

Anvendelse af 2D-fluorescens-spektroskopi til overvågning af bioprocesser

Innovative styrings- og overvågningsværktøjer udgør til stadighed en mere betydningsfuld del af procesteknikken. En af de seneste tendenser inden for dette område er anvendelse af fluorescens-sensorer

Af Carsten Lindemann, DELTA, cli@delta.dk

Oversat fra engelsk af Birgitte Melgaard Pedersen, DELTA, bmp@delta.dk

En bioproces er et meget komplekst system, som består af mikroorganismer og deres fysiske og kemiske omgivelser. Effektiv proceskontrol og modellering er et basalt krav for på optimal vis at kunne udnytte det biologiske materiale. I stedet for gentagne gange at udtage prøver og foretage off-line analyser, er automatiske kontrolsystemer at foretrække, idet de kontinuert kan levere de ønskede data.

Til opsamling af disse data er optisk spektroskopi et særdeles effektivt værktøj, der kan benyttes i forbindelse med den type analysemetoder, der er baseret på vekselvirkning mellem analytter og lys. Spektroskopi har den fordel at kunne overvåge en proces kontinuert og på en måde, der hverken er invaderende eller ødelæggende for processen.

Det er derfor en ideel metode til overvågning og styring af bioprocesser, idet yderligere biologisk kontamination nemt kan undgås. Da de fleste optiske systemer ikke interfererer med cellemetabolismen, er en ikke-ødelæggende *in-vivo*-overvågning mulig. Derved fremkommer intracellulære informationer, som ellers er næsten umulige at detektere vha. mere traditionelle metoder. Generelt set er hverken prøveudtagning, som altid indebærer en vis risiko for kontaminering, eller tidskrævende prøveforberedelser nødvendige i forbindelse med optiske sensorsystemer. Også analytforbruget vil i de fleste tilfælde være lig nul. Der kan foretages målinger af såvel intracellulære som extracellulære analytter, hvilket muliggør både kvalitative og kvantitative data. Et eksempel på en udbredt optisk metode til procesovervågning er NIR-spektroskopi, hvor absorptionskarakteristikken af stoffet måles i det nær-infrarøde bølglængdeområde.

2D-fluorescens-spektroskopi til overvågning af bioprocesser

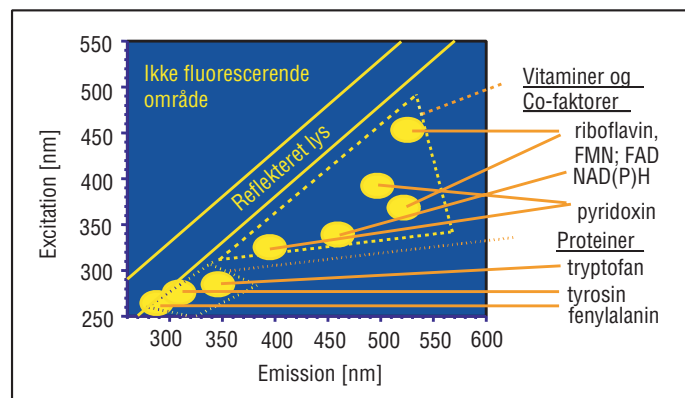
Brugen af todimensional fluorescens-spektroskopi i forbindelse med on-line overvågning af bioprocesser er relativ ny. Fluorescens-spektret (emissionsspektret) måles for forskellige excitationsbølglængder, hvorved en todimensional excitation-emission-matrix fremkommer. Den optiske metode er ikke-invaderende og er derfor egnet til *in-vivo*-målinger. Metoden dækker et bredt område af excitations- og emissionsbølglængder i det UV/Vis-område, med et karakteristisk excitationsbølglængdeområde fra 250–550 nm og et emissionsbølglængdeområde fra 260–600 nm. Biogene fluorophorer såsom proteiner, co-enzym og vitaminer kan øjeblikkeligt detekteres kvalitativt og kvantitativt indeni og udenfor cellerne (figur 1). Indenfor et minut er et helt spektrum med de beskrevne parametre udmålt, hvilket muliggør en næsten kontinuert overvågning af bioprocessen. Det gør, at

teknikken er ideel til on-line, *in-situ*-målinger via fiberoptiske systemer [1].

