: Life Science, M.Sc.
Abschluss: Master of Science
Abschlussnote: -ausgezeichnet- |
| Juli 2008 – November 2008 | Auslandssemester an der University of Queensland, Australien
Gefördert durch ein Semesterstipendium des Deutschen Akademischen Austausch Dienstes |
| Oktober 2004 – Sept. 2007 | Studium an der Leibniz Universität Hannover
Studiengang: Life Science, B.Sc.
Abschluss: Bachelor of Science
Abschlussnote: -ausgezeichnet- |
| Oktober 2003 – Juni 2004 | Grundwehrdienst |
| Juni 2003 | Abitur am Gymnasium der Wichernschule in Hamburg, Abschlussnote: 1,6 |

9.6.1 Im Rahmen der Promotion entstandene Publikationen

1. Prediger, A.; Bluma, A.; Höpfner, T.; Lindner, P.; Beutel, S.; Scheper, T.; Müller, J. J.; Hilterhaus, L.; Liese, A., In Situ Microscopy for Online Monitoring of Enzyme Carriers and Two-Phase Processes. *Chemical Engineering & Technology* 2011, 34 (5).
 2. Prediger, A.; Bluma, A.; Höpfner, T.; Lindner, P.; Beutel, S.; Scheper, T.; Müller, J. J.; Hilterhaus, L.; Liese, A., In-situ-Mikroskopie zur Online-Überwachung von Enzymträgern und Zweiphasenprozessen. *Chemie Ingenieur Technik* 2011, 83 (6).
 3. Akin, M.; Prediger, A.; Yuksel, M.; Höpfner T.; Demirkol, D.; Beutel, S.; Timur, S.; Scheper, T., A new set up for multi-analyte sensing: *At-line* bio-process monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* 2011, 26 (11).
 4. Bluma, A.; Höpfner, T.; Prediger, A.; Glindkamp, A.; Beutel, S.; Scheper, T., Process analytical sensors and image-based techniques for single-use bioreactors. *Engineering in Life Sciences* 2011, 11 (4).
 5. Bonk, S.; Sandor, M.; Rüdinger, F.; Tscheschke, B.; Prediger, A.; Babitzky, A.; Solle, D.; Beutel, S.; Scheper, T., In In-situ microscopy and 2D fluorescence spectroscopy as online methods for monitoring CHO cells during cultivation, 22nd European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting on Cell Based Technologies 2011, Vienna, Austria.
 6. Prediger, A.; Lindner, P.; Bluma, A.; Reardon, K. F.; Scheper, T., In situ microscopy. In *Optical Techniques for Regenerative Medicine* 2013, Morgan, S.; Rose, F. R.; Matcher, S., Eds. Taylor & Francis.
- Eingereicht:
7. Havlik, I.; Reardon, K. F.; Ünal, M.; Lindner, P.; Prediger, A.; Babitzky, A.; Beutel, S.; Scheper, S., Monitoring of microalgal cultivations with on-line, flow-through microscopy. *Algal Research*.
 8. Opitz, B.; Prediger, A.; Lüder, C.; Eckstein, M.; Hilterhaus, L.; Lindner, P.; Beutel, S.; Scheper, T.; Liese, A., In situ Microscopy for Inline Monitoring of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Analytical Chemistry*.

Beiträge zu den aufgelisteten Publikationen:

- Entwicklung der In-situ-Mikroskope (in Kooperation mit A. Bluma und T. Höpfner)
- Durchführung der mikroskopischen Messungen und der zugehörigen Versuche sowie die Auswertung der gewonnen Bilddaten für die Publikationen 1, 2, 3, 5 und 8
- Entwicklung der Auswertungsalgorithmen (in Kooperation mit P. Lindner und C. Lüder)
- Verfassen der Texte der Publikationen 1, 2, 3, 6 und 8 (in Kooperation mit M. Akin, A. Bluma, P. Lindner, K. F. Reardon, T. Scheper und B. Opitz)