
Einsatz eines Serviceroboters zur Automatisierung der Probenentnahme und des Probenmanagements während Kultivierungen tierischer Zellen in einer Technikums Umgebung

Von der Technischen Fakultät
der Universität Bielefeld
zur Erlangung des Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
(Dr.-Ing.)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Ing (FH) Iris Poggendorf
aus Hamburg

2004

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Jürgen Lehmann

Zweitgutachter: Prof. Dr.-Ing. Alois Knoll

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.04

Vorwort

Die vorliegende Arbeit basiert auf zwei vom Ministerium für Wirtschaft und Arbeit durch die „Otto von Guericke“ e.V. (AiF) geförderten Projekte (11736 N/1 und 13223 N/1). Industrie-Kooperationspartner der Projekte waren B. Braun Biotech International, Melsungen (Deutschland) und die Innovatis AG, Bielefeld (Deutschland). Die Arbeit wurde von März 1999 bis Februar 2004 am Lehrstuhl Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann angefertigt.

Herrn Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann danke ich für die Möglichkeit der Dissertation, die interessante Themenstellung und die fachliche Betreuung dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich besonders für die Unterstützung während der auf die Promotion vorbereitenden wissenschaftlichen Studien und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, insbesondere im Zellkulturtechnikum des Lehrstuhls.

Herrn Prof. Dr.-Ing. A. Knoll danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. D. Lütkemeyer danke ich für die langjährige Betreuung der Arbeit und die produktive Zusammenarbeit sowie die Initialisierung und Durchführung der AiF-Projekte und der Kooperation mit Bayer HealthCare, Berkeley (USA).

Herrn Dr. H. Büntemeyer danke ich für die Beratungen bei analytischen und informationstechnischen Fragen. Ganz besonderer Dank gilt seiner Mithilfe bei der Lösung von Programmier-Problemen sowie Problemen beim alltäglichen Umgang mit Computern, Druckern und dem Netzwerk.

Ich danke der Innovatis AG, speziell Herrn Dr. F. Gudermann, besonders für die Unterstützung bei der Initialisierung des Projektes sowie Herrn W. Mattis für die Unterstützung während der Programmierung und des Betriebs des CEDEX-Systems.

Ich danke der Firma B. Braun Biotech für die Unterstützung des Projekts. Insbesondere danke ich den Herren Seidler und Strömer für die Unterstützung während der Programmierung des MFCS/win

Ich danke Bayer HealthCare für die finanzielle Unterstützung, insbesondere Herrn Dr. K. Konstantinov und Herrn Dr. R. Heidemann.

Ich danke Herrn Dipl.-Inform. T. Scherer für seine Zusammenarbeit während der Projektlaufzeit in fachlichen, informationstechnischen und sonstigen Fragen.

Weiterhin danke ich Frau Dipl.-Inform. S. Plahl, die mit ihrer Projekt- und Diplomarbeit den Grundstein für dieses Projekt legte und Frau Dr. A. Hawerkamp, die mir die Arbeit mit Zellkulturen nahe brachte. Herrn Dipl.-Inform. A. Korrat danke ich für seine Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit. Außerdem danke ich Herrn L. Fallak und Herrn H. Brinkmann für die schnellen Reparaturen der technischen und sonstigen Ausrüstung.

Ich danke allen weiteren MitarbeiterInnen des Lehrstuhls Zellkulturtechnik und der Zellulären Genetik für das nette Arbeitsklima, die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Weiterhin danke ich Frau Dr. R. Lümen für die Durchsicht dieser Arbeit und moralische Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ganz besonders danke ich zu guter letzt meinen Eltern und auch meiner Großmutter für die Unterstützung in jeglicher Form während der Promotion.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden vorab wie folgt publiziert:

Publikationen

Scherer T., Poggendorf I., Schneider A., Westhoff D., Zhang J., Lütkemeyer D., Lehmann J., Knoll A. (2003): A Service Robot for Automating the Sample Management in Biotechnological Cell Cultivations, ETFA 2003, Vol. 2, p. 383-390, IEEE Catalog Number 03TH8696, ISBN 0-7803-7937-3.

Poggendorf I., Scherer T. (2002): Roboter arbeiten auch am Wochenende gerne - Service-roboter für die biotechnologische Produktion von Zellkulturen. BioTec - Fachmagazin für Biotechnologie, Nr. 9-10, 36-37, Vereinigte Fachverlage GmbH, Mainz

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Scherer S., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2001): Using an Industrial Robot Arm for Monitoring Cultivations of Mammalian Cells in Pilot Scale. In: Computer Applications in Biotechnology 2001: modelling, monitoring and control of biotechnological processes; proceedings volume from the 8th IFAC international conference

Lütkemeyer D., Poggendorf I., Scherer S., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2000): First Steps in Robot Automation of Sampling and Sample Management during Cultivation of Mammalian Cells in Pilot Scale. Biotechnol. Prog. 16, No. 5, 822-828

Vorträge

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Lehmann J. (2000): Praxiserprobung einer Neuentwicklung zur automatischen Zelldichtebestimmung nach der Trypanblau-Methode. Prozessmesstechnik in der Biotechnologie, Bamberg, Deutschland, 8. und 9.5.2000

Kongress-Poster

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Scherer S., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2004): Automatic 24/7 Monitoring of Cell Culture Behaviour in Pilot Scale Cultivations of Mammalian Cells Using an Autonomous Service Robot. Cell Culture Engineering IX, Cancun, Mexiko, 7. bis 12.3.2004

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Scherer T., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2003): Einsatz eines Serviceroboters zur Überwachung von Kultivierungen tierischer Zellen in einer Technikumgebung. 6. Dresdner Sensor-Symposium (6. DSS), Dresden, Deutschland, 8. bis 10.12.2003

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Scherer T., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2002): Let's Start Moving - A Mobile Robot has the Potential of Complete Automation in Monitoring Mammalian Cell Cultures. GVC/Dechema Jahrestagungen, Wiesbaden, Germany, 11. bis 13.6.2002

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Scherer S., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2002): Let's Start Moving - A Mobile Robot has the Potential of Complete Automation in Monitoring Mammalian Cell Cultures. Cell Culture Engineering VIII, Snowmass, USA, 1. bis 6.4.2002

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Scherer T., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2001): Using an Industrial Robot Arm for Monitoring Cultivations of Mammalian Cells in Pilot Scale. 8th International Conference on Computer Applications in Biotechnology, Québec City, Kanada, 24. bis 27.6.2001

Lütkemeyer D., Poggendorf I., Scherer T., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2001): Robot Automation of Sampling and Sample Management during cultivations of Mammalian cells in Pilot Scale. 17th Esact-Meeting, Tylosand, Sweden, 10. bis 14.6.2001

Poggendorf I., Lütkemeyer D., Lehmann J. (2001): Roboterhilfen, oder wie man einem Roboter das Arbeiten ermöglicht. 19. Dechema Jahrestagung der Biotechnologen, Leipzig, Germany, 13. bis 15.3.2001

Lütkemeyer D., Poggendorf, I., Scherer T., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2000): Robot Automation of Sampling and Sample Management in Pilot Scale. 11th International Biotechnology Symposium, Berlin, Germany, 3. bis 8.9.2000

Lütkemeyer D., Poggendorf, I., Scherer T., Zhang J., Knoll A., Lehmann J. (2000): Robot Automation of Sampling and Sample Management in Pilot Scale. Cell Culture Engineering VII, Santa Fe, USA, 5. bis 10.3.2000

Poggendorf I., Plahl S., Lütkemeyer D., Lehmann J. (1999): Vollautomatische, sterilisierbare Probenabfüllung als erster Schritt zur Roboterisierung der Probenentnahme und des Probenmanagements bei Zellkultivierungen im Pilotbioreaktor. 4. Dresdner Sensor Symposium, Dresden, Germany, 6. bis 8.12.1999

Video

The Use of an autonomous Robot for Sampling and Sample Management in a Cell Culture Pilot Plant (2003)

http://www.techfak.uni-bielefeld.de/ags/zellkult/rob2004_med.mpg (137 MB)

http://www.techfak.uni-bielefeld.de/ags/zellkult/rob2004_low.mpg (90 MB)

First Steps in Robot Automation of Sampling & Sample Management During Cultivations of Mammalian Cells in Pilot Scale (2000)

http://www.techfak.uni-bielefeld.de/ags/zellkult/bio_1.mpg (68 MB)

http://www.techfak.uni-bielefeld.de/ags/zellkult/bio_2.mpg (23 MB)

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Aufgabenstellung	1
1.2	Ziel der Arbeit	2
1.2.1	Die manuelle Probenentnahme und Probenbearbeitung	3
1.2.2	Die automatisierte Probenentnahme und Probenbearbeitung	5
1.3	Bestehende Automatisierungslösungen	7
1.3.1	High Throughput Screening und Synthese	8
1.3.2	Probenarchivierung	8
1.3.3	Zellkultur	8
1.3.4	Online Analysen am Bioreaktor	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Bioreaktor und Zelllinien	11
2.1.1	Bioreaktor	11
2.1.2	Zelllinien	12
2.1.3	Medium	12
2.2	Analytik	13
2.2.1	Glukose und Laktat	13
2.2.2	Ammonium	13
2.2.3	Laktatdehydrogenase-Aktivität	13
2.2.4	Aminosäurekonzentrationen	13
2.3	Datenbank INFOBASE	14
2.4	Laborsteuerungsprogramm	15
2.5	Autonomer mobiler Roboter	17

2.5.1	Aufgaben	17
2.5.2	Programmierung	17
2.6	Probenentnahmestation	20
2.6.1	Allgemeiner technischer Aufbau	20
2.6.2	Hardware	22
	ELVAMAT	22
	Linear-Roboter	23
	Linear-Schlitten	23
2.6.3	Programmierung	23
	ELVAMAT	26
	Linear-Roboter	27
	Linear-Schlitten	27
2.7	Pipettierstation	28
2.7.1	Technischer Aufbau	28
2.7.2	Programmierung	31
2.8	Automatisches Zellzählgerät CEDEX	34
2.8.1	Programmierung	36
2.8.2	Probenkarussell AS20	37
2.9	Weitere Roboterhilfen	39
2.9.1	Barcodescanner	39
	Hardware	39
	Programmierung	40
	Codierung	41
2.9.2	Zentrifuge	41
	Hardware	41
	Programmierung	42
2.9.3	Prozessleitsystem (MFCS)	42
	Programmierung	43
3	Autonomer mobiler Roboter	47
3.1	Ansteuerung	48
3.2	Navigation	49

3.3	Bildverarbeitung	50
3.4	Objektmanipulation	51
3.5	Laboreinsatz	51
4	Roboterhilfen	53
4.1	Probenentnahmestation	54
4.1.1	Bestehende automatisierte Lösungen	54
4.1.2	Validierung der Probenentnahmestationen	55
	ELVAMAT	55
	Linear-Roboter	61
	Linear-Schlitten	66
4.1.3	Zusammenfassung	67
4.2	Pipettierstation	68
4.2.1	Aufgaben	68
4.2.2	Allgemeine Beobachtungen	68
4.2.3	Entnahme eines Aliquots	69
4.2.4	Desintegrieren von Aggregaten	77
4.2.5	Reinigen und Spülen	80
4.2.6	Zusammenfassung	80
4.3	Automatisches Zellzählsystem CEDEX	81
4.3.1	Zusammenfassung	83
4.4	Weitere Roboterhilfen	84
4.4.1	Barcodescanner	84
4.4.2	Zentrifuge	84
4.4.3	Prozessleitsystem (MFCS)	84
4.4.4	Zusammenfassung	85
5	Roboterisierte Kultivierungen	87
5.1	Kultivierung einer Hybridomzelllinie	87
5.2	Erste Kultivierung einer rCHO-Zelllinie	93
5.3	Zweite Kultivierung einer rCHO-Zelllinie	98
5.4	Zusammenfassung	103

6 Zusammenfassung und Ausblick	105
A Definitionen und Begriffe	107
B Abkürzungen	113
Literatur	116
Abbildungsverzeichnis	119
Tabellenverzeichnis	121

Abstract

The main intention of this work is the continuous and automatical monitoring of the growth of a cell culture (cell density, viability) in addition to using common online parameters (e.g. pH, pO_2) as indicators for the culture condition. The combination of these two components results in a much more complete picture of the cell culture. To achieve this goal the sampling and the subsequent sample management of mammalian cell cultures in pilot scale was automated by using an autonomous service robot.

Automation of the sampling procedure requires additional devices that perform operations, such as sampling the bioreactor, pipetting the sample, counting the cells with an automated cell counter and more. As one of the main components a reactor-connected sampling device which allows repeated sterile sampling into a vial was developed. At a given time the sampling is started automatically. The culture broth flow is divided into flushing and sampling. After the sampling the system is purged and steam sterilized and ready for the next cycle.

Linking of the different operations is performed with an autonomous service robot. The robot consists of an industrial robot arm which is mounted on a mobile platform. To enable the service robot to perform the given tasks it is equipped with several sensors. Laser scanners are used for navigation in the laboratory, whereas a color camera in combination with a force/torque sensor are used to perform operations related to handling the sample vial.

The device control system coordinates the sampling sequence and interaction between the devices and the robot. Additionally collected data and conditional parameters are stored and handed over to the process control system where the results are presented together with the online data.

Kapitel 1

Einführung

In einer im Februar 2003 veröffentlichten Studie des Marktforschungsinstituts Datamonitor wird dem Weltmarkt Biotechnologie ein Wachstum von 77,2 Milliarden Dollar im Jahre 2002 auf 125,7 Milliarden Dollar 2007 vorausgesagt [ISB, 2004]. In den Vereinigten Staaten erhielten im Jahre 2003 25 neue Medikamente aus biotechnologischer Forschung die Marktzulassung. Das ist ein Viertel mehr als im Jahr davor. Sieben US-Firmen gingen erfolgreich an die Börse, vierzehn weitere beantragten die Börsenzulassung [Datamonitor, 2003].

Datamonitor geht weiterhin davon aus, dass therapeutische Proteine das Hauptgeschäft mit Umsätzen von 19 Milliarden Dollar in 2007 bleiben. Antikörper folgen an zweiter Stelle mit geschätzten Umsätzen von 7,6 Milliarden Dollar. Um die Nachfrage nach diesen Produkten zu decken, müssen neue Produktionsanlagen gebaut oder alte erweitert werden.

Noch vor wenigen Jahren dominierte die Philosophie vom Einsatz von Universalmaschinen, die einen möglichst großen Teil der anfallenden Aufgaben selbst erledigen. Zur Zeit geht der Trend von dieser „Black-Box“ wieder weg, zu einer flexibleren Automation mit verteilten Systemen. Für eine Verknüpfung dieser verteilten Systeme bietet sich die Verwendung des in dieser Arbeit eingesetzten autonomen Roboters an.

1.1 Aufgabenstellung

Die Automatisierung von Produktions- und Prozessabläufen ist ein wichtiger Bestandteil der heutigen Technologieentwicklung. Die Mitarbeiter sollen dabei von routinemäßig durchzuführenden Aufgaben entlastet werden. Die gewonnene Arbeitszeit kann für höher qualifizierte Aufgaben genutzt werden.

Die hier dargestellte Arbeit ist Teil eines Projekts zur Automatisierung der Probenentnahme und des Probenmanagements während Kultivierungen tierischer Zellen in einer Technikumsumgebung. Für die Automatisierung der notwendigen Handlungsabläufe wird ein Industrie-Roboterarm, der sich auf einer mobilen, autonomen Plattform befindet

eingesetzt. Der autonome Roboter führt die Aufgaben unter Zuhilfenahme so genannter Roboterhilfen aus. Diese Roboterhilfen, ihre Ansteuerung, die Kommunikation und Koordination, sowie die zur Validierung des Gesamtsystems durchgeführten Kultivierungen tierischer Zellen sind der Kernpunkt dieser Arbeit.

1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel des Lehrstuhls Zellkulturtechnik an der Universität Bielefeld ist die Prozessentwicklung auf dem Gebiet der Produktion von biologisch aktiven Komponenten und die Erforschung der optimalen Kultivierungsbedingungen von tierischen Zellkulturen im Allgemeinen. Zu diesem Arbeitsbereich gehören auch die Analyse des Prozessverlaufs, der Kultivierungsbedingungen und des Zustands der Zellkultur sowie die Aufarbeitung der gebildeten Produkte. In der überwiegenden Zahl von Fällen sind diese Produkte sekretierte Proteine. In neuerer Zeit spielen vermehrt auch Stammzellen eine Rolle, welche dann selbst das Produkt sind.

Der Prozess der Produktherstellung lässt sich in die Phasen Kultivierung und Aufreinigung teilen. Während der Kultivierungsphase werden die Zellen vermehrt, das Produkt akkumuliert dabei im Bioreaktor. Das Produkt kann entweder in der Wachstumsphase der Zellen gebildet werden, nach Erreichen der stationären Phase oder nach einer Stimulation durch einen Inducer. Danach wird im Aufreinigungsprozess das Produkt ankonzentriert und von ungewünschten Medienkomponenten beziehungsweise Nebenprodukten getrennt. Das Forschungsinteresse setzt bei der Entwicklung neuer Prozesse und der Optimierung bereits bestehender Prozesse an.

Kultivierungen tierischer Zellen stellen im Allgemeinen größere Anforderungen an die Einhaltung der optimalen Kulturbedingungen als Kultivierungen von Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Pilze). Zellkulturen sind empfindlicher und stellen größtenteils höhere Ansprüche an die Versorgung mit Nährstoffen und Einhaltung der Kultivierungsparameter. Für viele physikalische Parameter gibt es langzeitstabile Messsonden (Temperatur, pH, pO_2 u.a.), die eine kontinuierliche Überprüfung und darauf folgende Regelung erlauben.