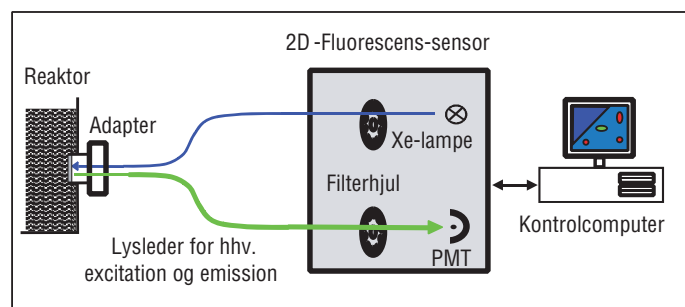
En mulig opstilling til on-line målinger af industrielle processer, som er realiseret i BioView-systemet, kan ses i figur 2. Excitations- og emissionsbølglængderne er valgt vha. to uafhængige filterhjul, som hver især indeholder 16 filtre. Der er monteret et ND-filter i hvert af filterhjulene, hvorved man ud over fluorescens kan få oplysninger om turbiditet og spredningskarakteristik. En 25 mm standardport anvendes til at forbinde sensorens lyskilde til processen.

Anvendelsesområder

Teknologien kan anvendes inden for næsten alle typer af processer, hvor der er fluorophorer til stede; lige fra kemisk og farmaceutisk produktion til levnedsmiddelteknologi. Hoved-



Figur 1. Afbildning af biogene fluorophorer i excitation-emission-matricen.



Figur 2. Opstilling til on-line måling af 2D-fluorescens.

anvendelsen må dog tilskrives bioteknologisk produktion, idet mange intra- og extracellulære substanser (såsom NADH/NADPH, aromatiske aminosyrer, vitaminer osv.) afgiver tydelige fluorescens-signaler. De følgende eksempler illustrerer forskellige anvendelsesmuligheder for BioView-systemet.

Høj celledensitet ved dyrkning af *E. Coli*

2D-fluorescens-teknikken er bl.a. blevet benyttet til at iagttage væksten af *E. Coli*-celler med en høj celledensitet. I figur 3 ses fluorescens-signalet ved filterkombinationen; excitation 290 nm/emission 450 nm. Værdierne for celledørstof er også vist. Off-line prøver blev udtaget ved intervaller, som startede efter at dyrkningen havde været i gang i 17 timer. Figuren viser tydeligt, at begge kurver følges ad. Selv ved den høje koncentration af biomasse på 120 gram pr. liter (hvilket svarer til en optisk densitet på 400 ved 590 nm) i slutningen af dyrkningen, kan fluorescens-værdierne detekteres uden problemer [2].

Brug af chromatografisk separering af komponenter fra melasse

Chromatografiske kolonner benyttes til at adskille forskellige komponenter i melassen. En af de værdifulde komponenter, der skal isoleres, er serin, en aminosyre, som anvendes som substrat senere i processen. Den traditionelle metode til at bestemme fraktionspunkterne er baseret på historiske off-line data fra tidligere separationscykler. Da retentionstiden ændres fra cyklus til cyklus, er fraktionspunkter bestemt vha. denne metode ikke særligt pålidelige, og derved er en dyr oprensning nødvendig for at kunne udvinde mest mulig serin [3]. Til

bestemmelse af fraktionspunkter benyttes nu i stedet en BioView-sensor ved udgangen af den 60 m³ chromatografiske kolonne til procesovervågning og styring, for herved at kunne udvinde mest muligt serin pr. cyklus. For at kunne bestemme serinkoncentrationen ud fra fluorescens-målingerne, blev en PLS (Partial Least Squares) regressionsmodel mellem fluorescens-data og serinkoncentrationen udviklet. Figur 4 viser sammenhængen mellem den beregnede og den målte elueringsprofil for serin.

Overensstemmelsen mellem den beregnede og den målte elueringsprofil for serin har vist sig at gælde for mange separationscykler med forskellige chromatografiske kolonner. I kraft af at man nu kontrollerer processen vha. fluorescens-spektroskopi er produktkoncentrationen steget med 60%. Da dyre oprensninger og forkerte fraktionspunkter ikke længere er et problem, bliver der sparet store mængder procesvand og kemikalier, og dermed er den chromatografiske proces ikke kun mere økonomisk, men også mere miljøvenlig.

