

Abschlussbericht an die Max-Buchner Stiftung. Projekt 2528
Charakterisierung der Morphologie von submers kultivierten Moosen mittels
Bildverarbeitung

Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Institut für Verfahrenstechnik in den Lebenswissenschaften, Bereich Bioverfahrenstechnik,
Universität Karlsruhe

Abstract

Verschiedene Methoden für die Zerkleinerung von Protonema-Agglomeraten des Mooses *Physcomitrella patens* wurden geprüft, um eine strikte Kontrolle der Homogenität der Suspension zu gewährleisten. Die Charakterisierung der resultierenden morphologischen Zustände wurde mittels Bildverarbeitung durchgeführt. Für diesen Zweck wurde ein Algorithmus, der aus graphischen Daten mikroskopische Formenparameter erzeugt, adaptiert. Die morphologische Information wurde mit der Variation der Kohlendioxidfixierung und der freien Pigmente nach der Zerkleinerung verglichen. Die Zerkleinerung der Moos-Protonema im Pilot-Reaktor wurde auf der Basis des Rotor-Stator Prinzips durchgeführt. Mit dieser Technik wurden klare Vorteile, im Vergleich zu herkömmlichen Zerkleinerungsmethoden bezüglich des Wirkungsgrads, des Energieeintrages und der Reduktion der Photosynthese, erzielt. Mit der Einführung der fokussierten Zerkleinerung und der Perfusion bei Kultivierungen in einem 30 Liter Pilot Photobioreaktor wurde auch eine deutliche Verzögerung der Entstehung von Gametophoren erreicht. Eine enge Kontrolle der Morphologie ist eine wichtige Voraussetzung für die künftige Anwendung des Mooses als Erzeuger relevanter heterologen Proteine.

Methoden und Algorithmus

Das Zellmaterial rekombinanter Stämme von *Physcomitrella patens* wurde unter Zerkleinerung und Perfusion axenisch in einem 30 Liter Pilot-Rohrphotoreaktor kultiviert.

Die Moos-Aggregate wurden offline mit einer CCD Kamera (Sony –XC-77CE) aufgenommen, die an ein Licht-Mikroskop (Leitz-Biomed) angeschlossen war. Ein Algorithmus für die Analyse von filamentösen Organismen (Pons et Al., 1998; Pinto et Al., 2004) wurde für diesen Zweck unter der Plattform für Bildverarbeitung Visilog 6,1. (Noésis, Les Ulis, Frankreich) angepasst.

Für die Erkennung der Biomasse wurde jedes Bild zunächst segmentiert. In diesem Schritt wurden die binären Bilder, die aus einem Entropie-basierten Algorithmus (für unzerkleinerte Fäden und Agglomerate) und einem *top-hat* Algorithmus (um die Membranen beschädigter Zellen zu entdecken) logisch kombiniert. Ein 1-Iteration *closing* wurde dann verwandt, um kleine Löcher in

den Moosfäden zu füllen, ohne leere Plätze in der Mitte von Agglomeraten herauszunehmen. Kleine Objekte, deren Größe unter einem gegebenen Wert lag, wurden als Trümmer betrachtet und eliminiert. Dies resultierte in einem binären Bild B. Jedes Objekt auf diesem Bild B wurde einzeln charakterisiert. Die Anwesenheit von Pellets wurde durch die Anwendung einer 15-Iterationen linearen Verdünnung, die den dünnen Teil jedes Objekts beseitigt, detektiert. Der übrige Teil war der Kern (Bild C) und seine Größe (core_size) wurde aus dem maximalen Wert seiner Euklidischen Entfernungspalette ermittelt. Der filamentöse Teil (Bild F) wurde aus der logischen Differenz zwischen den Bildern B und C wiedergewonnen. Um die Länge der Fäden (L_F) zu kalkulieren, wurden sie zuerst skelettiert. Die Elemente, die kleiner als 10 Pixels waren, wurden als Rauschen betrachtet und zurückgeschnitten (siehe Abb. 1)