Für den wichtigsten Parameter einer Kultivierung, den Zustand des biologischen Systems, gibt es allerdings noch keine Messsonde. Selbst die bei Mikroorganismen standardmäßig angewandte Trübungsmessung ist nur ein Indiz für das Wachstum der Kultur, da hier keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Organismen getroffen werden kann. Es ist zum Beispiel möglich, dass sich die Organismen vermehren, sich aber auf Grund falscher Kultivierungsbedingungen eine schlechte Viabilität einstellt. Ein solcher Zustand der Kultur kann durch eine Trübungsmessung nicht erkannt werden. Eine niedrige Viabilität kann einen schädigenden Einfluss auf das Produkt beziehungsweise die Produktqualität haben, denn verschiedene Zelllinien besitzen unterschiedliche Eigenschaften in ihrer Produktbildung. Zum Beispiel ist für eine Produktion von Antikörpern, die in den Überstand sezerniert werden, die Viabilität einer Kultur nicht das wichtigste Kri-

terium, sondern das Erreichen einer hohen Zelldichte. Zum Ende der Kultivierung werden durch die Lyse der Zellen noch nicht ausgeschleuste Antikörper freigesetzt und erhöhen die Produktkonzentration deutlich. Auch für membranständige Antikörper, Rezeptoren oder Proteine ist die erreichte Zelldichte das Hauptkriterium. Im Unterschied dazu ist es bei der Produktion von Glykoproteinen so, dass das biologisch aktive Glykosilierungsmuster nur erreicht wird, solange die Zellen bei einer sehr hohen Viabilität kultiviert werden. Proteine die noch nicht aktiv von der Zelle sezerniert wurden, sondern durch die Lyse der Zelle freigesetzt wurden, besitzen ein noch nicht vollständig prozessiertes Glykosilierungsmuster. Durch dieses Phänomen kann sich eine reduzierte Aktivität des Produkts ergeben, deshalb wird die Kultivierung beendet, wenn eine vorher bestimmte maximale Zelldichte erreicht wurde und die Viabilität noch nicht zu sinken begonnen hat. In Anschluss wird mit der Produktaufarbeitung begonnen.

Im Gegensatz zu mikrobiellen Kultivierungen, von denen viele unter optimalen Bedingungen Verdopplungszeiten von 30 bis 60 Minuten haben, besitzen tierische Zellkulturen eine längere Verdopplungszeit von etwa einem Tag oder sogar mehr. Für eine gute und vollständige Beurteilung der Kultur ist die Ermittlung des Anteils der lebenden Zellen wichtig. Daher wird in der Zellkultur standardmäßig eine Vitalitätsfärbung nach der Trypanblau-Methode [Tennant, 1964] durchgeführt. Diese Vitalitätsfärbung erfordert es, dem Reaktor eine Probe zu entnehmen. Während einer normalen Prozessüberwachung kommt es nicht darauf an, dass die dem Reaktor entnommene Probe steril ist. Von höchster Bedeutung ist es allerdings, dass der Reaktor kontaminationsfrei bleibt. Diese Probenentnahme und Analyse der entnommenen Probe findet in regelmäßigen Abständen manuell statt und erfordert die Anwesenheit eines geschulten, qualifizierten Mitarbeiters. Für eine weiterführende Prozessüberwachung im Rahmen einer GMP-Produktion ist dem Reaktor zusätzlich einmal pro Tag eine Probe derart zu entnehmen, dass auch die entnommene Probe steril bleibt.

1.2.1 Die manuelle Probenentnahme und Probenbearbeitung

Die Entnahme einer Probe aus dem Bioreaktor erfolgt normalerweise über ein Ventil, an das ein Auslaufstutzen montiert ist. Der Stutzen befindet sich innerhalb einer Steck- oder Schraubhülse, in deren Innern er sterilisiert werden kann. Die Sterilisation erfolgt üblicherweise mit Heißdampf. Zur Probenentnahme wird die Hülse entfernt, das Ventil geöffnet und die Probe im Probenentnahmegefäß aufgefangen. Nach der Probenentnahme wird die Sterilisationshülse wieder aufgesetzt, sterilisiert und verbleibt auf dem Stutzen bis zur nächsten Entnahme.

Die im Folgenden beschriebene Probenbearbeitung entspricht größtenteils dem in Abbildung 1.1 auf Seite 4 dargestellten automatischen Ablauf. Zunächst wird der pH-Wert der frisch entnommenen Probe gemessen. Dies dient dazu eine mögliche Drift der in den Bioreaktor eingebauten Elektrode zu erkennen und eine Rekalibrierung zu ermöglichen. Der nächste Schritt besteht in der Ermittlung der Zelldichte und Vitalität der Probe. Da-

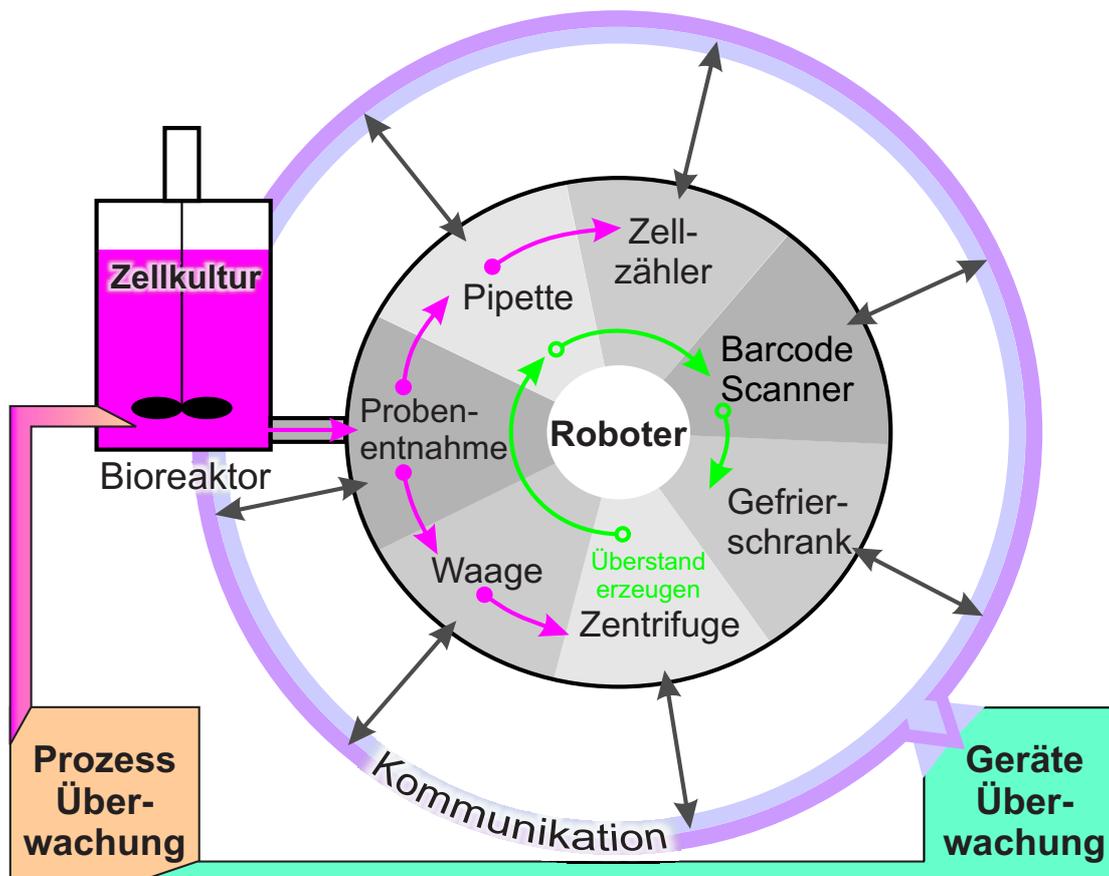


Abbildung 1.1: Übersichtsdiagramm Probenentnahmeablauf. In der Abbildung ist das Zusammenspiel der verschiedenen Geräte dargestellt. Die äußeren, ausgefüllten, roten Pfeile symbolisieren die Stationen, an denen die zellhaltige Probe bearbeitet wird, während die inneren, ungefüllten, grünen Pfeile die zellfreie Probe darstellen. Der äußere Ring zeigt die Kommunikationswege zwischen den Geräten und dem Geräte- und Prozesskontrollsystem.

zu kann entweder eine manuelle Vitalitätsfärbung durchgeführt oder ein automatisches Zellzählverfahren (CEDEX, Innovatis, Bielefeld oder CASY, Schärfe, Reutlingen) angewendet werden.

Vom Rest der Probe werden die Zellen durch Zentrifugation oder Filtration abgetrennt. Ein Teil des entstehenden zellfreien Überstandes wird dekantiert, in ein beschriftetes Archivierungsröhrchen überführt und für spätere Analysen im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Mit dem Rest des Überstandes können weitere relevante Prozessgrößen sofort bestimmt werden. Solche Prozessgrößen sind zum Beispiel Konzentrationen von Nährstoffen wie Glukose oder von inhibierenden beziehungsweise toxischen Substanzen wie Laktat oder Ammonium. Häufig wird als weiterer Parameter die Aktivität des intrazellulären Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand bestimmt. Wird LDH im Überstand nachgewiesen, dann kann der Wert als ein Maß für die Zellschädigung verwendet werden.

Die aus den vorherigen Schritten ermittelten Daten werden notiert und für eine übersichtliche Darstellung in grafischer Form abgebildet. Heutzutage wird das normalerweise durch ein Programm zur Speicherung und Visualisierung der Prozessdaten, dem Prozessleitsystem, durchgeführt. Um alle diese Schritte korrekt durchzuführen und die präzise Reproduzierbarkeit des Prozesses zu gewährleisten, ist der Einsatz eines geschulten Mitarbeiters notwendig. Weiterhin erfolgt die Überwachung der Kultivierung kontinuierlich, das heißt täglich, sowohl an Wochenenden wie auch Feiertagen.

1.2.2 Die automatisierte Probenentnahme und Probenbearbeitung

Während eines Produktionsprozesses müssen zur Herstellung des entsprechenden Proteins mit den für die biologische Aktivität notwendigen Eigenschaften (Aktivität, Glykosilierung, u.a.) die Produktionsbedingungen während einer Kultivierung exakt eingehalten werden. Nur auf diese Art kann die Reproduzierbarkeit der Produkteigenschaften für aufeinander folgende Kultivierungen eingehalten werden. Die Grundlage für diese Reproduzierbarkeit sind zum einen die Messgenauigkeit der Elektroden und Sonden, mit denen die aktuellen Prozesswerte ermittelt werden. Zum anderen die Analysen, welche mit dem Reaktor entnommenen Proben, durchgeführt werden. Um die Genauigkeit von manuellen Messungen und Tätigkeiten zu erhöhen und Fehler auszuschließen, werden zum Beispiel Protokolle über die durchgeführten Tätigkeiten und Analysen geführt. Dieses führt zu einem hohen administrativen Aufwand und zusätzlichem Einsatz von Personal. Die Komplett- oder Teilautomatisierung von Prozessen ermöglicht die Reduzierung dieser administrativen Mittel durch die automatische Erstellung von Protokollen. Weiterhin werden notwendige Überwachungsarbeiten verringert. Durch Automatisierung können zusätzlich individuelle Schwankungen der Analyseergebnisse auf Grund leicht unterschiedlicher Ausführung der manuellen Aufgaben durch das Laborpersonal reduziert werden. Insgesamt liefern diese Maßnahmen einen reproduzierbareren Prozessverlauf.

Der in diesem Projekt beschrittene Weg beruht auf einer Nachahmung der bei einer manuellen Probenentnahme vom Menschen durchgeführten Tätigkeiten. Der Ablauf einer solchen Probenentnahme ist in Abbildung 1.1 auf Seite 4 schematisch dargestellt. Die notwendigen Tätigkeiten werden durch einen mobilen Serviceroboter ausgeführt. Er besteht aus einer autonomen Plattform, auf die ein Roboterarm montiert ist (siehe Kapitel 2.5, Seite 17). Dieser Ansatz wurde verfolgt, um ein System zu schaffen, das in ein bestehendes Labor integriert werden kann, so dass bereits im Labor befindliche Ressourcen genutzt werden können. Es kann zum Beispiel die Anschaffung bestimmter bereits vorhandener Geräte entfallen. Andererseits erleichtert die Nähe zum manuellen Ablauf die Akzeptanz und Überschaubarkeit des Systems durch den Anwender.

Natürlich ist es nicht möglich allein mit den im Labor befindlichen Ressourcen die Abarbeitung der Aufgaben durch den Roboter zu ermöglichen. Es mussten einige Geräte zusätzlich bereitgestellt beziehungsweise konstruiert werden. Andere Geräte wurden für

den Robotereinsatz modifiziert. Es kommen die im Folgenden aufgelisteten **Roboterhilfen** zum Einsatz:

- Probenentnahmestation
- Pipettierstation
- Automatisches Zellzählgerät
- Zentrifuge
- Gefrierschrank
- Waage
- Barcodescanner
- Prozessleitsystem

Dem Roboterarm ist es mit seinem Greifer nicht möglich die Sterilisationshülse vom Probenentnahmestutzen zu entfernen und den Ventilmechanismus zu bedienen, während er gleichzeitig ein Probengefäß unter den Auslaufstutzen hält. Dies machte eine Teilautomatisierung der Probenentnahme notwendig. Es wurde eine dampfsterilisierbare **Probenentnahmestation** entwickelt, die eine sterile, vollautomatische, extern computergesteuerte Probenentnahme erlaubt.

Der Roboter muss der Kulturflüssigkeit und dem Überstand Aliquots entnehmen, dazu ist eine **Pipettierstation** notwendig. Diese Pipettierstation erlaubt eine mikrolitergenaue Entnahme von Aliquots aus der Probe, sowie gegebenenfalls eine Auflösung von Zellaggregaten, die sich in der Probe befinden.

Eines der entnommenen Aliquots wird einem automatischen **Zellzählgerät** für die Bestimmung der Zelldichte und der Viabilität zugeführt. Ein weiteres Aliquot wird nach der Zellabtrennung in der **Zentrifuge** im **Gefrierschrank** archiviert. Ein spezieller Gefrierschrank ist im Prinzip nicht notwendig, allerdings muss dieses Gerät vom Roboter bedienbar sein. Dies bedeutet, die Tür muss mit einer definierten Kraft zu öffnen sein und es muss genügend Platz im Innern sein, damit das Archivierungsröhrchen vom Roboter abgelegt werden kann.

Vor der Zentrifugation besteht die Möglichkeit das Gewicht des Probenentnahmeröhrchens mit einer **Waage** zu überprüfen. Dadurch kann zum einen ein Fehler während der Probenentnahme detektiert werden, zum anderen kann gegebenenfalls das Gegengewicht für den Rotor der Zentrifuge ausgetauscht werden.

Der **Barcodescanner** ermöglicht es dem System die Probe beziehungsweise den archivierten Überstand eindeutig zu identifizieren und später dem jeweiligen Probenentnahmezeitpunkt zuzuordnen.

Als ständiger Vorgang beziehungsweise letzter Schritt müssen sämtliche Aktionen der Roboterhilfen und des Roboters überwacht und gegebenenfalls Fehler detektiert werden. Letztendlich werden die gesammelten Daten und Analysenergebnisse an einem Ort zusammengeführt und im **Prozessleitsystem** gespeichert. Die so erzeugten Daten müssen vor unbefugten Zugriffen und Manipulationen geschützt werden, aber der Zugriff auf die ermittelten Werte muss dem Anwender jeder Zeit ermöglicht werden.

Der in Abbildung 1.1 auf Seite 4 gezeigte generelle Überblick über die Zusammenhänge zwischen den Geräten und Steuerungssystemen wurde bereits erläutert. Als zentrale Komponente befindet sich der Roboter in der Mitte der Abbildung. Kreisförmig um den Roboter herum sind die einzelnen Roboterhilfen angeordnet. Der äußere Ring in der Abbildung zeigt die Kommunikation der Geräte mit dem Steuerungscomputer des Systems, dem Device Control System (DCS), die Pfeile vom äußeren Ring zu den Roboterhilfen symbolisieren die Kommunikation der Geräte. Dadurch, dass verschiedene Geräte mit unterschiedlichen Schnittstellen erhältlich sind gibt es eine Reihe von verschiedenen Kommunikationsarten, die im folgenden aufgelistet sind.

- Netzwerk
- serielle Schnittstelle
- parallele Schnittstelle
- TTL-Signale

Im Laufe der Arbeit wurden einige der unterschiedlichen Kommunikationsarten durch Schnittstellenwandler vereinheitlicht. Prinzipiell ist es möglich das System so zu betreiben, dass Netzwerkkommunikation per TCP/IP (transmission control protocol/internet protocol) die einzige Kommunikationsart ist. Die beiden inneren, konzentrischen Pfeilgruppen symbolisieren den Bearbeitungsablauf der Reaktorprobe. Die äußeren roten Pfeile stellen die zellhaltige Probe dar, die inneren grünen Pfeile die zellfreie Probe.

1.3 Bestehende Automatisierungslösungen

Ein im Februar 2003 in der Zeitschrift Nature veröffentlichter Artikel [Chapman, 2003] enthält folgende Aussage.

„Cell culture, either for the cells themselves or their products, is traditionally a manual process that demands hours of repetitive, painstaking work to ensure absolute sterility under exacting conditions. [...] Robotic systems can also provide a consistency of procedure and sterility that the best technicians cannot match, ensuring less variability between batches.“

Im Weiteren soll gezeigt werden welche automatisierte Lösungen im Bereich der Biotechnologie bereits bestehen und an welchen Stellen zur Zeit auf manuelle Tätigkeiten noch nicht verzichtet werden kann.

1.3.1 High Throughput Screening und Synthese

In vielen biotechnologischen und auch allgemeinen Laboratorien gibt es bereits viele automatisierte Abläufe und Geräte. Die zur Zeit wohl am schnellsten fortschreitende Branche ist das Synthetisieren und Testen von potentiellen pharmazeutischen Substanzen. Wo noch vor wenigen Jahren ein Wissenschaftler allein für die Synthese einer ausreichender Menge einer Substanz für einen Wirksamkeitstest eine Woche benötigte, können mit derselben Arbeitskraft nun 100 Substanzen erzeugt werden [Chapman, 2003].

DNA-Sequenzierung ist ein großer Bereich auf dem High Throughput Analysen durchgeführt werden, genauso wie die Bearbeitung von Mikrotiterplatten, zum Beispiel bei der Wirkstoffsuche. So kann zum Beispiel der PLATE::VISION Detektor von Carl Zeiss (Jena, Deutschland) eine Mikrotiterplatte mit 1536 Wells in unter 30 Sekunden spektrometrisch analysieren. Als Bestandteil des PLATE::EXPLORER liegt die Analyserate des Systems im Ultra High Throughput Bereich. Bei diesen Geräten ist der limitierende Faktor oftmals die Anbindung an den vorhergehenden oder nachfolgenden Schritt.

1.3.2 Probenarchivierung

Die Langzeit-Aufbewahrung und Archivierung von Proben ist ein weiterer Aspekt. Die Proben müssen sicher und verwechslungsfrei aufbewahrt werden und zu jeder Zeit einfach und schnell zugänglich sein. Auch hier gibt es bereits Ansätze zur Komplett-Automatisierung, das INDIVIDUAL VIAL RETRIEVAL (IVR) System von Biophile (Charlottesville, VA, USA) ist ein solches Gerät. Es können insgesamt 22.572 1,8 ml Cryogefäße bei -80°C verwahrt werden. Bis zu 500 Gefäße können gleichzeitig be- oder entladen werden und pro Stunde können 200 Gefäße abgearbeitet werden [Biophile Inc., 2003]. Ein ähnliches System mit einem Temperaturbereich von -20 bis 38°C wird von The Automation Partnership (TAP, Royston, GB) innerhalb des Systems HAYSTACK als SAMPLE STORAGE AND RETRIEVAL Modul angeboten. Das HAYSTACK System kann um mehrere weitere Module wie PROCESS CONTROL AND TRACKING, DRY POWDER DISPENSING, LIQUID HANDLING, SUPPORTING PROCESSES und SAMPLE ORDERING AND INVENTORY MANAGEMENT erweitert werden.

