

# **Application of in situ microscopy for the on-line monitoring of bacterial fermentation processes**

*Günter Claus, Rachel Mürle, Ashwini Bhandiwad, Hajo Suhr*

*Mannheim University of Applied Sciences, Mannheim, Germany*

An in situ microscope (ISM) enables the capture of real time images from stirred and aerated microbial cultures within a bioreactor to a computer and display. The image data can be processed to provide on-line monitoring of cell-density and morphological parameters e.g. cell size. Two such systems have been described in literature (Suhr et al, 1995; Bittner et al, 1998). We used a new version of the former which is characterized by an optical fiber illumination with a pulsed LED light source (Wiedemann et al, 2011). The objective (40 x magnification, 0.75 NA) and the illumination fiber are combined in a tube which fits in a 25 mm standard port of a bioreactor. At the front end, the tube is closed by a quartz-window. During sterilization, the tube remains in the port, so that the sterility barrier is not opened. CCD-camera and objective are being detached during the sterilization process.

The main challenge for the application of in situ microscopy in bacterial cultivation processes is the broad range of cell-densities that occur during the different growth phases. We solved the problem by the development of two different measuring modes with a single instrumentation. Here we demonstrate the application of our adapted system for the successful on-line monitoring of *E. coli* batch fermentations over a range of three orders of magnitude in cell-concentration. ISM-data was compared with off-line analyses results by standard methods such as cell counting (using counting chamber) and optical density measurement at a wave length of 600 nm ( $OD_{600}$ ).

The ISM cell counting mode was used up to a concentration of  $3.0 \times 10^9$  cells per mL, corresponding to an  $OD_{600}$  of 5.0. At higher cell-densities the brightness of the image was measured by the ISM instead of cell counts. We compute the cell-density from the brightness measurement by using a modified Lambert-Beer model. The model is calibrated by fitting it to the brightness data as a function of externally measured cell-density data. With this calibrated model, we obtain a reasonably good estimate of the cell density up to  $5.3 \times 10^{10}$  cells per mL, corresponding to an  $OD_{600}$  of 60. The achieved cell mass concentration (dry weight) was 17.4 g/L. We are confident to adapt the system further to higher cell densities that can meet the requirements of industrial processes today.

## **Online-Ethanol and Online-Methanol Measurements in Fermentation Processes**

*Hartlep M. and Künnecke W., TRACE Analytics GmbH, Braunschweig / Germany;  
Penders H., Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt a. M. / Germany*

Ethanol and Methanol are products of various microorganisms. Depending on the process they can be main product, by-product, or can be used as inducer. In a lot of processes it is important to monitor the amount of Ethanol or Methanol in order to know the end point of the fermentation or to avoid a toxic concentration inside the fermentation broth. For some organisms Methanol is used as an inducer, where the concentration must be controlled in a very tight range.

BioPAT<sup>®</sup>Trace is a new online analyzer for measuring Methanol and Ethanol in fermentation processes. The range of Methanol concentration is 0.5 - 20 g/L and the range of Ethanol concentration is 1 - 40 g/L. The measurement frequency is ca. 25 per hour. Because of the internal temperature correction coefficient a temperature range from 15°C to 25°C is possible.

The detection performed by a combination of an enzymatic reaction and an amperometric measurement. Ethanol (Methanol) is converted via immobilized Alcoholoxidase inside an enzyme reactor to Acetaldehyde (Formaldehyde) and Hydrogenperoxide. The Hydrogenperoxide is measured on a platinum electrode. The enzyme reactor has a life time of 5000 measurements or 14 days.

The Ethanol concentration profiles of industrial fed-batch processes were monitored online with the BioPAT<sup>®</sup>Trace and were compared with offline measurements.

# Online-Messung der Biomasse von Schüttelkolbenkulturen über eine optische Multisensorplattform

*Christian Ude, Leibniz-Universität-Hannover, Hannover, Deutschland;*

## **Relevanz**

Die Schüttelkolbenkultivierung ist ein etabliertes Verfahren, um Mikroorganismen mit geringem Aufwand kostengünstig zu vermehren. Sie stellt Vorkulturen für das scale up bereit, ist geeignet zum Screening verschiedener Kultivierungsbedingungen und ermöglicht eine schnelle Validierung neuer Medien. Auch für die heterologe Produktion von Proteinen werden im kleinen Maßstab Schüttelkolben bevorzugt. Die Beurteilung des Kulturstatus sieht eine kontinuierliche Überwachung des Wachstums über die Messung der optischen Dichte vor. Deshalb ist es von Vorteil die übliche manuelle Probennahme durch ein rechnergestütztes Messverfahren zu ersetzen.

## **Ziele**

In Kooperation mit der PreSens GmbH (Regensburg) wurde eine Multisensorplattform zur Überwachung relevanter Prozessgrößen entwickelt (pH, O<sub>2</sub>, Biomasse). Die Evaluierung des OD-Sensors für Zellsuspensionen stand dabei im Fokus. Es wurden Kalibrierungen des Messsignals bezüglich der Referenzgrößen mittels Kultivierung verschiedener pro- und eukaryotischer Mikroorganismen aufgestellt. Die Zellgröße wurde als Einflussfaktor auf das Messsignal genauer untersucht. Außerdem konnte seine Sensitivität während diauxischem Wachstum und einer fed-batch-Kultivierung ermittelt werden. Es wurde die maximale Eindringtiefe des Lichtes bestimmt und eine Methode zur Messung bei geringer optischer Dichte entwickelt.

## **Ergebnisse**

Die Kalibrierung des Messsignals gegenüber den Prozessgrößen ist innerhalb eines Kultivierungssystems unter Anwendung Bleasdale-Nelder-Funktion sehr gut reproduzierbar. Es ist weiterhin abhängig von der Medienzusammensetzung und Variationen in der Zellmorphologie. Eine Stärke der Messmethode war ihre hohe Sensitivität. Auch sehr kurze Wachstumsstopps sind im Signalverlauf erkennbar. Durch Modifikationen ist eine genaue Messung ab einem Wert von OD<sub>600</sub> = 0,6 möglich.