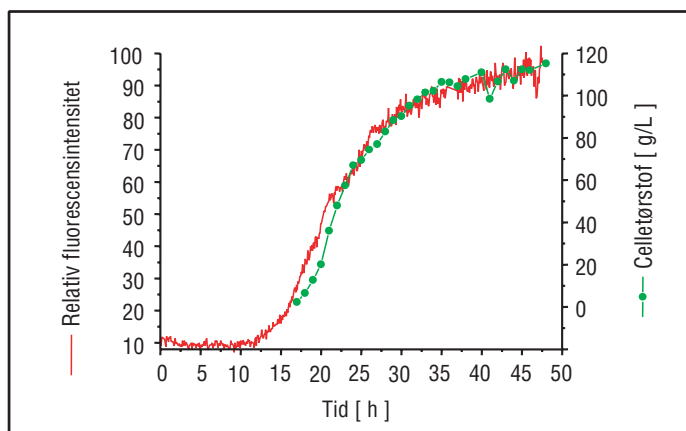
Konklusion

Overvågning af bioprocesser vha. 2D-fluorescens-spektroskopi er en ny optisk metode, som gør det muligt at få on-line information om processens status. Processtyring er muligt både ved udnyttelse af den direkte korrelation mellem fluorescens-intensitet og analyt i de tilfælde, hvor spektrets kompleksitet er lille, og ellers ved at skabe matematiske (kemometriske) modeller ved større kompleksitet af fluorescens-data.

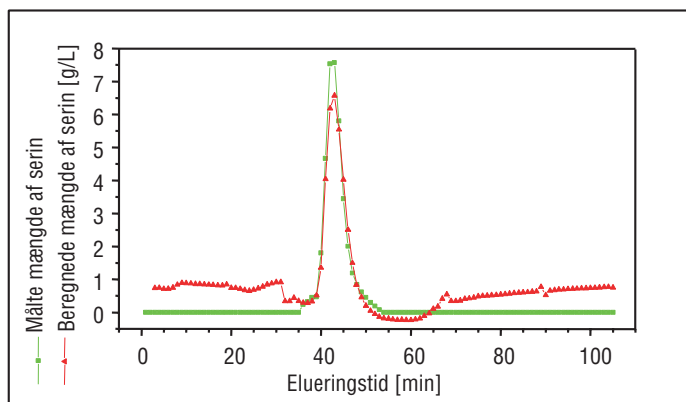
En endnu mere sofistikeret metode til implementering af fluorescens-spektroskopi i procesmiljø kan opnås ved at kombinere signaler fra forskellige sensorer, hvorved yderligere information om processen bidrager til det samlede tolkningsbillede. Denne metode anvendes af Center for Kombinationssensorer (CKS) til overvågning og styring af bioteknologiske processer. I Center for Kombinationssensorer medvirker de fem industripartner: Alpharma A/S, Arla Foods, Chr. Hansen A/S, Foss Electric A/S, Novozymes A/S; et universitet: Center for Bioteknologisk Procesforskning, BioCentrum-DTU; samt to GTS-institutter: Bioteknologisk Institut og DELTA. (Se også artiklen *Kombinationssensorer er lovende til teknologisk produktion*, side 4)

Referencer:

1. Lindemann, C., Marose, S., Scheper, T., Nielsen, H.O., Reardon, K.F., Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation, John Wiley & Sons, Inc.; 1999, p. 1238-1244
»Fluorescence techniques for bioprocess monitoring«
2. Lindemann, C., Stärk, E., GIT Labor-Fachzeitschrift, September 1999 (Vol. 9), p. 881-883; »Einsatz von Online 2D-Fluoreszenzsensoren in der Biotechnologie«
3. Ulber, R., Faurie, R., Sosnitzer, P., Fischer, L., Stärk, E., Harbeck, C., Scheper, T., Journal of Chromatography A, 2000, 882, p. 329-332, »Monitoring and control of industrial downstream processing of sugar beet molasses«



Figur 3. Korrelation mellem intensitet af fluorescens-signal og koncentration af celledørstof.



Figur 4. Sammenhæng mellem den beregnede og den målte elueringsprofil for serin.