1.3.3 Zellkultur

Zwei für die Zellkultur sehr interessante komplett automatisierte Systeme sind das SELECT von TAP und ACCELLERATOR von RTS Life Sciences (Manchester, GB). Beide Geräte haben ähnliche Eigenschaften, daher wird im Folgenden nur das SELECT beschrieben. Das

SELECT führt vollautomatisch Satzkulturen in bis zu 182 Zellkulturflaschen der Größe 175 cm^2 und 300 Mikrotiterplatten durch, dabei kann entweder in allen Kulturflaschen dieselbe oder jeweils eine unterschiedliche Zelllinie kultiviert werden. Weiterhin kann jede Flasche nach unterschiedlichen Prozessparametern behandelt werden [TAP, 2003]. Es können zum Beispiel Aussaat, Expansion, Subkultur und Ernte durchgeführt werden, so dass nach einer automatischen Anzucht individuelle Tests mit den Kulturen durchgeführt werden können.

Das Einsatzgebiet dieser Systeme sind hauptsächlich Reihentests von Zellkulturen. Der Hersteller wirbt aber auch damit, dass das SELECT als Ersatz für Bioreaktoren dienen kann, um größere Zellmengen zu erhalten:

„The Cellmate system fully automates all the processes needed to culture cells in roller bottles and T-flasks, taking cell culture processing from the lab bench to high volume production without process change.“ [TAP, 2003]

Mit 182 Kulturflaschen der Größe 175 cm^2 kann für adhärent wachsende Kulturen eine absolute Mengen von bis zu $5 \cdot 10^9$ Zellen erreicht werden. Die Annahme beruht dabei darauf, dass die Kulturflasche mit $2 \cdot 10^5 \text{ Zellen} \cdot \text{cm}^{-2}$ geerntet wird. Das entspricht einer Microcarrier-Kultur von einem Liter Kulturvolumen. Für Suspensionskulturen lassen sich die folgenden Werte errechnen. Mit einem Kulturvolumen von 50 ml pro Kulturflasche ergibt sich ein Gesamtvolumen von über neun Litern, in dem sich Zelldichten von $1 \cdot 10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{ml}^{-1}$ erreichen lassen. Der Einsatz eines solchen Systems hat für den Produktionsmaßstab eine Grenze der Praktikabilität. Für größere Volumina muss ein Bioreaktor verwendet werden, denn für automatische Pilot- oder Produktionskultivierungen ist das System nicht gedacht. Weiterhin ist die Steuerung des Roboterarms nicht sensorbasiert. Die T-Flaschen und Mikrotiterplatten befinden sich auf ihrem festen Platz, von dem sie in einer ge-teachten, „blinden“ Bewegung gegriffen werden.

1.3.4 Online Analysen am Bioreaktor

Eine Möglichkeit der Überwachung des Bioreaktors ist der Einsatz von direkt an den Reaktor gekoppelten Analysengeräten, die die Ermittlung einer großen Anzahl von Parametern erlauben. Das MULTIBIOSENSOREN-ANALYSESYSTEM für Zellmedium mit ONLINE-PROBENAHPME-MODUL FÜR FERMENTER (IUL Instruments, Königswinter, Deutschland) ist eins von diesen Geräten. Es können bis zu vier Reaktoren gleichzeitig angeschlossen werden. Der Anschluss erfolgt steril und die Proben werden unbehandelt, direkt aus dem Reaktor mit einer vom Anwender programmierte Probenfrequenz analysiert. Die Mindestzeit zwischen zwei Proben beträgt sechs Minuten. Das System wird von einem PC gesteuert und besitzt eine Datenauswertung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit eine Feedback-Kontrolle durchzuführen. Dazu können bis zu acht Feedback-Kontrollsysteme, die frisches Medium abgeben, angesteuert werden. Beim Einsatz von direkt an den Reaktor gekoppelten Geräten

gibt es allerdings ein großes Problem: die Sterilität des angeschlossenen Reaktors. Speziell bei langwierigen Kultivierungen wie Fed-Batch oder Perfusion ist das Risiko einer Kontamination gegeben. Dieses Sterilrisiko mit den durch den Verlust einer Kultur in einem Produktionsreaktor des Maßstabs über 1000 Liter entstehenden Folgekosten wiegen den Vorteil einer online Analyse aller wichtigen Produktionsparameter bei weitem nicht auf. Selbst namhafte pharmazeutische Betriebe, die sich im Umgang mit der Steriltechnik verstehen, verzichten auf den Einsatz direkt an den Reaktor gekoppelter Geräte.

Eine sehr gute Alternative zur manuellen Zellzählung wäre der Einsatz von sogenannten in-situ Mikroskopen, die eine Betrachtung der Zellkultur direkt im Reaktor erlauben. Es wurden unter anderem durch Joeris et al. [Joeris et al., 2002] einige vielversprechende Experimente gemacht. Das Prinzip der Messung beruht, ähnlich wie bei den externen Zellzählgeräten CEDEX und VI-CELL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), auf der Aufnahme von Bildern der Zellkultur, die mit Hilfe von Bildverarbeitung ausgewertet werden. Allerdings ist es mit dieser Methode bisher nicht möglich die Vitalität der Kultur zu bestimmen, da keine Färbereagenzien in den Reaktor eingebracht werden können, die eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ermöglichen. Für eine Möglichkeit die Zellen alleine durch das mikroskopische Bild zu unterscheiden gibt es bisher nur wenige Hinweise und keine kommerzielle Umsetzung.

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der Zellzahl und Viabilität sind Systeme, die auf dem Prinzip der Pulsflächenanalyse beruhen. Bei dieser Methode wirkt die Zelle im elektrischen Feld wie ein Dielektrikum, so dass ein Messsignal erzeugt wird. Tote Zellen haben eine durchlässige Membran, so dass nur der Zellkern detektiert wird und eine Unterscheidung zu lebenden Zellen möglich ist. Neben den off-line Geräten, wie dem CASY (Schärfe Systems, Reutlingen, Deutschland) gibt es Sonden wie den VIABLE-CELL-MONITOR 520 (IUL Instruments), die direkt in den Reaktor eingebracht werden können. Das dem System zugrundeliegende Prinzip versagt aber in den Fällen, in denen die Zellmembran für eine korrekte Pulsflächenanalyse noch nicht durchlässig genug ist, ein Färbereagenz die Membran aber schon durchdringen würde. Kommt es bei einer Hybridomzelllinie zum Beispiel zu einer Limitierung durch Glutamin, Glukose oder Cystein, gehen die Zellen in einen apoptotischen Zustand über, dabei bleibt die Zellmembran intakt. Diese Zellen werden somit durch die Pulsflächenanalyse nicht als tot erkannt [Heidemann, 1995, Seite 52-53].

Kapitel 2

Material und Methoden

Zum Erreichen des gesetzten Ziels, der Durchführung einer komplett automatisierten Probenentnahme und Probenmanagements, steht der die Aufgaben ausführende autonome Roboter im Zentrum der Abläufe. Er soll die Handlungsabläufe einer manuellen Probenentnahme imitieren, ist mit seiner technischen Ausstattung aber nicht direkt in der Lage die üblicherweise verwendeten Geräte zu bedienen. Zum Beispiel könnten Handpipetten nur mit einem Spezialgreifer benutzt werden. Für die Entnahme einer Probe aus dem Reaktor wären gegebenenfalls sogar zwei Arme notwendig. Nur ein unverhältnismäßig hoher Aufwand in der Roboterausstattung würde es erlauben diese Arbeiten durchzuführen. Um daher die Arbeit des Roboters überhaupt zu ermöglichen beziehungsweise bestimmte Schritte zu erleichtern, mussten sogenannte Roboterhilfen eingesetzt werden. Sie ermöglichen dem Roboter durch relativ einfache Bewegungsabläufe die gleichen Arbeiten zu erledigen wie ein Mensch. Die häufigsten Bewegungsabläufe für die Durchführung einer Tätigkeit sind dabei abstellen, hochheben oder halten eines Probengefäßes. Die Konstruktion der Roboterhilfen war also darauf ausgelegt mit genau diesen Bewegungen die notwendigen Aufgaben durchführbar zu machen. Kapitel 1.2.1, ab Seite 3, enthält eine genauere Beschreibung der manuellen Durchführung einer Probenentnahme und Probenbearbeitung. Die Durchführung der Aufgaben der Roboterhilfen wird vom Laborsteuerungsprogramm koordiniert.

2.1 Bioreaktor und Zelllinien

2.1.1 Bioreaktor

Zur Durchführung wurde ein 20 l Bioreaktor der Firma Diessel verwendet. Die Regelung der Parameter erfolgte über eine in der Arbeitsgruppe entwickelte Software. Eine ausführliche Beschreibung des eingesetzten Materials befindet sich in der Dissertation von Dirk Lütkemeyer [Lütkemeyer, 1993].

2.1.2 Zelllinien

Die Validierungen der einzelnen Roboterhilfen erfolgten mit rCHO-Zelllinien und dem Flagellaten *Euglena gracilis*.

Die roboterisierten Kultivierungen wurden mit Hybridom- und rCHO-Zelllinien durchgeführt.

2.1.3 Medium

Die Kultivierung der Hybridom-Zelllinie erfolgte in Standard DMEM/F12 Medium (1:1), das mit Aminosäuren supplementiert wurde, weitere Supplemente waren Insulin, Transferrin/Selenit und humanes Serumalbumin (HSA). Eine ausführliche Beschreibung dieses Mediums befindet sich in der Dissertation von Dirk Lütkemeyer [Lütkemeyer, 1993].

Die Kultivierung der rCHO-Zelllinie erfolgte in proteinfreiem Standard DMEM/F12 Medium (1:1), das mit Aminosäuren supplementiert wurde. Es wurden des Weiteren folgende Supplemente zugegeben: L-Ascorbinsäure, Eisensulfat, Ethanolamin, Putrescin, Aurintricarboxylsäure und Pluronic F68. Eine ausführliche Beschreibung dieses Mediums befindet sich in der Diplomarbeit von Christian Hakemeyer [Hakemeyer, 2003]

2.2 Analytik

2.2.1 Glukose und Laktat

Zur Bestimmung von Glukose- und Laktat wurde das automatische Analysengerät YSI 2700 (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio, USA) eingesetzt. In der Dissertation von Rüdiger Heidemann [Heidemann, 1995] befindet sich eine ausführliche Beschreibung dieses Gerätes.

2.2.2 Ammonium

Die Ammoniumbestimmung (NH_4^+) erfolgt durch Messung der maximalen Fluoreszenz während der Derivatisierung von o-Phthalaldehyd mit NH_4^+ unter Anwesenheit von Thio-glycolsäure. Die Messung erfolgte mit dem RF-551 von Shimadzu (Duisburg, Deutschland). Eine ausführliche Beschreibung der Reaktion befindet sich in der Dissertation von Lars Stiens [Stiens, 2001].

2.2.3 Laktatdehydrogenase-Aktivität

Die Laktatdehydrogenasebestimmung (LDH) erfolgt durch Messung der Absorptionskinetik der enzymatischen Umsetzung von NADH^+ zu NADH durch LDH bei 340 nm. Zur Messung diente das UVIKON 933 Spektrometer von Kontron Instruments (Biotek-Kontron-Instruments, Neufahrn, Deutschland). Eine ausführliche Beschreibung der Reaktion befindet sich in der Dissertation von Hermann Tebbe [Tebbe, 1997].

2.2.4 Aminosäurekonzentrationen

Die Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren erfolgt durch Reversed Phase Chromatographie mit Vorsäulenderivatisierung nach der OPA-Methode. In der Dissertation von Rüdiger Heidemann [Heidemann, 1995] befindet sich eine ausführliche Beschreibung dieser Methode.

2.3 Datenbank Infobase

Für die Übertragung von Daten zwischen Programm-Modulen oder verschiedenen Programmen gibt es mehrere Möglichkeiten. Die Daten können zum Beispiel innerhalb eines Programms in Variablen gespeichert werden. Dabei können diese Variablen entweder allgemein, direkt lesbar sein oder der Wert wird erst durch den Aufruf einer Funktion übergeben. Genauso erfolgt die Kommunikation zwischen verschiedenen Programmen über Anfragen, die dann bearbeitet werden. Sollen diese Daten lesbar sein, ohne jedes Mal eine Kommunikation zwischen den jeweiligen Programmen zu initiieren, dann werden die Daten in einer Datenbank abgelegt. Dort können dann verschiedene Module auf die abgelegten Daten zugreifen. Bei der INFOBASE handelt es sich um eine solche Datenbank zum Speichern und Abrufen von Daten vielfältiger Art. Die INFOBASE wurde von Torsten Scherer als Teil seiner Dissertation entwickelt [Scherer, 2004]. Die zu speichernden Daten werden im Speicher unter einem charakteristischen Pfadnamen abgelegt. Zum Abrufen der Daten kann auf einen Datensatz direkt über einen definierten Namen zugegriffen werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit die Datenbank zu durchsuchen.

2.4 Laborsteuerungsprogramm

Das während dieser Arbeit entwickelte Laborsteuerungsprogramm befindet sich in der Hierarchie der Abläufe an oberster Stelle der Programmierung und ruft alle anderen Komponenten des Systems nach Notwendigkeit auf.

Für die einfachere Strukturierung und Abänderung des Programms wurde das Laborsteuerungsprogramm als Kommandozeilenprogramm konzipiert. Das heißt, das Programm wird in einem Eingabefenster gestartet und die notwendigen Aus- und Eingaben werden über die Tastatur ausgeführt. Eine Bedienung des Programms über eine Fensteroberfläche wurde nicht implementiert, um die Möglichkeiten für schnellere Änderungen des Programms offen zu lassen. Eine für den Benutzer komfortablere Bedienung hätte bedeutet, bei jeder Änderung möglicherweise auch die Bedieneroberfläche zusätzlich ändern zu müssen. Im Hinblick auf eine spätere Implementierung einer Fensteroberfläche wurde das Laborsteuerprogramm allerdings so programmiert, dass in ihm möglichst wenige Details oder Aktionen direkt ausgeführt oder verändert werden können. Für jedes anzusteuern- de Gerät gibt es einen Satz von Befehlen, die ausgeführt werden können. Die genauere Spezifizierung, was für die korrekte Durchführung des Befehls getan werden muss, ist in Unterstrukturen und separaten Programmteilen festgelegt. Diese Unterstrukturen können, beziehungsweise müssen, gegebenenfalls geändert werden. Der Roboter hat in dieser Hierarchie die gleiche Stellung wie die Roboterhilfen (Abbildung 2.1, Seite 16).

Der Start der Probenentnahmen für eine Kultivierung erfolgt durch die Angabe des ersten Probenentnahmezeitpunktes und des Intervalls in Stunden, mit dem die nachfolgenden Proben entnommen werden sollen. Beide Werte werden in der Datenbank INFOBASE abgelegt und kontinuierlich überprüft. Ist der entsprechende Zeitpunkt erreicht, wird mit der Probenentnahme begonnen. Der Ablauf einer Probenentnahme ist als Anweisungsabfolge in der INFOBASE abgelegt, wird während des Steuerungsablaufs eingelesen und nacheinander ausgeführt.

Während des Ablaufs einer Probenentnahme, beziehungsweise der Durchführung einer Teilsequenz, beginnt ein neuer Abschnitt erst nachdem der vorherige ausgeführt wurde. Kommt es während eines Abschnitts zu einem Fehler, wird dieses bei der Rückmeldung der Funktion kenntlich gemacht. Nach einem solchen Fehler wird das Programm in den meisten Fällen aus Sicherheitsgründen nicht fortgeführt. Durch die Komplexität des Ablaufs kann nicht sicher bestimmt werden, auf Grund welcher Vorkommnisse die Durchführung der Aktion fehlgeschlagen ist und eine automatische Fehleranalyse ist nicht möglich. Eine Ausnahme hiervon ist die Kommunikation mit den Geräten, kommt es hierbei zu einem Problem, kann ohne Weiteres automatisch ein zweiter Versuch zur Kommunikation mit dem betroffenen Gerät durchgeführt werden.

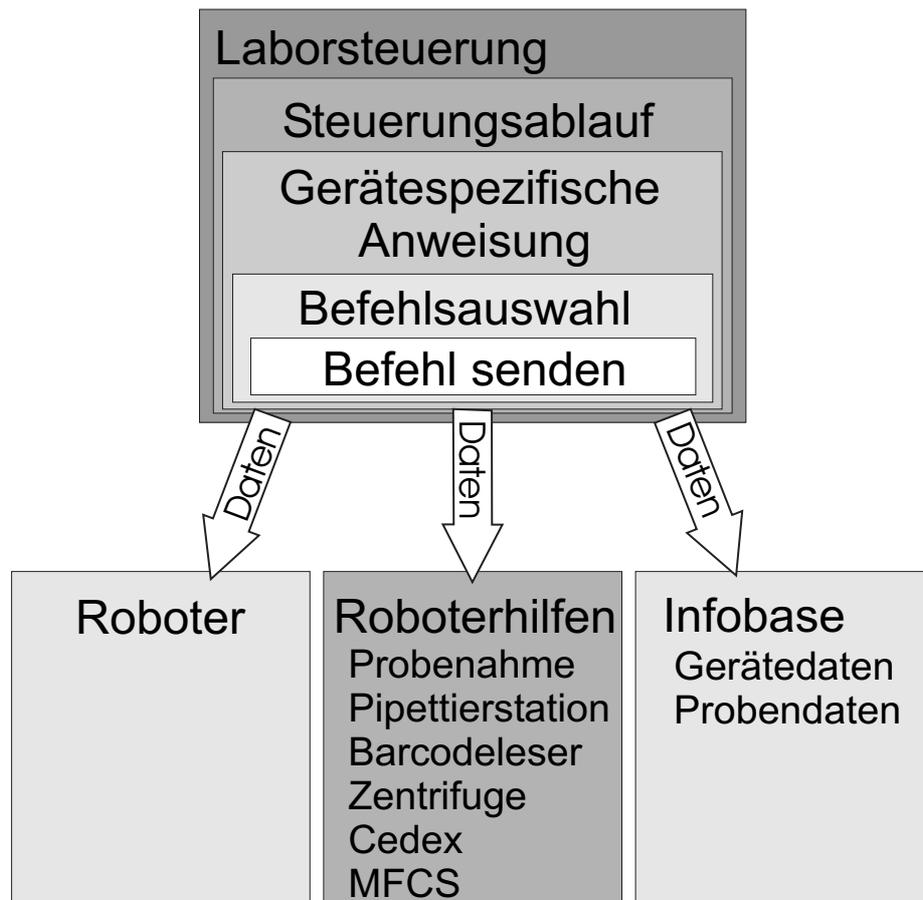


Abbildung 2.1: Hierarchie des Laborsteuerungsprogramms. Roboter, Roboterhilfen und Datenbank (INFOBASE) stehen in Bezug auf das steuernde Laborprogramm auf der selben Hierarchie-Ebene

2.5 Autonomer mobiler Roboter

Der zum Einsatz kommende autonome mobile Roboter (siehe Abbildung 2.2, Seite 18) wurde während der Dissertation von Torsten Scherer [Scherer, 2004] entwickelt, programmiert und ausführlich getestet. Er besteht aus zwei getrennten Hauptsystemen - der fahrbaren Plattform der Firma Genrob (Sindelfingen, Deutschland) und dem Roboterarm der Firma Mitsubishi Heavy Industries (Tokyo, Japan). Beide Systeme sind komplett von einander getrennt und werden jeweils separat angesteuert. Der Arm ist mit drei zusätzlichen Sensoren beziehungsweise Aktoren ausgerüstet,

- ein elektrischer Zwei-Finger Parallel-Greifer zur Ausführung der Manipulationen an den Objekten
- eine Mikroskop-Farbkamera zur Verifizierung und Korrektur der Position und Ausrichtung des Greifers über dem Objekt
- ein Kraft/Momentensensor zur Überprüfung der Bewegungen bei denen die Kamera nicht eingesetzt werden kann.