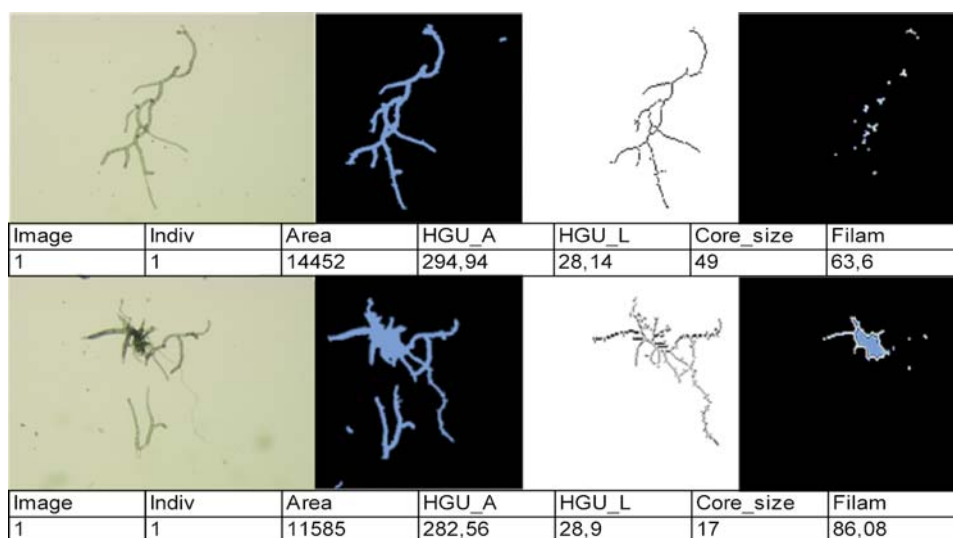


Abb. 1 Parametrisierung zerkleinerter Agglomerate von *P. patens* mittels eines Inline Rotor-Stator in einem 30.0 Liter Rohrphotoreaktor. Die Entwicklung von Gametophoren und Protonema-Agglomeraten wurde mit Formenparametern quantifiziert. Unten, junge Gametophor (core size=49). Oben, Protonema mit einem großen Anteil an Chloronema (core size=17). Bilder: 1297µm X 1014µm.

Die Oberflächen-basierte Hyphen-Wachstumseinheit (HGU_A) der Moose wurde als (A_F/N_{tip}) definiert, wobei (A_F) die projizierte Oberfläche der Fäden und (N_{tip}) die Anzahl der Fadenspitzen sind. Die Hyphen-Wachstumseinheit auf der Basis der Fadenlänge (HGU_L) gleichete (L_F/N_{tip}) . Der filamentöse Anteil wurde als das Verhältnis zwischen (A_F) und der gesamten projizierten Oberfläche eines einzelnen Objekts definiert. Der Wert eines morphologischen Parameters zu einem Zeitpunkt entspricht dem korrigierten Durchschnitt von wenigstens 50 Bildern einer gemeinsamen 10 ml Probe.

Evaluation der Zerkleinerung

Zwei Behandlungen mit dem Inline Rotor-Stator für die Zerkleinerung von *Physcomitrella*-Agglomeraten wurden betrachtet. Bei der intensiven Behandlung wurde die durchschnittliche Verweilzeit der Zellen im Zerkleinerer im Vergleich zu dem besten Ergebnis aus Offline-Versuchen

verdoppelt. Der Effekt der Aufprallung aufgrund der Erhöhung der axialen Geschwindigkeit im Reaktor wurde mit den Versuchen mittels Rotor-Stator verglichen (siehe Abb. 2).

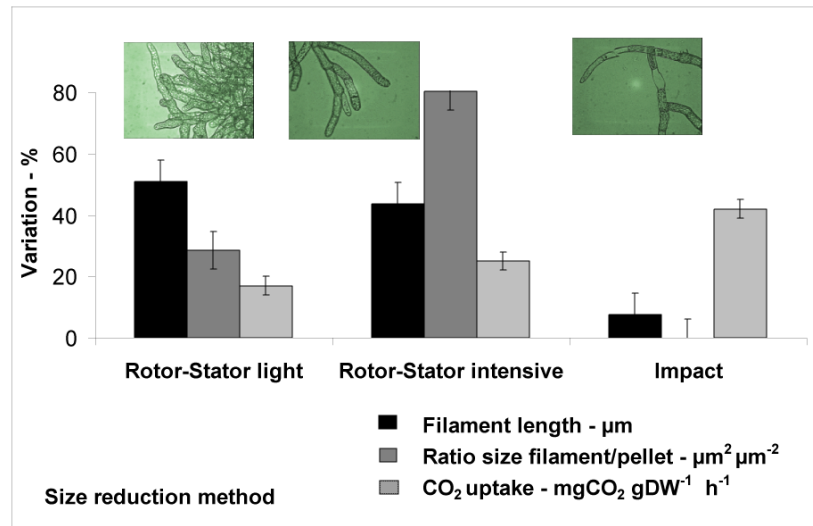


Abb. 2 Vergleich zwischen drei Zerkleinerungsmethoden von *P. Patens* Protonema in einem 30-Liter Photobioreaktor. Die Versuche mit dem Rotor-Stator wurden bei 25000 rpm durchgeführt. Der dritte Versuch entspricht der Aufprallung der Zellen bei einer axialen Geschwindigkeit von 2.5 m s^{-1} . Die Variation der korrigierten Fadenlänge, der Beziehung der Oberfläche-Filament/Pellet und der Kohlenstoffdioxidaufnahmerate wurde dargestellt. Konzentration der Biotrockenmasse: $0.5 \pm 0.05 \text{ g l}^{-1}$. Bilder: $320\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$.