Die Plattform enthält bereits vom Hersteller die notwendigen Sensoren zur Navigation und Lokalisation. Hauptkomponenten sind dabei die Drehgeber an den Antriebsrädern der Plattform, mit denen die derzeitige Position berechnet wird sowie zwei Laserscanner von denen jeweils einer vorne und hinten an der Plattform angebracht ist. Mit den Laserscannern wird die aus den Fahrdaten berechnete Position überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

2.5.1 Aufgaben

Die Aufgabe des Roboters lässt sich prinzipiell in zwei Schritte unterteilen,

- Transport der Probe
- Manipulationen von Objekten

Die Manipulationsaufgaben, die der Roboter mit der Probe beziehungsweise für die Probenbearbeitung durchführen muss, sind zum Teil sehr komplex, so dass Roboterhilfen, die dem Roboter die Durchführung seiner Aufgaben erlauben, notwendig sind. Die Roboterhilfen werden in Kapitel 2, ab Seite 11, und Kapitel 4, ab Seite 53, beschrieben.

2.5.2 Programmierung

Der Roboter wird in das Softwaresystem eingebunden, indem ein Objekt erzeugt wird, zu dem eine Befehlsbibliothek gehört, deren Funktionen dann ausgeführt werden können.

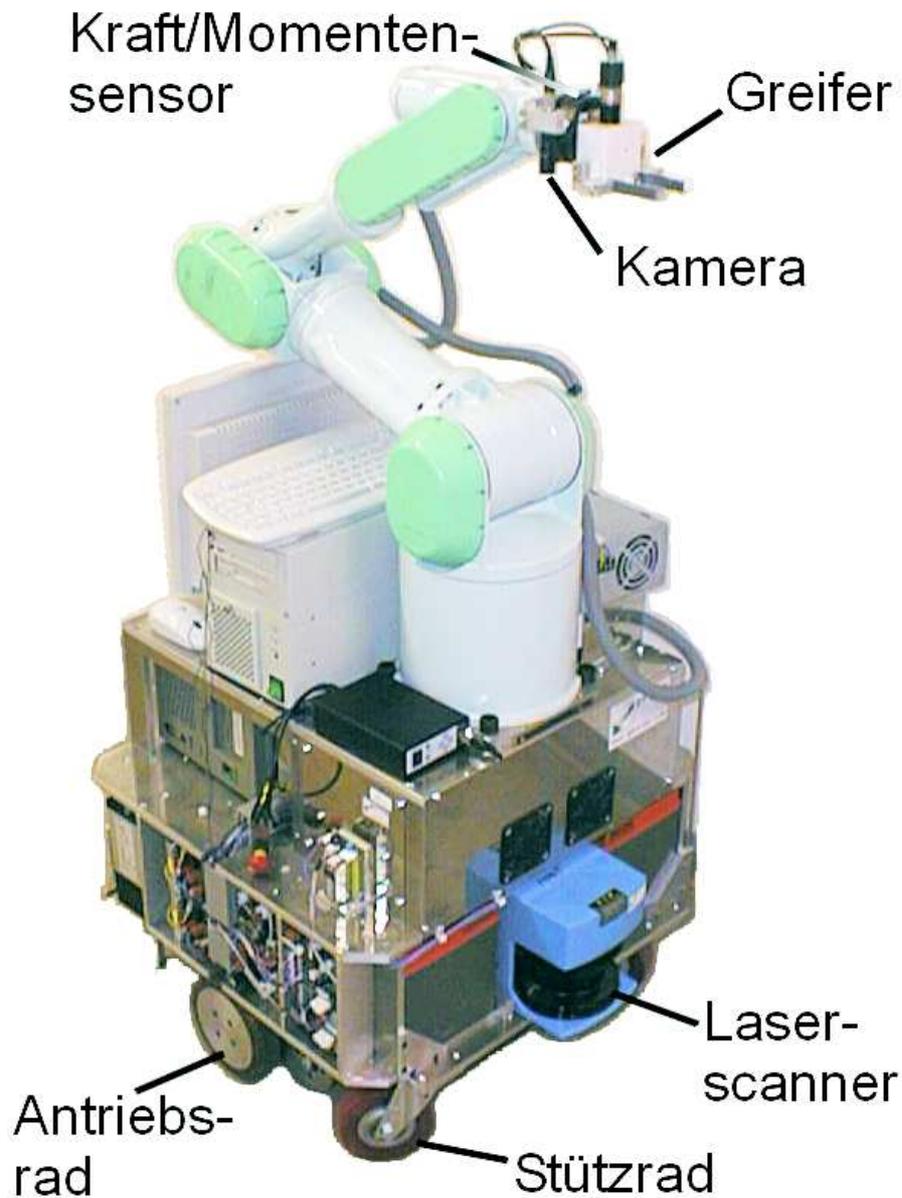


Abbildung 2.2: Der mobile autonome Roboter. Vorne unten ist in blau der Laserscanner erkennbar. Am Arm sind Greifer, Kamera und Kraft/Momentensensor angebracht.

Dem übergeordneten Programm bleibt die Art und Weise der Implementierung der Robotersteuerung verborgen. Des Weiteren ist der autonome Roboter auf dieser Ebene der Programmierung allen Roboterhilfen in der Hierarchie gleichgestellt (siehe dazu auch Abbildung 2.1 in Kapitel 2.4, Seite 16). Einige der ausführbaren Befehle sind im Folgenden aufgelistet:

- PickTubeStorage - Entnimmt dem Materiallager ein Probengefäß

- HoldTubeSampler - Einsetzen und Festhalten des Probengefäßes in den Probenentnehmer
- TakeTubeSampler - Entnimmt das Probengefäß dem Probenentnehmer
- HoldTubePipette - Platziert das Probengefäß an der Pipettierstation. Es können zwei Parameter übergeben werden. Der eine Parameter bestimmt wie hoch das Röhrchen unter die Pipettierstation gehoben werden soll, der andere, ob das Röhrchen vor Entnahme der Zellsuspension geschwenkt werden soll
- TakeTubePipette - Entfernt das Probengefäß von der Pipettierstation
- LoadAndRunCentrifuge - Beläd die Zentrifuge mit dem Probengefäß und startet die Zentrifugation
- PlaceCedexCedex - Setzt das Gefäß für die CEDEX-Messung in den Probenrotor des CEDEX ein
- PickCedexCedex - Entnimmt das Gefäß für die CEDEX-Messung aus dem Probenrotor des CEDEX
- ParkCharger - Der autonome Roboter begibt sich zum Aufladen der Akkus an die Ladestation
- UnparkCharger - Roboter wird für eine Fahrt von der Ladestation getrennt

Ein Pick-Befehl bedeutet, dass eine Greifsequenz durchgeführt wird, der eine Erkennung des Objekts vorausgeht. Im Gegensatz dazu bedeutet ein Take Befehl, dass ein Objekt, das an einer Station vom Roboter im Greifer gehalten wurde, wieder entfernt wird. Der Roboter hält das Objekt danach immer noch im Greifer, ist aber bereit die nächste Aktion auszuführen.

Mit einem Hold-Befehl wird ein Objekt an die entsprechende Station gebracht und bei der nachfolgenden Aktion kontinuierlich festgehalten. Bei der Anwendung der jeweiligen Befehle ist stets darauf zu achten welche Voraussetzungen für eine Aktion vorliegen müssen und ob diese auch tatsächlich eingehalten sind. Eine nicht sorgfältig geplante aufeinander folgende Ausführung von Aktionen kann in einer Beschädigung der verwendeten Geräte enden! Gibt man zum Beispiel den Befehl, das Probengefäß zur Pipettierstation zu bringen, könnte es sein, dass der Roboter das Gefäß gerade an der Probenentnahmestation festhält. Er wird nun nicht erst der Befehl zum Entnehmen des Gefäßes aus dem Halter durchgeführt, sondern direkt die Bewegung in Richtung Pipettierstation begonnen, diese Ausführung kann dann zur Beschädigung des Greifers oder der Probenentnahmestation führen.

2.6 Probenentnahmestation

2.6.1 Allgemeiner technischer Aufbau

Der prinzipielle Aufbau, dargestellt in Abbildung 2.3, Seite 20, der im Folgenden vorgestellten Probenentnahmestationen ist jeweils identisch, und wurde während einer Diplomarbeit [Plahl, 1998] am Lehrstuhl für Zellkulturtechnik der Universität Bielefeld entwickelt. Es handelt es sich dabei um ein Schlauchsystem, an dessen Ende sich eine Nadel befindet, durch die Flüssigkeit in verschiedene Gefäße abgefüllt werden kann. Die Positionierung der Nadel geschieht bei jeder der Stationen durch eine andere technische Variante eines Positioniersystems, das als Portalpositionierer aufgebaut ist. Die Charakteristik eines Portals ist dabei die Anordnung des Positioniersystems über dem Arbeitsraum.

Der Flüssigkeitsstrom wird durch drei Ventile gesteuert und die Nadel wird durch eine Positioniervorrichtung zu den jeweiligen Gefäßen bewegt. Am Ende einer jeden Probenentnahme wird das System zur Sterilisation mit Heißdampf durchströmt. Im allgemeinen Fall gibt es jeweils ein Probe-, Abfall- und Sterilisationsgefäß, bei kleinen Volumenströmen kann das Sterilisationsgefäß aber auch gleichzeitig als Abfallgefäß dienen, da durch den Kondensatabfluss auch überschüssige Probe ablaufen kann. Als Probengefäß dient ein 50 ml

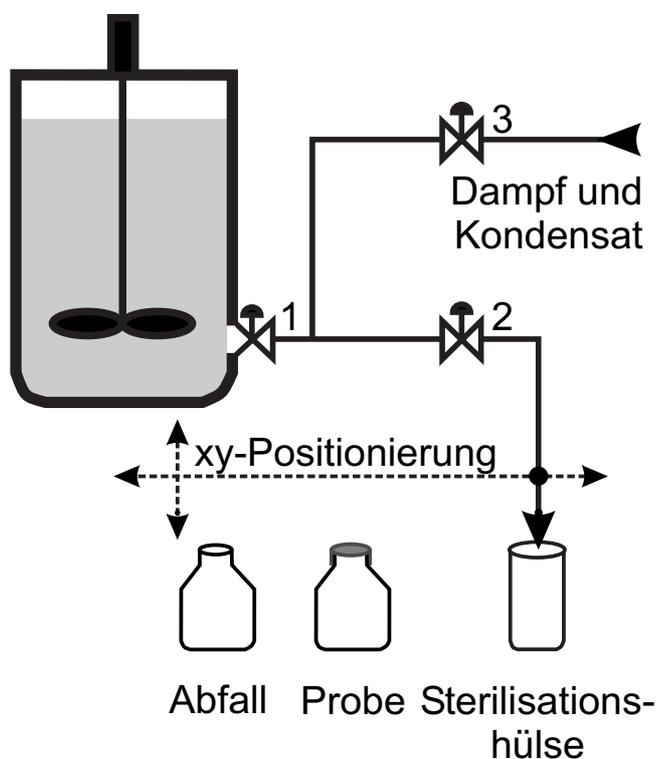


Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau der Probenentnahmestationen

Röhrchen, in dessen Deckel eine Öffnung gefräst wurde, die mit einem Septum verschlossen ist.

In Abbildung 2.4, Seite 21, sind die Nadel und die Sterilisationshülse zu sehen. Die Nadel ist auf einem konischen Sockel befestigt, an dem ein Dichtungsring sitzt, so dass während der Sterilisation ein sicherer Abschluss gegenüber der Umgebung geschaffen wird und kein Dampf austreten kann. Für den Fall, dass der Dichtungsring einmal nicht hundertprozentig dichteten sollte, wurde eine Aerosol-Glocke über dem Konus und der Nadel angebracht, die verhindert, dass Dampf direkt nach oben entweichen kann. Ventil 1 ermöglicht die Verbindung zum Reaktor, es handelt sich um das pneumatisch betätigte Aseptik-Probenentnahmeventil A 917 T von Südmo (Riesbürg, Deutschland). Ventil 2 und 3 sind pneumatisch betätigte Membranventile. Ventil 3 schließt beziehungsweise öffnet die Verbindung zur Dampfleitung und dient zum Spülen und zur Sterilisation des Systems. Ventil 2 schließt das Schlauchsystem zur Umgebung hin ab und muss vor dem Abfüllen der Probe und der Sterilisation des Systems geöffnet werden.

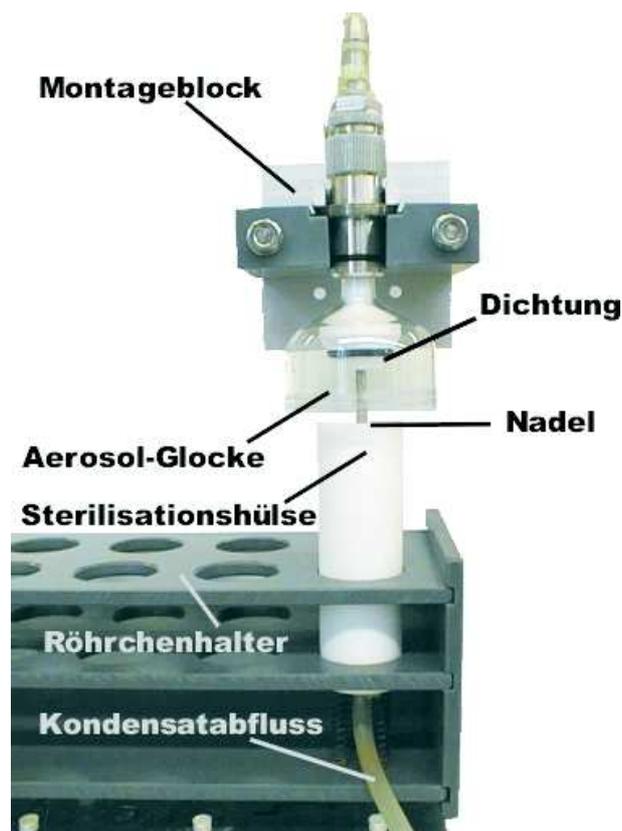


Abbildung 2.4: Nadel der Probenentnahmestation mit Sterilisationshülse

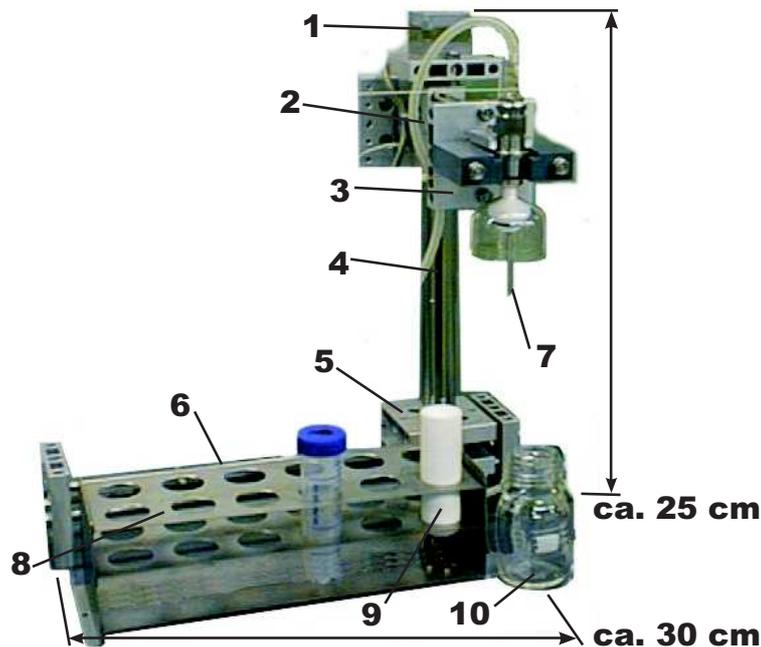


Abbildung 2.5: ELVAMAT mit Röhrenhalter und Abfallflasche. 1: Schrittmotor, 2: Y-Achse, 3: Montageblock, 4: Z-Achse, 5: Gleitschlitten, 6: X-Achse, 7: Nadel, 8: Röhrenhalter, 9: Sterilisationshülse, 10: Abfallflasche

2.6.2 Hardware

Die drei verschiedenen Probenentnahmestationen begründen sich historisch. Bei der ersten Variante handelt es sich um ein sehr einfaches Gerät, das zum Einstieg in das Projekt und zum Beweis der Funktionalität der Konstruktion diente. Bei den beiden später verwendeten Probenentnahmestationen handelt es sich um technisch verbesserte Systeme.

ELVamat

Der ELVAMAT, Abbildung 2.5 auf Seite 22, ist ein Bausatz der Firma ELV (Leer, Deutschland), bestehend aus einem Drei-Achsensystem, bei dem jeweils ein Montageblock, geführt durch zwei Gleit-/Montagestäbe, von einem Schrittmotor über eine Gewindespindel angetrieben wird. Es kann ein Bereich von 270 mm Breite, 210 mm Höhe und 90 mm Tiefe abgefahren werden. Zu jeder Achse gehört ein Endtaster-Paar, welches das Erreichen der maximalen Auslenkung detektiert. Zur Ansteuerung wird das ebenfalls von ELV erhältliche Schrittmotoren-Steuerinterface SMS 7000 benötigt. Das Interface wird über die parallele Schnittstelle an den steuernden PC angeschlossen, so dass die Motoren direkt angesteuert werden können. Ein großer Nachteil dieses Gerätes ist, dass die aktuelle Position der Gleitschlitten nicht abgefragt werden kann. Die einzige Möglichkeit zur Bestimmung der Position ist das Hochrechnen der Position aus den durchgeführten Bewegungen. Kommt

es bei einer Bewegung zum Verklemmen der Schlitten, kann dieses nicht detektiert werden und die nachfolgende Bewegung wird fehlerhaft durchgeführt. Ein weiterer Nachteil dieser Konstruktion ist die nicht ausreichende Stabilität der Gleitstäbe und Gewindestangen bei Querbelastungen. Dieses ist speziell bei der Sterilisation zu bemerken, wenn die Dichtung der Nadel auf die Sterilisationshülse gedrückt werden muss. Trotz dieser Nachteile hat sich das Gerät im Einsatz bewährt und konnte erfolgreich während mehrerer Kultivierungen eingesetzt werden.

Linear-Roboter

Als verbessertes Positioniersystem für die Probenentnahmestation wurde ein **X-Z-Linear-Roboter** der Firma SigPositec (Lahr, Deutschland) eingesetzt, siehe Abbildung 2.6 auf Seite 24. Die Ansteuerung erfolgt durch TWIN LINE Positioniersteuerungen für Schrittmotoren des selben Herstellers. Mit diesem Gerät können relativ und absolut Positionierungen auf Zehntelmillimeter genau durchgeführt werden. Es kann ein Bereich von 540 mm Breite und 280 mm Höhe befahren werden. Die augenblickliche Position und der Zustand des Systems können im Stillstand und während der Fahrt abgefragt und überwacht werden. Es gibt zahlreiche Fehlerüberwachungen und Fehlermeldungen, außerdem wird das Gerät zum Beispiel bei Kollisionen automatisch abgeschaltet.

Linear-Schlitten

Bei der dritten Positioniereinheit für die Probenentnahmestation handelt es sich um einen pneumatisch angetriebenen **Linear-Schlitten** der Firma Festo (Esslingen, Deutschland), siehe Abbildung 2.7 auf Seite 25. Die Ansteuerung erfolgt mit einem IPC FEC-Standard Front End Controller. Mit diesem Gerät ist kein echtes freies Positionieren möglich, stattdessen wird ein Schlitten auf die jeweiligen Endanschläge der Führungsschienen gefahren. Auf der X-Achse kann rechtsseitig optional eine Zwischenstellung aktiviert und angefahren werden. Insgesamt ist dieses Gerät kompakter und einfacher als der oben beschriebene Linear-Roboter. Es werden nur Steuerspannungen für die Pneumatik benötigt, daher entfällt die Leistungsansteuerung für die Motoren.

2.6.3 Programmierung

Für die Steuerung des Systems darf es keine Rolle spielen welche der drei verschiedenen Probenentnahmestationen sich in Verwendung befindet. Daher muss es eine Schnittstelle geben, an der die vom Laborsteuerungsprogramm kommenden Befehle erkannt und in die konkreten, korrekten Hardwarebefehle der jeweiligen Station umgewandelt werden. Die Unterscheidung der Geräte erfolgt bei der Initialisierung des Probenentnahmesystems. In einer Konfigurationsdatei wird dem System beziehungsweise Server mitgeteilt welche Probenentnahmestation im System verwendet wird und welche Parameter für die Ansteuerung

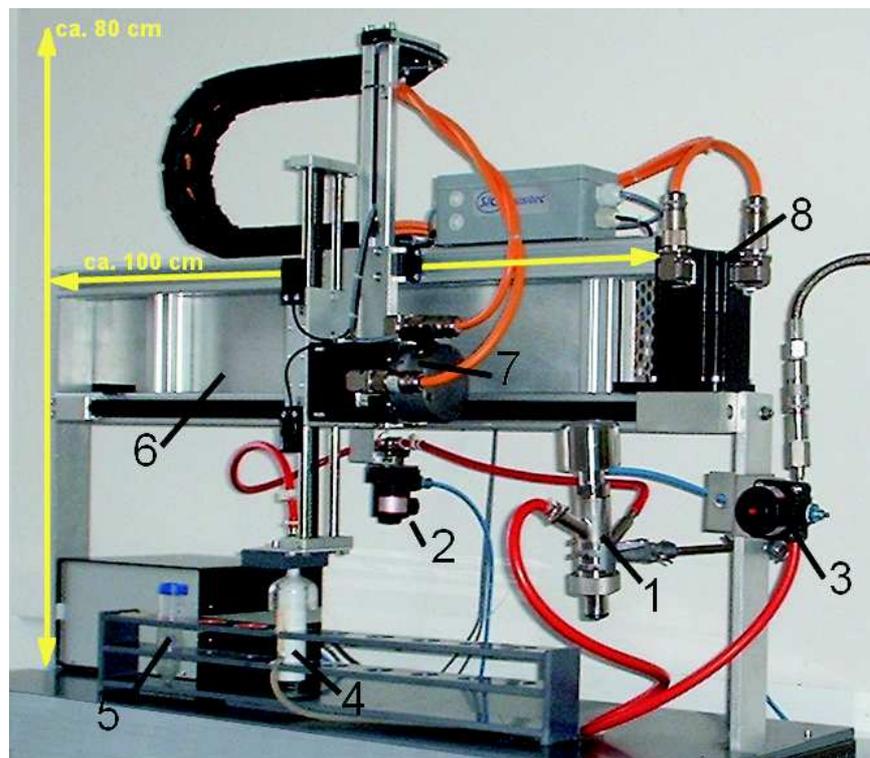


Abbildung 2.6: Linear-Roboter der Firma SigPositec. 1: Reaktorventil, 2: Auslaufventil, 3: Dampfventil, 4: Serilisationshülse, 5: Probenentnehmeröhrchen, 6: Steuerschrank, 7: Motor Z-Achse, 8: Motor X-Achse

verwendet werden müssen. Ein Schema der beteiligten Unterstrukturen ist in Abbildung 2.8, Seite 26, dargestellt. Die grundsätzliche Struktur wurde von Sandra Plahl entwickelt und eingesetzt, während der hier vorliegenden Arbeit wurden notwendige Erweiterungen und Anpassungen durchgeführt, um das Programm in die Gesamtstruktur einzubinden.

Insgesamt existieren drei Server, die auf Anfragen von Klienten warten. Diese Server sind die Probenentnahme-, Ventil- und Positionierersteuerung. Dabei sind Ventil- und Positionierersteuerung der Probenentnahmesteuerung untergeordnet. An die Probenentnahmesteuerung, werden die Befehle von der ihr übergeordneten Laborsteuerung gesendet. Diese Befehle sind für alle Probenentnahmestationen und Ventilansteuerungen identisch. Die Aufspaltung nach Ventil- und Positionierersteuerung erfolgt innerhalb der Probenentnahmesteuerung, der jeweilige Befehl wird an die entsprechende tiefer liegenden Ebene weitergegeben. Einige auf dieser Ebene programmierte Befehle sind hier als Beispiel aufgeführt:

- getInfos - Abrufen der aktuellen Werte der Probenentnahmestation; enthält den nächsten Probenentnahmezeitpunkt bei automatischer Probenentnahme, die Anzahl der bisher entnommenen Proben, den zur Zeit gerade durchgeführten Schritt einer Probenentnahme und gegebenenfalls eine Fehlernachricht

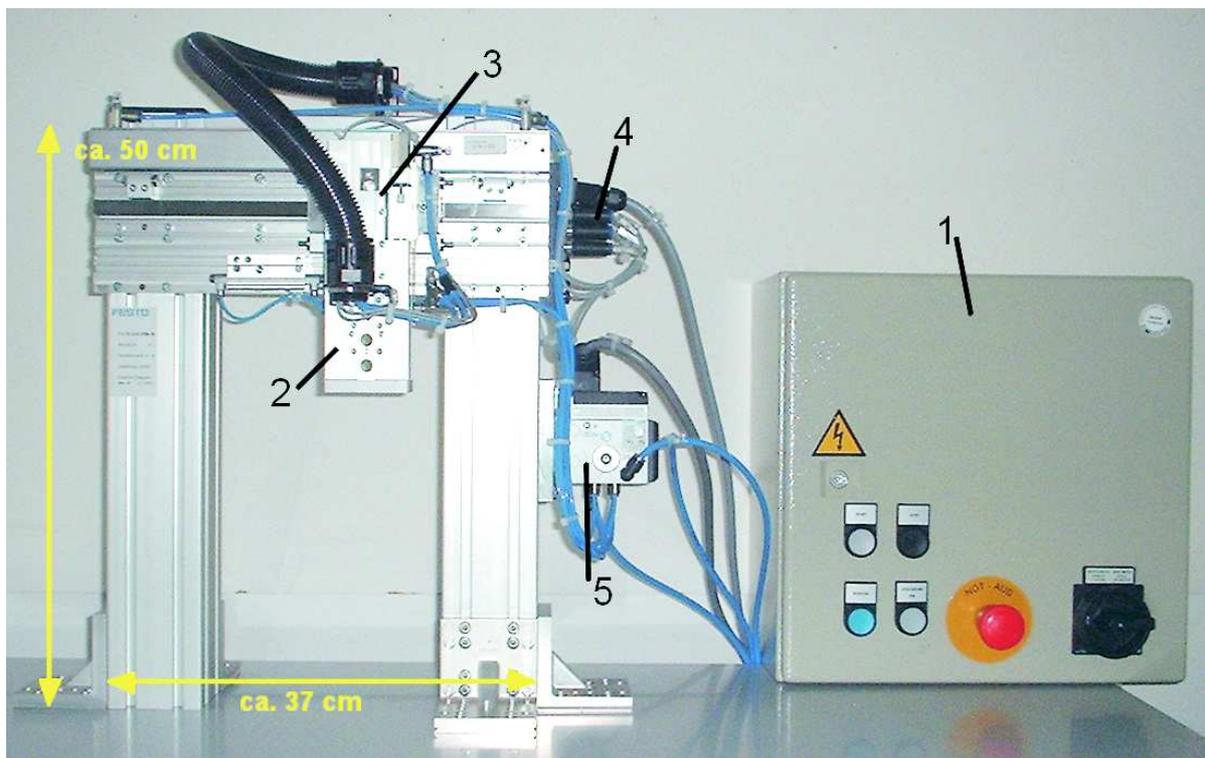


Abbildung 2.7: Linearschlitten der Firma Festo. 1: Steuerschrank, 2: Schlitten Z-Achse, 3: Schlitten X-Achse, 4: Sensoranschlüsse, 5: Druckluftanschlüsse

- getConfigs - Abrufen der allgemeinen Konfiguration der Probenentnahmestation; Art der Durchführung der Probenentnahme (automatisch oder manuell), die Anzahl der durchzuführenden Probenentnahmen, die Anzahl der ansteuerbaren Ventile, Name der Protokolldatei, Ablauf der Probenentnahme und Anzeige, ob der Probenentnahmeablauf einer Standardprobenentnahme entspricht.
- getRPos - Abfrage der aktuellen Koordinaten des Positionierers
- testRobot - Durchführen der Positionierbewegungen, ohne Ventilansteuerung
- gohome - Bewegen des Positionierers an die Nullstellung vorne, oben, rechts
- move - Bewegen des Positionierers auf einer auswählbaren Achse um eine bestimmte Anzahl von Schritten
- getSampleLength - Abfrage der Dauer einer Probenentnahme
- startSampling - sofortiger Start einer Probenentnahme
- Sterilisation - schaltet die Ventile entsprechend der übergebenen Werte für die angegebene Zeitdauer

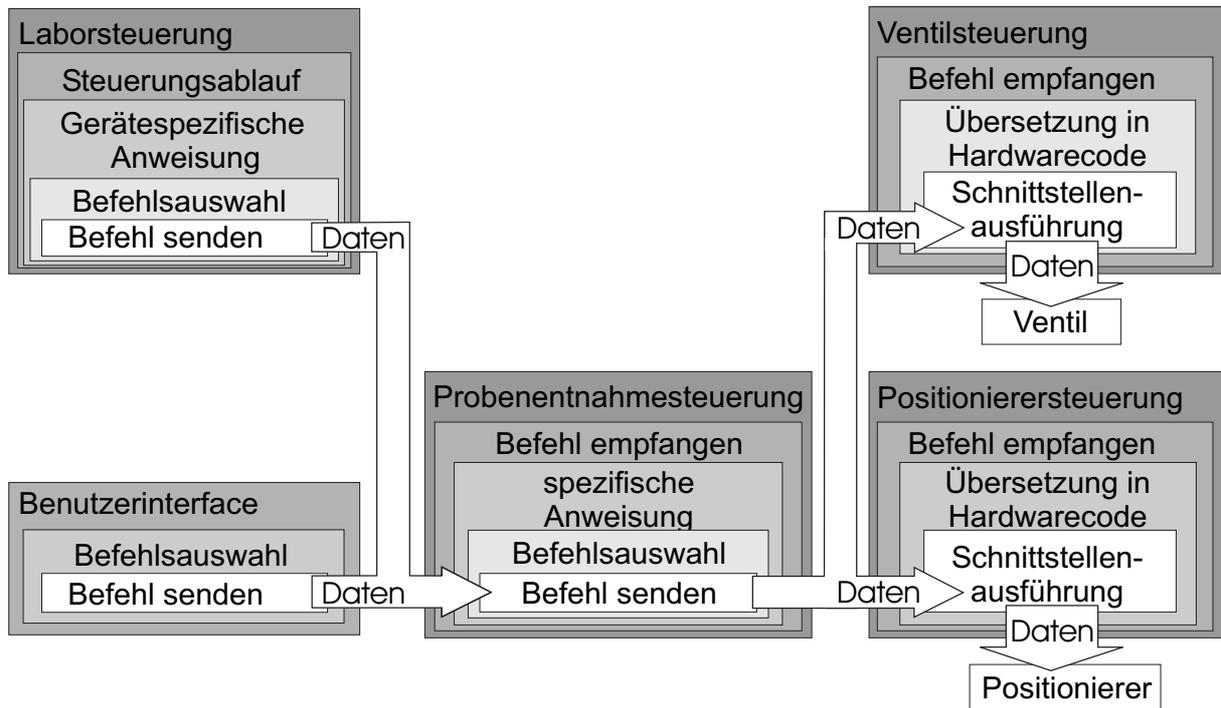


Abbildung 2.8: Schema der Programmstrukturen für die Steuerung der Probenentnahme

Durch die ursprüngliche Aufspaltung in Probenentnahmesteuerung und Benutzerinterface kann das System auch ohne Benutzeroberfläche als stand-alone Komponente betrieben werden. Dabei wird im Kommandozeilenbetrieb eine im Konfigurationsfile angegebene Menge von Probenentnahmen durchgeführt. Näheres hierzu und zur Ansteuerung im Allgemeinen lässt sich in der Diplomarbeit von Sandra Plahl finden.

Durch die verschiedenen Varianten der Positionierer mussten unterschiedliche Kommunikationsarten für die Ansteuerung implementiert werden.

ELVamat

Der **ELVamat** ein sehr simples Gerät, das prinzipiell für „Hobbybastler“ gedacht ist, allerdings ergab sich hier die komplizierteste Steuerung. Dies scheint zuerst ein Widerspruch, denn gerade für den „Heimgebrauch“ sollte eine Steuerung einfach sein. Der Grund für diesen Widerspruch liegt in der Einbindung des Gerätes in das Gesamtsystem. Bei der mit dem Gerät gelieferten Steuerung handelt es sich um ein eigenständiges Programm auf DOS-Basis, das die Befehle für das Schrittmotoren-Steuerinterface generiert und über die parallele Schnittstelle weitergibt. Das zur SMS 7000 gehörende Interfaceprogramm kann laut Herstellerangaben von jeder beliebigen CNC-Software, die Daten im Wanatabe-Format ausgibt, angesteuert werden. Allerdings sollte eine Einbindung von Fremdsoftware vermieden werden, um spätere mögliche Probleme, zum Beispiel auf Grund von Betriebs-

systemänderungen, zu vermeiden. Die Signale für die Ansteuerung der Schrittmotoren werden daher direkt generiert und über die parallele Schnittstelle des ansteuernden Rechners an das Schrittmotoren-Steuerinterface weitergegeben. Die pneumatischen Ventile werden direkt durch jeweils ein stromlosgeschlossenes Magnetventil angesteuert. Die Ansteuerung der Magnetventile erfolgt über ein Relais, das sein Signal von der TTL-Schnittstelle des Steuerungsrechners bekommt.

Linear-Roboter

Die Steuereinheiten des **Linear-Roboters** sind mit RS 232 und RS 485 Schnittstellen ausgestattet. Die RS 485 Schnittstellen erlauben den Feldbus-Betrieb, das heißt es können mehrere Geräte mit RS 485 Schnittstelle hintereinander geschaltet werden, die von nur einer Schnittstelle am Rechner angesteuert werden. Dafür benötigt man einen Umsetzer, der die Konvertierung des RS 232 Ausgangssignals vom Steuerrechner in RS 485 ermöglicht. Durch den Einsatz eines achtfach seriellen Zusatzinterfaces war eine ausreichende Menge von seriellen Schnittstellen vorhanden, so dass der Feldbusbetrieb nicht verwendet wird. Jede Steuereinheit wird für sich an eine eigene RS 232 Schnittstelle gekoppelt.

Zur Gewährleistung räumlicher Flexibilität sind die Steuereinheiten nicht direkt mit den Schnittstellen des Steuerrechners verbunden. Sie sind stattdessen an ein Interface angeschlossen, das die Signale vom Netzwerk auf eine RS 232 Schnittstelle umwandelt. Bei dem Interface handelt es sich um das Gerät NPORT SERVER LITE (DE-304) der Firma MOXA (Laudenbach, Deutschland), an das vier verschiedene serielle Geräte unter derselben IP-Nummer im Netzwerk angesteuert werden können. Auch für die Ansteuerung der pneumatischen Ventile liegt eine netzwerkfähige Lösung vor. Die direkte Ansteuerung der Ventile erfolgt weiterhin über vorgeschaltete Magnetventile, die von jeweils einem Relais angesteuert werden. Diese Relais befinden sich auf einer achtfach seriellen Relaisplatine, die auch an den NPORT SERVER angeschlossen ist und somit über das Netzwerk angesteuert werden kann.