Kontrolle der Morphologie in der Kultivierung

Die morphologische Änderung von *Physcomitrella patens* in einer submers Kultivierung konnte durch das Verhältnis zwischen der korrigierten Oberfläche von Filamenten und Pellets und die durchschnittliche Fadenlänge (Abb. 3) illustriert werden.

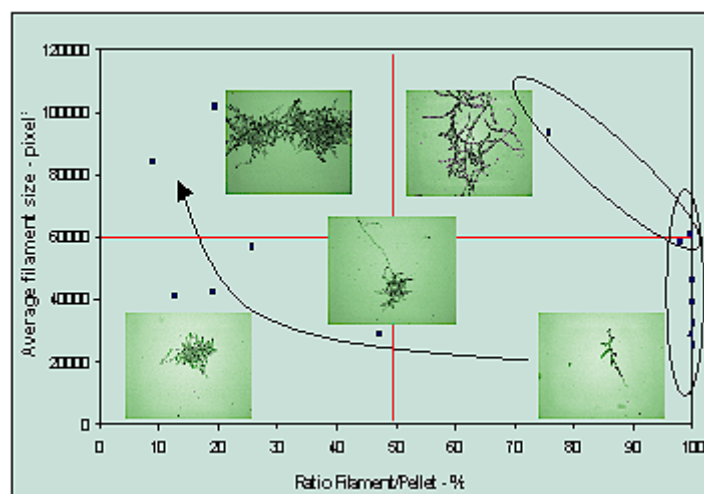


Abb. 3 Der Pfeil stellt die morphologische Variation von *Physcomitrella patens* in Suspension in einem 30 Liter Photobioreaktor unter Batch-Betrieb ohne Beeinflussung der Morphologie dar. Die Ellipsen zeigen die enge Kontrolle der Form und Größe der Moose mittels Inline Zerkleinerung ohne evidente Beeinträchtigung der Zellaktivität (siehe auch Abb. 2). Bilder: $1297\mu\text{m} \times 1014\mu\text{m}$.

Die erzeugten morphologischen Parameter eignen sich, um den beobachteten Zustand der Zellen in der Kultivierung zu ermitteln.

Mittels einer Inline Zerkleinerung konnte die Entwicklung der Pellets fast aufgehalten und die durchschnittliche Fadenlänge in einem engen Bereich behalten werden. Die Zell-Differenzierung wurde verzögert aber nicht gestoppt. Auf jeden Fall war der Anteil an Gametophoren in der Suspension mit der Behandlung durch den Rotor-Stator stark reduziert.

Literatur

Pinto, L.S., Vieira, L.M., Pons, M.N., Fonseca, M.M.R. and Menezes, J.C. (2004) Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. *Biopro. Biosys. Eng.*, 26: 177-184

Pons, M.N., Drouin, J.F., Louvel, L., Vanhoutte, B., Vivier, H. and Germain P. (1998) Physiological investigation using image analysis. *J. Biotechnol.*, 65:3-14.

Eigene Publikationen aus dem Projekt

A. Lucumi and C. Posten, "Culture of moss cells in photoreactors for the production of recombinant proteins," presented at Bioperspective conferences, Wiesbaden, Germany, 2004.

A. Lucumi, C. Posten, and M.N. Pons, M.-N. (2004) Charakterisierung der Zelldifferenzierung und Morphologie von *Physcomitrella patens* mittels Bildverarbeitung, DECHEMA/GVC Jahrestagung, Karlsruhe, Germany. *Chemie Ingenieur Technik* 76 (9): 1250.

A. Lucumi, C. Posten, and M.-N. Pons, "Image Analysis Supported Moss Cell Disruption in Photo-Bioreactors," *Plant Biology*, vol. 7, pp. 276-282, 2005.

A. Lucumi and C. Posten, "Moose als Expressionssystem glycosylierter rekombinanter Proteine in einem Pilot-Rohr-Photobioreaktor," presented at GVC Jahrestagung, Wiesbaden, 2005.

A. Lucumi and C. Posten, "Establishment of long-term perfusion cultures of recombinant moss in a pilot tubular photobioreactor," *Process Biochemistry*, vol. 41, pp. 2180-2187, 2006.

A. Lucumi, C. Posten, and M.N. Pons, M.-N. (2006) Evaluation of the morphology and development of recombinant moss in photo-bioreactors by means of image analysis. Second International BiInfo'2006 Workshop, Sofia, Bulgaria.