Linear-Schlitten

Die **Linear-Schlitten** Positioniereinheit besitzt eine Steuereinheit, die herstellerseitig schon für den Netzwerkanschluss vorbereitet ist, somit waren keine Erweiterungen des Aufbaus notwendig. Eine zusätzliche Ansteuerung für die Ventile ist nicht notwendig. Es handelt sich bei diesem System um eine pneumatisch betriebene Mechanik, die bereits während der Konstruktion mit einer ausreichenden Menge von steuerbaren pneumatischen Anschlüssen ausgelegt wurde. Über diese Anschlüsse werden die Ventile, die den Flüssigkeitsstrom lenken, angesteuert.

2.7 Pipettierstation

Im Laufe einer Probenentnahme müssen den Probenentnahmegefäßen Aliquots entnommen werden. Die Pipettierstation ermöglicht dem Roboter diese Aufgabe durchzuführen. Über eine metallische Kanüle wird das Septum des Probenentnahmegefäßes durchstochen und ein Teil der Probe entnommen. Des Weiteren sind Reagenzien zur Reinigung des Systems und zur Aggregatauflösung an die Pipettierstation angeschlossen.

2.7.1 Technischer Aufbau

Die Pipettierstation besteht aus zwei voneinander unabhängigen Geräten der Firma Hamilton (Martinsried, Deutschland). Das Spritzenmodul (PSD/2 - Precision Syringe Drive/2) wird zum Abmessen der korrekten Volumina benötigt und das Verteilerventil (MVP - Modular Valve Positioner) zum Entnehmen des entsprechenden Reagenzes sowie zum Aus- und Abgeben der Probe beziehungsweise Abfallflüssigkeit, siehe Abbildung 2.9 auf Seite 29. Die Kommunikation erfolgt über eine RS 232 Schnittstelle. Beide Geräte können entweder hintereinander an die selbe Schnittstelle angeschlossen werden (Daisychain) oder jeweils an eine eigene Schnittstelle. Bei dem im Projekt verwendeten Aufbau sind beide Geräte an die selbe Schnittstelle angeschlossen. Das System ist so programmiert, dass auch beim Anschluss der Geräte an verschiedene Schnittstellen jeweils die gleichen Schnittstellenparameter eingestellt werden müssen. An beiden Geräten müssen über Dip-Schalter (Abbildung 2.10 auf Seite 30 und 2.11 auf Seite 31) die variablen Parameter korrekt eingestellt sein. Diese einzustellenden Parameter sind unter anderem Baudrate, Protokoll, Ventile, Loop und Test. Alle notwendigen Parameter sind in Tabelle 2.1, Seite 28, auf-

Tabelle 2.1: Parameter der Pipettierstation

Parameter	Wert
Baudrate	9600
Parität	ungerade (odd)
Datenbits	7
Stopbits	1
Startbits	1
MVP-Ventil	8 Positionen (jeweils 45°)
Loop	On (letztes Gerät in der Daisychain) Off (alle anderen Fälle)
Test	Off
Protokoll	Protocol 1 / RNO+ Syntax

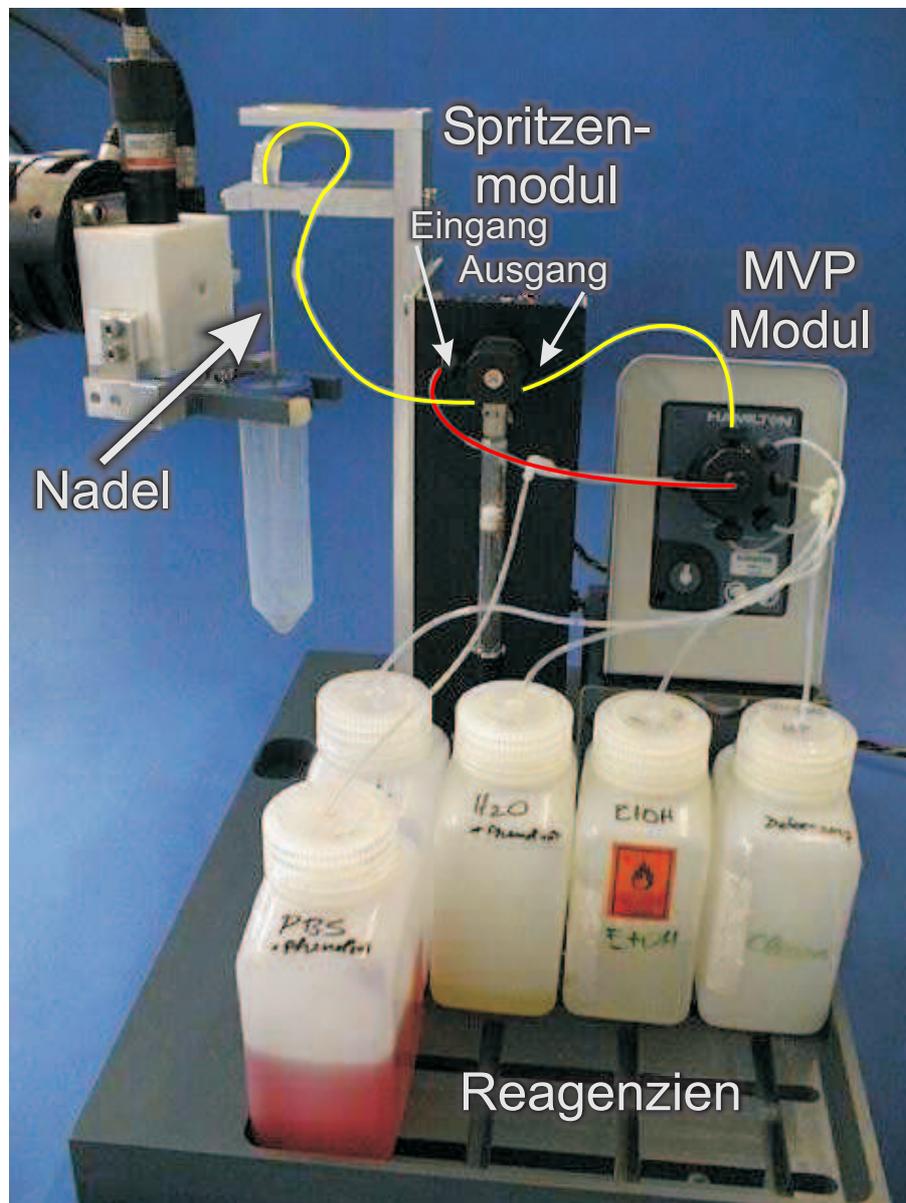


Abbildung 2.9: Pipettierstation. Die Pipettierstation ist aus Spritzenmodul (PSD/2) und Modular Valve Positioner (MVP) aufgebaut, im Vordergrund sind angeschlossene Reagenzien zu sehen, links die Nadel zur Entnahme von Aliquots.

Tabelle 2.2: Anschlüsse für die Kommunikation des PSD/2. Der Kommunikationseingang ist am Gerät mit J8 bezeichnet. Für eine Weiterleitung der Signale muss der Kommunikationsausgang (J6) mit dem Eingang des nächsten Gerätes 1:1 verbunden werden.

Pin	PSD/2 (J8)	Steuercomputer	
	Parameter	Sub _D 9 (Buchse)	Sub _D 25 (Buchse)
1	RxD	3	2
2	TxD	2	3
3	GND	5	7
4	GND Gehäuse	Schirm	1

gelistet. Die Verdrahtung des zur Verbindung der Geräte mit dem ansteuernden Rechner notwendigen Kabels ist in Tabelle 2.2, Seite 30, angegeben.

Das Spritzenmodul besteht aus dem Glaskolben der Spritze, in dem ein Stempel hoch und herunter gefahren werden kann, und einem Umschaltventil, so dass Flüssigkeit über zwei verschiedene Wege aufgenommen oder abgegeben werden kann. Der eine Anschluss der Spritze ist mit dem Mittelanschluss des MVP verbunden, der andere bleibt offen, um

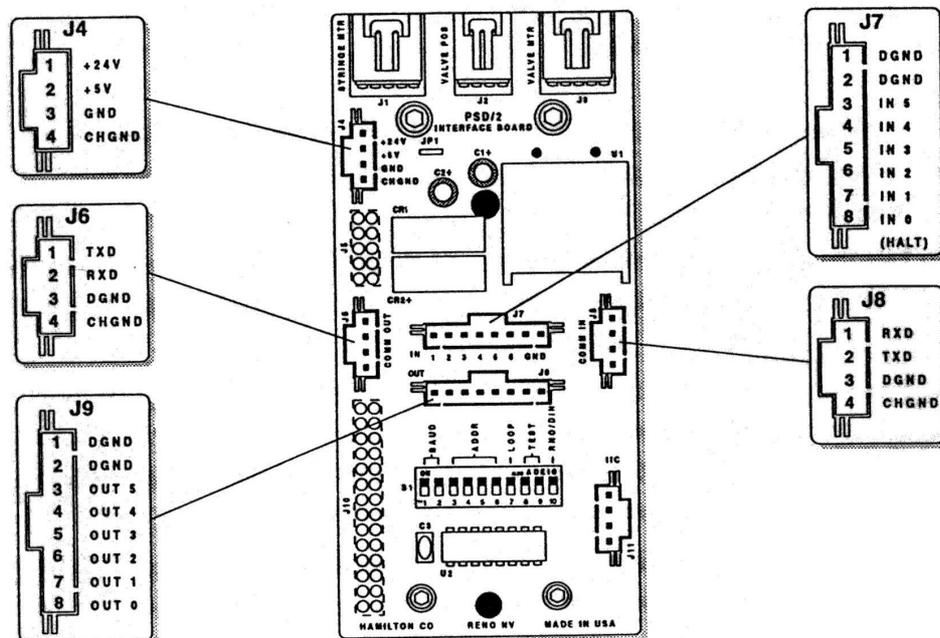


Abbildung 2.10: Interfaceplatine des PSD/2. Es sind die Spannungs- und Kommunikationsanschlüsse, sowie die Dip-Schalter für die Einstellung der Parameter zu sehen.

auf diesem Wege Luft aufzunehmen und so Restflüssigkeit aus den Verbindungskapillaren herauszudrücken.

Das MVP ist mit einem achtfach Verteilerventil ausgestattet, an jeweils einem Eingang sind die verschiedenen Reagenzien (Puffer, Wasser, Ethanol, Detergenz), der Abfallbehälter, die Mischkammer zur Aggregatlösung und die Nadel zur Abgabe der Flüssigkeiten angeschlossen.

Das verwendete Spritzenmodul ist mit einer internen $5 V_{DC}$ Spannungsversorgung ausgestattet. Zum Betrieb wird eine $24 V_{DC}$ Spannungsversorgung benötigt, die pro angeschlossenen PSD/2 1 A liefern kann. Der Anschluss der Spannungsversorgung wird nach den Angaben in Tabelle 2.3, Seite 32, vorgenommen. Das MVP wird durch das im Lieferumfang enthaltenen Netzteil versorgt.

2.7.2 Programmierung

Die Softwarestruktur für die Ansteuerung der Pipettierstation ist in zwei Hauptteile aufgeteilt, welche wiederum in weitere Unterstrukturen getrennt werden. Der eine Teil (Klient) enthält den Aufbau der Oberbefehle wie zum Beispiel

- Probe aufnehmen

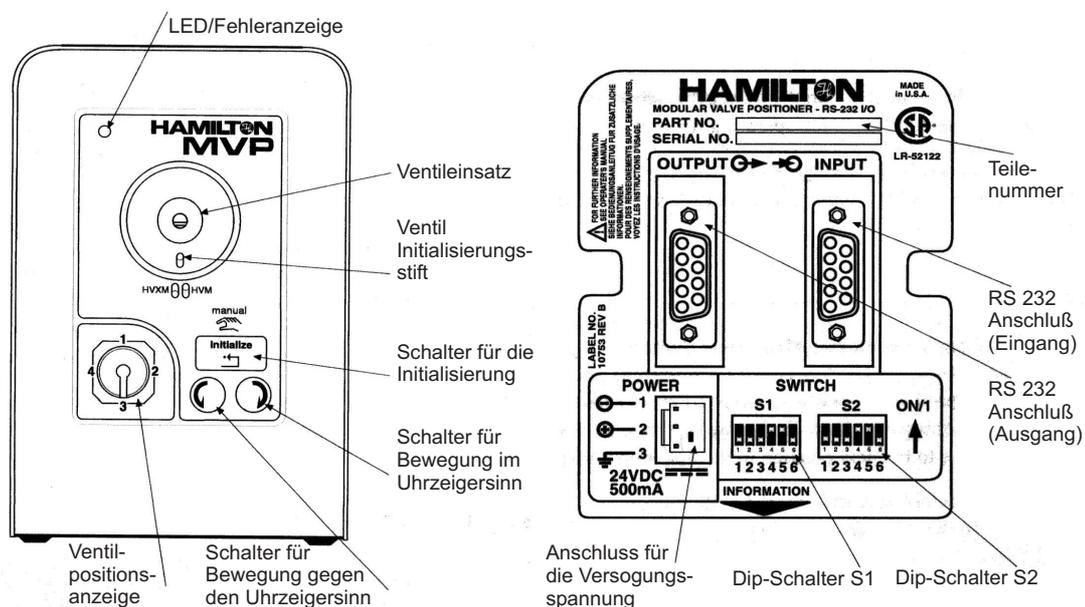


Abbildung 2.11: Vorder- und Rückseite des MVP. An der Vorderseite sind die Bedienelemente zusehen. An der Rückseite sind die Spannungs- und Kommunikationsanschlüsse, sowie die Dip-Schalter für die Einstellung der Parameter angebracht.

- Probe ausgeben
- Reinigen
- Spülen

die aus den jeweils durchzuführenden Einzelaktionen,

- Kolben x Schritte herunterfahren
- Kolben x Schritte hochfahren
- Verteilerventil auf Position x stellen

zusammen gesetzt sind. Der andere Teil (Server) enthält die Umsetzung der Befehle in die ASCII-Kodierung, die dem Endgerät über die serielle Schnittstelle übergeben wird. Weitere Unterstrukturen enthalten die Programmteile für die Kommunikation von Server und Klienten sowie die Befehle für die Kommunikation über die Schnittstelle und die Übertragung der direkten Befehle an die Endgeräte. Diese Strukturierung ist in Abbildung 2.12, Seite 33, dargestellt. In einer Konfigurationsdatei muss angegeben werden unter welcher Konfiguration (Schnittstellenanschluss, Baudraten, usw.) das System betrieben wird.

Bei den direkt an die Pipettierstation gesendeten ASCII-Befehlen handelt es sich um ein vom Hersteller der Geräte bereitgestelltes Protokoll. Die weiterführende Programmierung der Kommunikation und die Implementierung der übergeordneten Befehle, für zum Beispiel die Durchführung der Entnahme eines Aliquots, wurde im Laufe dieser Arbeit erstellt.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tatsache, dass dem ASCII-Befehl, der an jeweils eines der Geräte gesendet wird, ein Adressierungskommando vorangestellt werden muss. Die jeweilige Adresse des Gerätes ist von ihrer Position in der Reihenschaltung abhängig. Nach einer Trennung von der Spannungsversorgung ist die Adressierung aus dem Speicher der Geräte gelöscht und muss erneut durchgeführt werden.

Tabelle 2.3: Anschlüsse für die Spannungsversorgung des PSD/2. Der Anschluss für die Spannungsversorgung am Gerät ist mit J4 bezeichnet.

PSD/2 (J4)	
Pin	Parameter
1	24 V _{DC}
2	5 V _{DC}
3	GND
4	GND Gehäuse

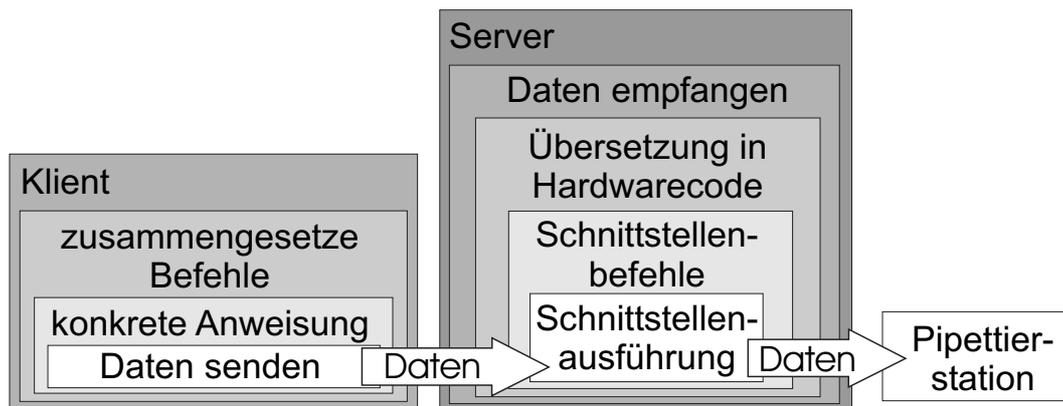


Abbildung 2.12: Verknüpfung der zum Modul der Pipettierstation gehörenden Einzelteile

Die Aufteilung in Server und Klienten ermöglicht die Nutzung der Pipettierstation sowohl im Verbund mit dem Laborsteuerungsprogramm wie die Ansteuerung über eine Fensteroberfläche, so dass die Geräte auch direkt vom Bediener genutzt werden können. Eine solche Fensteroberfläche wurde im Laufe der Arbeit erstellt.

2.8 Automatisches Zellzählgerät Cedex

Das automatische Zellzählgerät CEDEX, Abbildung 2.13 auf Seite 35, der Innovatis AG ist ein eigenständiges Messsystem, das die manuelle Zelldichte- und Viabilitätsbestimmung auf Basis der Trypanblau-Methode komplett automatisiert. Routineaufgaben wie die Probenvorbereitung sowie die graphische Ergebnisdarstellung und Datenarchivierung werden vom System vollautomatisch ausgeführt. Das Gerät ist für die Bedienung durch Laborpersonal ausgelegt und die Bedienung erfolgt normalerweise über Tastatur und Maus. Als optionales Zubehör kann das Probenkarussell AS20 verwendet werden, dadurch wird die automatische Zuführung von bis zu zwanzig Proben nacheinander erlaubt. Weiterhin besteht die Möglichkeit zur Ansteuerung über eine Netzwerkverbindung, so dass eine CEDEX-Messung vom Leitrechner gestartet und die Messergebnisse abgerufen werden können.

Suspensionszellkulturen können mit dem CEDEX-System objektiv und benutzerunabhängig analysiert werden. Die Anwendung der Trypanblau-Färbemethode ermöglicht dem Benutzer die Überprüfung der ermittelten Ergebnisse und trägt somit zur Nachvollziehbarkeit des Ergebnisses und zur Akzeptanz der Methode bei. Die ermittelten einzelnen Ergebnisse werden graphisch Aufgearbeitet und auf der Benutzeroberfläche dargestellt. Dabei können in neueren Softwareversionen des Systems auch Kultivierungsverläufe dargestellt werden.

Das CEDEX-System besteht aus zwei Hauptkomponenten, der eigentlichen probenverarbeitenden Hardware und einem Rechner auf dem die Imagingsoftware und Hardwaresteuerung betrieben wird. Der probenverarbeitende Teil setzt sich aus einem Mikroskop, in das eine Durchfluss-Zählkammer eingebaut ist, einer CCD-Kamera für die Bildaufnahme und einer Spritze für die Probenmischung zusammen. Zusätzlich werden Gefäße für die Reagenzien und den Abfall bereitgestellt. Ein schematisches Blockbild ist in Abbildung 2.14, Seite 36, dargestellt.

Eine in das System eingesetzte Probe vom Volumen 1 ml wird automatisch im Verhältnis 1:2 mit einer 0,2-prozentigen Trypanblaulösung in physiologischem Puffer versetzt und gründlich gemischt. Diese Zellsuspension wird durch die Durchfluss-Zählkammer gepumpt, dabei werden bis zu maximal 33 Bilder von der Kamera aufgenommen. Die Anzahl der toten und lebenden Zellen wird durch Bildverarbeitung (Pattern Recognition) auf Grund von zum Beispiel Größe des Objekts, Form, Randbegrenzung und Intensität der Färbung ermittelt. Danach wird die korrespondierende Zelldichte ausgerechnet. Das Ergebnis der Messung wird auf dem Bildschirm ausgegeben. Es kann jedes einzelne Bild betrachtet und die auf ihm durchgeführte automatische Auswertung angesehen werden. Sollte es einmal dazu kommen, dass eine Zelllinie nicht korrekt von der Bildverarbeitung ausgewertet werden kann, ist es möglich die Parameter für die Zellerkennung anzupassen. Für jede Messung wird die Standardabweichung, auf denen der Auswertung zu Grunde liegenden Einzelmessungen, ermittelt.



Abbildung 2.13: Das automatische Zellzählgerät CEDEX. Im Bild erkennbar sind die Spritze für die Probenaufbereitung, die automatische Probenzuführung (AS20), und die Reagenzgefäße.

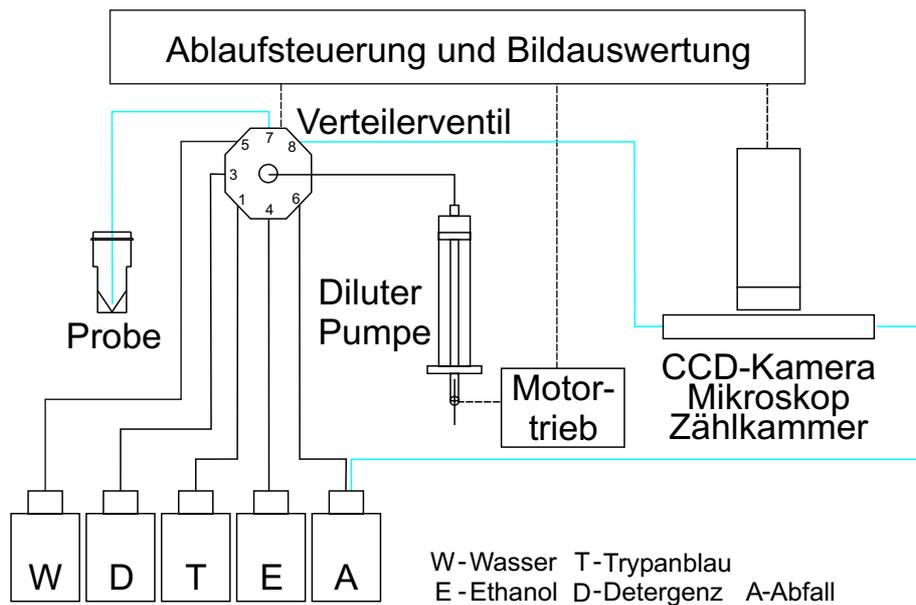


Abbildung 2.14: Schematisches Blockbild des CEDEX-Systems. In der Abbildung dargestellt sind die Reagenzien, die Spritze zur Mischung, die Probe, die Zählkammer mit der Bildauswertung und sehr vereinfacht die Ansteuerung der Komponenten.

2.8.1 Programmierung

Herstellerseitig werden für eine Fernsteuerung des CEDEX-Systems über das Netzwerk Befehle angeboten, die weitestgehend der manuellen Bedienung entsprechen. Diese Befehle werden dem System im ASCII-Format über das TCP/IP-Protokoll auf dem Standard-Telnetport (23) an das System übermittelt. Eine gleichzeitige Verwendung der Fernsteuerung und des Probenkarussells war nicht vorgesehen, daher existieren im CEDEX-Befehlssatz keine Befehle zur Ansteuerung dieses Systems. Das AS20 wird über eine zusätzliche serielle Schnittstelle mit einem separaten ASCII-Befehlssatz angesteuert. Während einer Fernsteuerung des CEDEX ist die Bedienoberfläche für alle anderen Benutzer gesperrt. Die Implementierung der Integration von AS20 und CEDEX-Fernsteuerung in das Gesamtsystem waren Teil der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren mussten die Kommunikationsstrukturen in das Laborprogramm eingepasst werden.

Im Folgenden sind einige der Funktionen für die Fernsteuerung des CEDEX-Systems aufgeführt. Zum Teil wurden mehrere Befehle aus der Herstellerbibliothek zusammengefasst.

- Login - Die Funktion meldet einen User mit dem Namen 'roboter' und dem zugehörigen Passwort beim CEDEX an. Wird diese Funktion nicht als erste erfolgreich durchgeführt, dann können keine ferngesteuerten Aktionen des CEDEX ausgeführt werden.

- PrepareAnalysis - Aus der Datenbank wird die Bezeichnung der Kultivierung, für welche die aktuelle Probenentnahme durchgeführt wird, ausgelesen. Dieser Wert wird als *ReaktorID* an das CEDEX übergeben und dadurch die nächste *SampleID* festgelegt. Alle anderen Standardeinstellungen werden nicht verändert.
- StartAnalysis - Nach Setzen aller notwendigen Parameter wird die Analyse gestartet.
- GetResults - Abrufen der durch eine Analyse ermittelten Ergebnisse. Die Werte werden zum einen an die Datenbank übergeben und zum anderen in Variablen gespeichert.
- Logout - Das Laborsteuerungsprogramm meldet sich beim CEDEX ab und gibt das Gerät wieder für andere Benutzer frei.

Während sich das System im Fernsteuerungsmodus befindet können nur technische Fehler, wie zum Beispiel der Ausfall des Bildsignals, detektiert werden. Es sind keine Detektoren für den Füllstand der Reagenzienbehälter vorgesehen, dieses wäre aber einfach nachrüstbar. Ein anderes Problem, das sich nicht so leicht beheben lässt ist Luft im System, blockierte Kapillaren oder eine Verunreinigung der Zählkammer. Eine gleichbleibende Verunreinigung der Zählkammer kann vom System detektiert werden, da vor dem Start einer Messung eine optische Kontrolle des Kammerbildes durchgeführt wird. Tritt eine Verunreinigung wie zum Beispiel Luft im System erst nach dieser Kontrolle auf, dann gibt es keine zusätzliche Fehlermeldung. Eine prinzipielle Möglichkeit zur Detektion dieses Problems besteht in der Auswertung der Anzahl der aufgenommenen Bilder im Vergleich mit der Anzahl der für die Berechnung des Ergebnisses verwendeten Bilder. Die Abfrage der Anzahl der verworfenen Bilder ist vom Hersteller nicht vorgesehen. Auf diese Art erhält man durch die geringere Zahl von Bildern einen Hinweis darauf, dass bei einer Messung etwas nicht stimmen könnte.

2.8.2 Probenkarussell AS20

Das Probenkarussell besteht aus zwei zusammenarbeitenden mechanischen Grundkomponenten. Die einzelnen Probengefäße werden in eine drehbare Lochscheibe (Rotor) eingesetzt und auf die Grundposition gebracht. Von dort werden sie durch eine Hebevorrichtung (Lift) auf die richtige Position für die Probenaufnahme durch das CEDEX gebracht.

Die Programmstruktur des CEDEX erlaubt es nicht, dass über das von Hersteller bereitgestellte Schnittstellenprotokoll Mikroskop und Autosampler gleichzeitig ferngesteuert werden können. Daher war es notwendig ein Modul für den Zugriff auf das AS20 zu programmieren. Über dieses Modul kann ein Benutzer den Autosampler in die korrekten Zustände für das Beladen oder die Messung setzen. Bei der Bedienung ist darauf zu achten, dass ein gleichzeitiger Zugriff des Benutzermoduls für das AS20 und das Laborsteuerungsprogramm zu verhindern ist. Die Zugriffssteuerung wird über einen Eintrag in

der Datenbank INFOBASE geregelt. Jeder potentielle Klient trägt seine PID beziehungsweise seinen Namen für die Dauer des Zugriffs in die Datenbank ein. Dadurch wird anderen Klienten mitgeteilt, dass das Gerät in Benutzung ist. Nach einem unspezifischen Abbruch des Programms kann unterschieden werden welcher Klient als letztes die Priorität hatte, und ob die Aktion noch aktuell ist.

Die Ansteuerung des AS20 erfolgt über eine serielle Schnittstelle mit einer vom Hersteller bereitgestellten Befehlsbibliothek. Diese Bibliothek enthält Befehle zum Ansteuern und Abfragen der untergeordneten Hardwarekomponenten sowie gerätespezifischer Parameter. Die Programmierung der Anwendung der vorgegebenen Hardwarebefehle und ihre Zusammenfassung in für den Roboterbetrieb nutzbare Befehlssequenzen war Teil der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden sind einige der vorgegebenen Hardwarebefehle aufgeführt:

- Ausführen einer Initialisierungsbewegung
- Rotorposition abfragen
- Liftposition abfragen
- Status abfragen
- Rotor auf bestimmte Position setzen
- Lift auf bestimmte Position setzen

Diese Befehle sind auf der übergeordneten Ebene zu folgenden Befehlen zusammengefasst, die für die Bedienung durch den Roboter notwendig sind:

- AS20 für die Be- oder Entladung durch den Roboter vorbereiten
- AS20 für den Start einer Messung vorbereiten

2.9 Weitere Roboterhilfen

2.9.1 Barcodescanner

Hardware

Es wird das Modell DS1100 von Datalogic eingesetzt. Dieses Gerät wurde speziell zur einfachen Integration in Anwendungssysteme entwickelt. Der DS1100 bietet kompakte Abmessungen, ist ausgesprochen leicht und verfügt über eine gute Leseleistung. Das Gerät ist mit direktem und 90° versetztem Strahlaustritt erhältlich, so dass eine flexible Installation ermöglicht wird. Abbildung 2.15, Seite 39, zeigt den Barcodescanner mit zwei markierten Gefäßen.

Der DS1100 deckt einen großen Lesebereich ab, das heißt das Gerät liest nahe am Strahlaustrittsfenster und garantiert auch bei hoch auflösenden Codes eine gute Leselei-



Abbildung 2.15: Barcodescanner mit zwei markierten Gefäßen. Der rote gerasterte Laserstrahl ist im Bild erkennbar.

stung. Weiterhin hat dieses Gerät hohe Leseraten und eine hohe Lesesicherheit selbst bei beschädigten oder schlecht gedruckten Strichcodes.

Bei der hier eingesetzten Variante des DS1100 handelt es sich um den DS1100-1111 mit Standardauflösung, neunfach-Raster (R1) und 90° Strahlenausritt. Weitere technische Daten sind im Folgenden aufgeführt:

- Spannungsversorgung 5 V_{DC}
- Leistungsaufnahme 2 W
- Lichtquelle Laserdiode 650 nm (Laserklasse 2)
- Abtastrate 350 scans·s⁻¹
- Multi-Label-Reading
- Schnittstellen RS 232 und RS 485 halbduplex
- staubdicht und strahlwassergeschützt (IP65)
- 0 °C bis 45 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit nicht kondensierend

Die für den Betrieb notwendige Spannung wird über ein Netzteil umgewandelt und dem Barcodescanner zusammen mit den Datenleitungen zugeführt.

Programmierung

Für die Programmierung unter Windows steht die Firmware WINHOST zur Verfügung, es besteht aber auch die Möglichkeit Steuercodes direkt auf die serielle Schnittstelle zu schreiben und somit eine Ansteuerung von jedem beliebigem Betriebssystem zu erreichen. Die Implementierung der Kommunikation mit dem Gerät und die Integration in das System waren Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Für die Nutzung des Gerätes außerhalb des Gesamtsystems wurde eine Fensteroberfläche erstellt. Die Ansteuerung des Gerätes erfolgt über die serielle Schnittstelle RS 232. Es gibt eine ganze Reihe von Parametern, die über die sogenannte *Host Mode Programmierung* eingestellt werden können:

- Code Setup Parameter
- Main Interface Parameter
- Data Format Parameter
- Operating Mode Parameter
- Reading Parameter



Abbildung 2.16: Beispiel eines Barcodes. Die begrenzenden Sternchen und die Prüfziffer (B) sind im Textfeld mit dargestellt

Dieses sind nur einige der übergeordneten Parameter, zu denen weitere untergeordnete Parameter mit verschiedenen Einstellmöglichkeiten gehören. Die letzteren Parameter werden hier nicht aufgeführt, da sie für den Einsatz im hier vorgestellten System keine Bedeutung haben.

Codierung

Für die Codierung der Probenröhrchen wurde der Code39 ausgewählt. Die Länge des Codes ist variabel und seine Struktur besteht aus einer Reihe von Zeichen, die von einem Prüfzeichen beendet wird. Der Code wird am Anfang und am Ende der Zeichenfolge vom Zeichen '*' begrenzt. Es dürfen die folgenden Zeichen im Code enthalten sein:

- Ziffern 0 bis 9
- Zeichen A-Z
- \$, %, +, -, ., /, Leerzeichen

Durch diese erlaubten Zeichen eignet sich der Code gut für eine Beschriftung im Zeichen/Nummernsystem und kann direkt vom Bediener gelesen beziehungsweise aufgeschrieben werden. In Abbildung 2.16, Seite 41, ist beispielhaft ein Barcode dargestellt.

2.9.2 Zentrifuge

Hardware

Bei der Zentrifuge handelt es sich um eine handelsübliche Laborzentrifuge einfacher Bauart (MEGAFUGE 1.0, Kendro, Osterode, Deutschland). Bei diesem Gerät kann nur die Zentrifugationszeit und die Drehgeschwindigkeit beziehungsweise Zentrifugalbeschleunigung eingestellt werden.

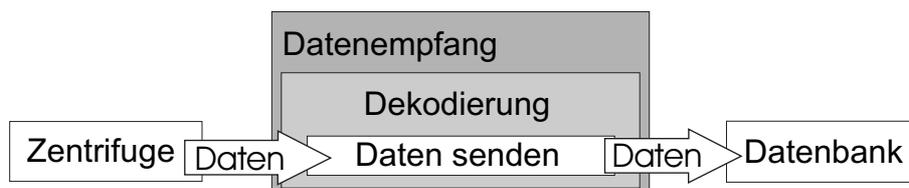


Abbildung 2.17: Datenübermittlung der Zentrifuge

Für die spätere Überprüfbarkeit einer Zentrifugation muss aber eine Protokollierung der tatsächlichen Zentrifugationszeit und Zentrifugationsgeschwindigkeit erfolgen. Aus diesem Grund wurde die Zentrifuge um eine Interfaceplatine erweitert. Auf dieser Platine befindet sich eine passive serielle Schnittstelle und ein open-Kollektor-Ausgang. Über die Schnittstelle kann der aktuelle Zustand der Drehzahl und die eingestellte Laufzeit ermittelt werden. Zusätzlich wird bei Stillstand des Rotors angezeigt, ob der Deckel der Zentrifuge geschlossen oder geöffnet ist. Der open-Kollektor-Ausgang bietet eine zusätzliche Möglichkeit für die Detektion des Deckelzustands, so dass für bestimmte Anwendungen auf ein Auslesen der Schnittstelle verzichtet werden kann.

Programmierung

Die Kommunikation mit der Zentrifuge erfolgt über eine passive RS 232 Schnittstelle, das heißt es können Daten gelesen aber nicht geschrieben werden. Über ein, während dieser Arbeit entwickeltes, Software-Tool werden die von der Zentrifuge übermittelten Daten empfangen, dekodiert und an die Datenbank übermittelt. Aus der Datenbank können im Bedarfsfall die aktuellen Daten ausgelesen werden. In einem weiteren Parameter der Datenbank wird der erreichte Maximalwert gespeichert. Setzt man diesen Wert vor einer Zentrifugation zurück kann man durch erneutes Auslesen des Wertes nach der Zentrifugation überprüfen, ob die korrekte Drehzahl erreicht wurde. Abbildung 2.17 auf Seite 42, zeigt ein Schema der Datenübertragung der Zentrifuge.

Die Parameter und das Protokoll der Schnittstelle können hier auf Grund einer Geheimhaltungsverpflichtung durch den Hersteller nicht offen gelegt werden.

2.9.3 Prozessleitsystem (MFCS)

Bei dem verwendeten Prozessleitsystem handelt es sich um das Multi Fermenter Control System (MFCS) in der Version 2.0 von B. Braun International (Melsungen, Deutschland). Es können bis zu 16 Bioreaktoreinheiten (Process Units) an das System angeschlossen beziehungsweise konfiguriert werden. Die Bioreaktoren können direkt über die den Reaktor kontrollierende DCU (Digital Control Unit) an das System angeschlossen werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit analoge oder digitale Daten über ein zusätzliches Interface (FIS, Fermentation Interface System) in das System einzuspeisen.

Das MFCS dient im Allgemeinen zur kompletten Prozesssteuerung. Es können Bioreaktoren mit dem System verbunden und danach mit MFCS-internen Reglern betrieben werden. In dem hier vorliegenden Fall werden diese Möglichkeiten nicht genutzt und das System wird nur zur Datenaufzeichnung und Datensicherung genutzt. Aktuelle kontinuierlich gemessene Werte (online Daten) werden automatisch an das System übertragen und entsprechend den Voreinstellungen regelmäßig abgespeichert. Punktuell ermittelte Werte (offline Daten) wie zum Beispiel Zelldichte, Viabilität, Substrat- und Produktkonzentration, die nach einer Probenentnahme ermittelt wurden, werden dem System manuell durch eine spezielle Dateneingabemaske übermittelt.

Programmierung

Zur Übertragung der Ergebnisse der automatischen Probenentnahme und Probenanalyse musste ein Weg gefunden werden der den Zugriff auf die vom MFCS verwalteten Daten erlaubt. Dabei war die Einhaltung der Vorschriften für die Datensicherung und Vermeidung von Datenmanipulationen ein wichtiger Punkt, der bei der Strukturierung dieser Aufgabe berücksichtigt werden musste. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten,

- Zugriff auf eine Microsoft Access-Datenbank, Speicherung der Daten erfolgt als offline Werte
- Zugriff auf den Memory Resident Datapool, Speicherung der Daten erfolgt als online Werte

Die Einbindung in das offline Datensystem wäre die naheliegende Variante gewesen hätte allerdings einen weit größeren Aufwand in der Programmierung auf der Windowsebene bedeutet. Dieses hätte möglicherweise eine kontinuierliche Pflege der Programmteile mit den Versionsänderungen des Programms Access bedeutet. Die durchgeführte Einbindung der Daten erfolgt als online Variable im Memory Resident Datapool (MRD), das heißt die später im Diagramm entstehende Kurve wird als Treppenfunktion abgebildet. Diese Treppenfunktion entsteht dadurch, dass die Werte im Speicher abgelegt wurden und bis zur nächsten Probenentnahme konstant bleiben.

Die Anbindung des Laborsteuerprogramms (Device Control System, DCS) an das Prozessleitsystem MFCS wird über einen Server/Klienten Prozess durchgeführt. Der Server Prozess (QNXTransfer) bleibt solange inaktiv bis das DCS eine Anfrage zur Datenübertragung stellt. Der Server QNXTransfer nimmt die Daten an und leitet sie an den MRD des MFCS weiter, Abbildung 2.18 auf Seite 44. Es wurde zusätzlich auch die Möglichkeit Daten aus dem MFCS zu lesen programmiert, aber zur Zeit wird diese Möglichkeit im Gesamtsystem nicht angewendet. Die Kommunikation zwischen dem DCS und MFCS beruht auf der Verwendung von TCP/IP Verbindungen. Die für die einfache Einbindung der TCP/IP Kommunikation notwendige Klasse wurde von Torsten Scherer während seiner Dissertation programmiert. Die weiterführende Einbindung war Bestandteil der hier vorlie-

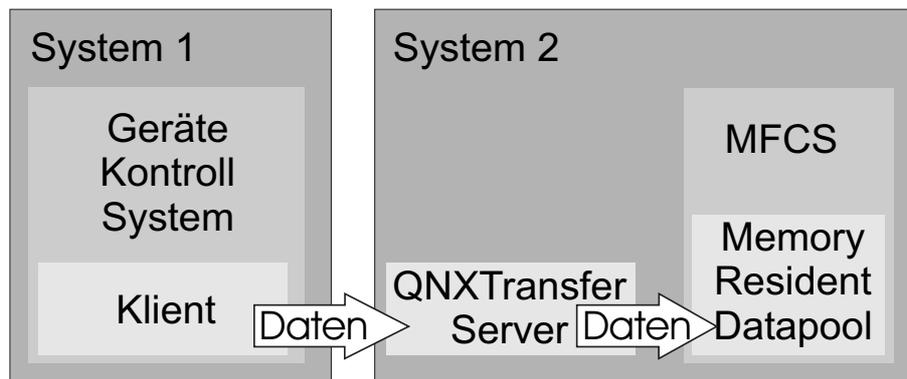


Abbildung 2.18: Datenübertragung an das MFCS. Die Datenübertragung an das MFCS erfolgt über den Server QNXTransfer, der auf demselben Rechner wie das MFCS läuft. Wird vom Klienten eine Datenübertragungsanfrage gestartet, dann wird das Programm aktiv, nimmt die Daten entgegen und schreibt sie in den MRD.

genden Arbeit und beruht auf einer von B. Braun International (Melsungen, Deutschland) zur Verfügung gestellten Befehlsbibliothek.

Variablen, auf die mit QNXTransfer zugegriffen werden soll, müssen im *Configuration Management* des MFCS als *Cyclic Variable* deklariert sein. Variablen, die von QNXTransfer nur geschrieben werden, besitzen keine *Control Unit*. Variablen, die auch gelesen werden sollen, können entweder keine oder den *Calculation Manager* als Control Unit besitzen. Siehe dazu Abbildungen 2.19, Seite 45, und 2.20, Seite 46.

Die Datenübertragung läuft auch dann ohne Fehlermeldung ab, wenn keine Datenaufzeichnung aktiv ist. Die eingeführte Variable *Calc_Time* bietet eine Möglichkeit herauszufinden, ob auf dem MFCS die Datenspeicherung für eine bestimmte Process Unit aktiv ist. In dieser Variablen steht ein Wert, der dem aus der Systemvariablen *_BatchAge* entspricht. Wenn dieser Wert kleiner als die maximal mögliche Intergerzahl des Systems ist, dann entspricht der Wert der aktuellen Zeit der Datenaufzeichnung. Das wiederum bedeutet, dass im MFCS ein Prozess gestartet ist und die Werte aufgezeichnet werden. Damit es möglich ist, auf die oben genannten Variablen zuzugreifen, muss bei der Aktivierung des Batches im MFCS die Berechnung der Variablen aktiviert werden. Für die Aktivierung der Berechnung muss im Fenster *Batch Setup* die Option *Calculations* ausgewählt sein, des Weiteren muss *Calc_Time* auch bei *Select Calculations* ausgewählt werden. Die jeweiligen Fenster sind in Abbildung 2.21, Seite 46, dargestellt.

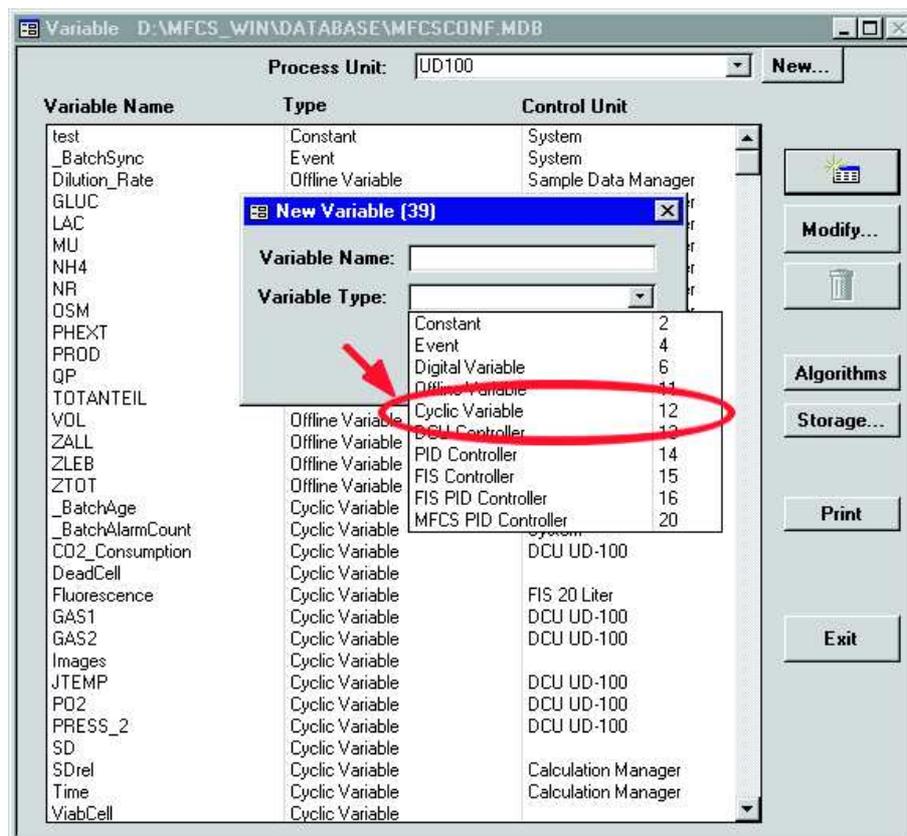


Abbildung 2.19: Konfiguration der Variablen einer Process Unit. Variablen auf die mit QNXTransfer zugegriffen werden soll, müssen im Configuration Management als Cyclic Variable deklariert sein.

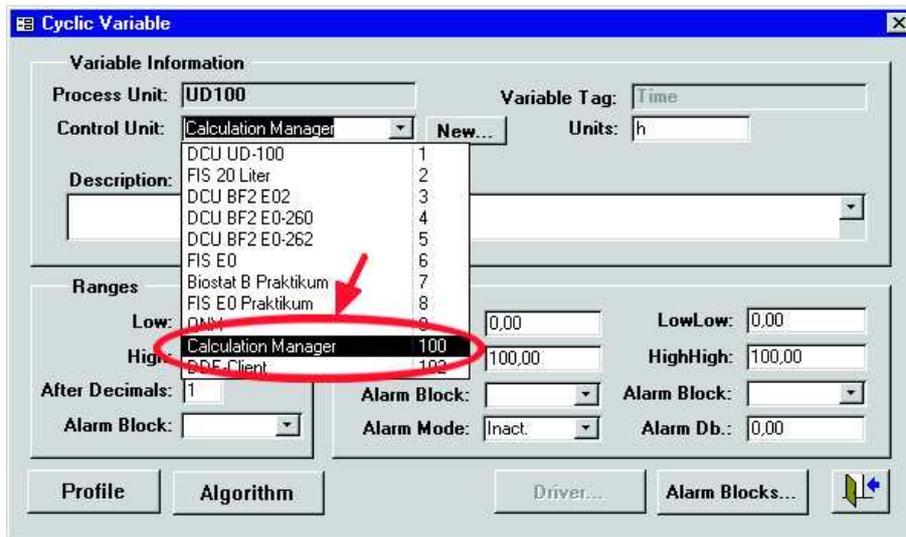


Abbildung 2.20: Konfiguration einer zyklischen Variable. Variablen auf die mit QNXTransfer zugegriffen werden soll, dürfen entweder keine oder den Calculation Manager als Control Unit besitzen.

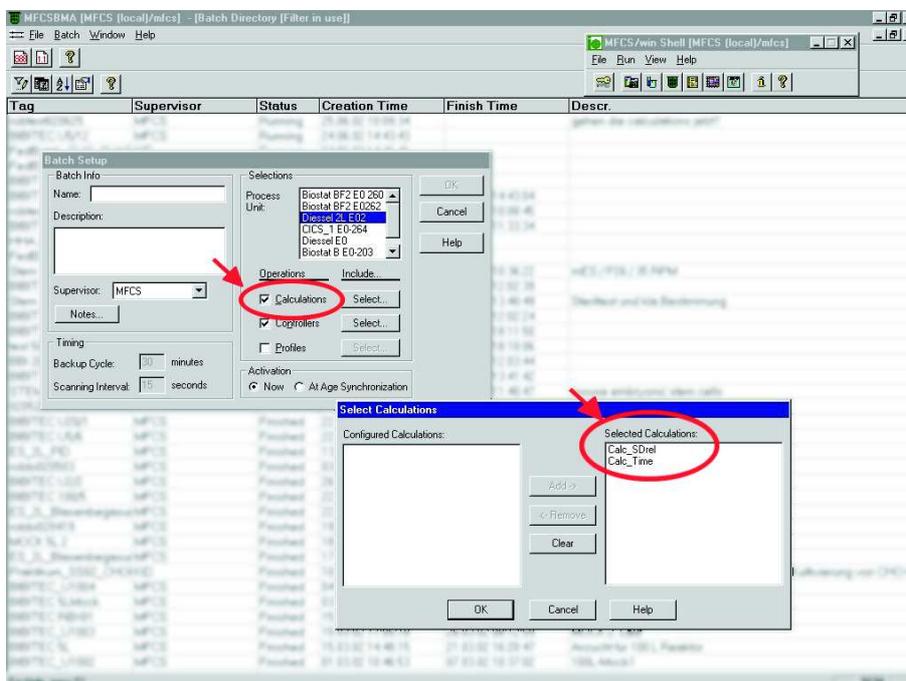


Abbildung 2.21: Notwendige Batch Einstellungen. Für die Verwendung von Variablen, die auf Werte zugreifen, die dem MFCS durch QNXTransfer übergeben werden, müssen die gezeigten Einstellungen vorgenommen werden.

Kapitel 3

Autonomer mobiler Roboter

Der autonome Roboter bewegt sich durch das Laboratorium und führt verschiedene Aufgaben aus. Dabei muss er den Weg zu den Objekten finden, ohne mit Laborgeräten oder Personal zu kollidieren. Die dabei befahrenen Strecken sind nicht fest vorgegeben, sondern werden je nach Ausgangs- und Zielpunkt berechnet. Zur Vereinfachung dieser Berechnung existiert eine Karte des Labors in dem feste Hindernisse eingetragen sind. Die Kollision mit beweglichen Objekten muss vom System aktiv verhindert werden. Unter anderem ist die Plattform zu diesem Zweck mit zwei Laserscannern ausgestattet. Während der Bewegung der Plattform befindet sich der Roboterarm in einer Parkposition. Eine Übersicht des Labors mit den verschiedenen Geräten ist in Abbildung 3.1, Seite 48, gezeigt. Die Programmierung und Bewertung von Roboter und autonomer Plattform, mit der dazugehörigen Bildverarbeitung sowie Ansteuerung der Sensoren und Aktoren wurde während der Dissertation von Torsten Scherer [Scherer, 2004] durchgeführt.

Nach Erreichen der Zielposition wird der Roboterarm in die Grundposition für die nächste Manipulation bewegt. Dort wird mit der am Greifer befestigten Kamera ein Bild aufgenommen. Bei fehlerfreier Durchführung der Positionierungen von Plattform und Arm befindet sich im Zentrum des Bildes eine Markierung. Jedes der Geräte und Objekte im Probenmanagement besitzt eine unterschiedliche farbige Markierung, durch die das jeweilige Gerät von den Anderen unterschieden werden kann. Die Markierungen sind aus blauen, roten und gelben Regionen aufgebaut. Die Bildverarbeitungssoftware erkennt die Markierung sowie ihre Position und Orientierung; gegebenenfalls können Korrekturen der Positionierung durchgeführt werden. Danach wird die Manipulation durchgeführt und der Roboterarm in die Parkposition zurück bewegt. Die Bestimmung von Position und Ausrichtung der Markierung beziehungsweise des Gerätes ist von grundlegender Wichtigkeit, da eine 100 %ige Positionierung der mobilen Plattform nicht möglich ist, und daher keine „blinde“ Greifbewegung durchgeführt werden kann, die gewährleistet, dass das Objekt sicher gegriffen werden kann.

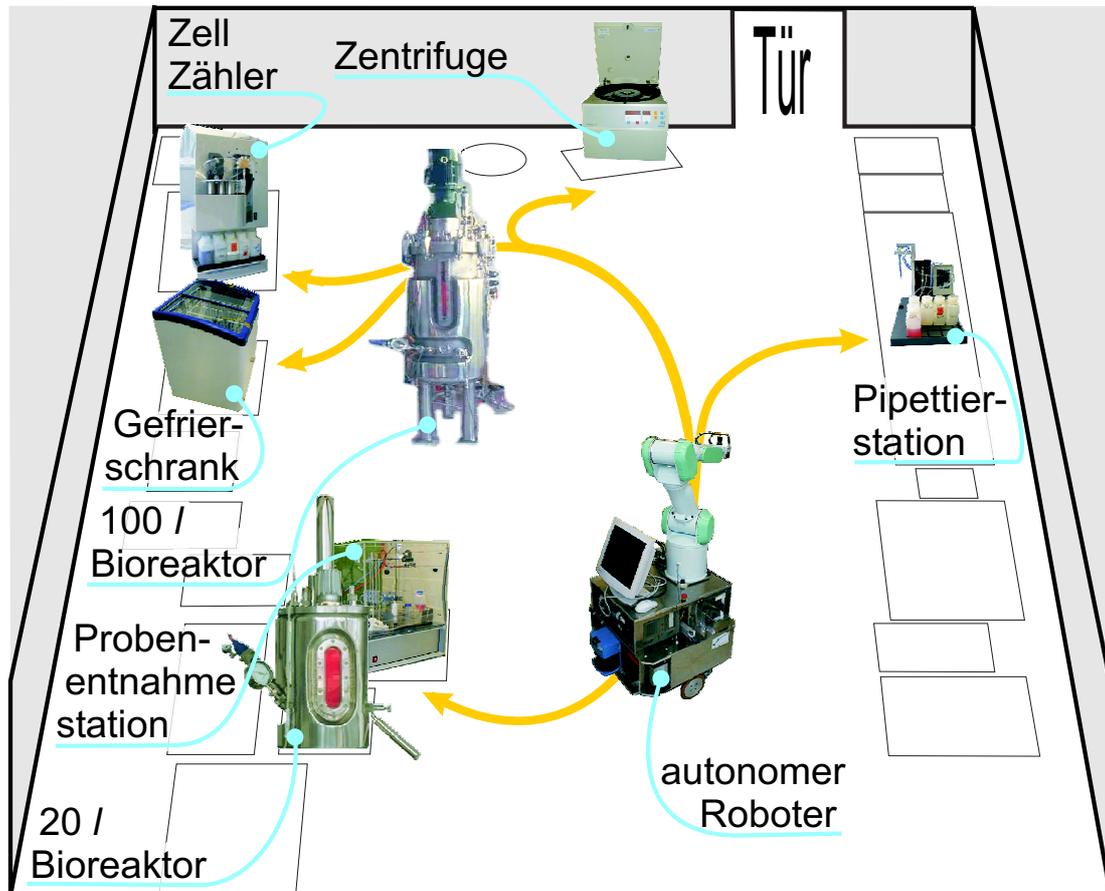


Abbildung 3.1: Übersicht des Aktionsraumes des autonomen Roboters. Der Roboter bewegt sich autonom durch das Labor. Die Berechnung einer Bewegung zwischen Start- und Zielposition erfolgt für jede Fahrt erneut. Nach Erreichen der Zielposition werden die notwendigen Manipulationen am Objekt ausgeführt.

3.1 Ansteuerung

Die Ansteuerung des Gesamtsystems erfolgt unter dem Betriebssystem Linux. Die Steuerung des Roboterarms, das heißt die Bahnplanung für Positionierbewegungen und die Ansteuerung der einzelnen Gelenke, erfolgt mit der Software RCCL (Robot Control C-Library). Die Sensoren und Aktoren des Roboters (Kamera, Kraft/Momentensensor und Greifer) sowie die mobile Plattform werden über selbst geschriebene und implementierte Programmbibliotheken angesteuert. Dabei werden die Daten des vorderen und hinteren Laserscanners direkt über die Schnittstellen abgefragt. Die Steuerbefehle für die Antriebsräder werden ebenso direkt an die Motorregler übertragen.

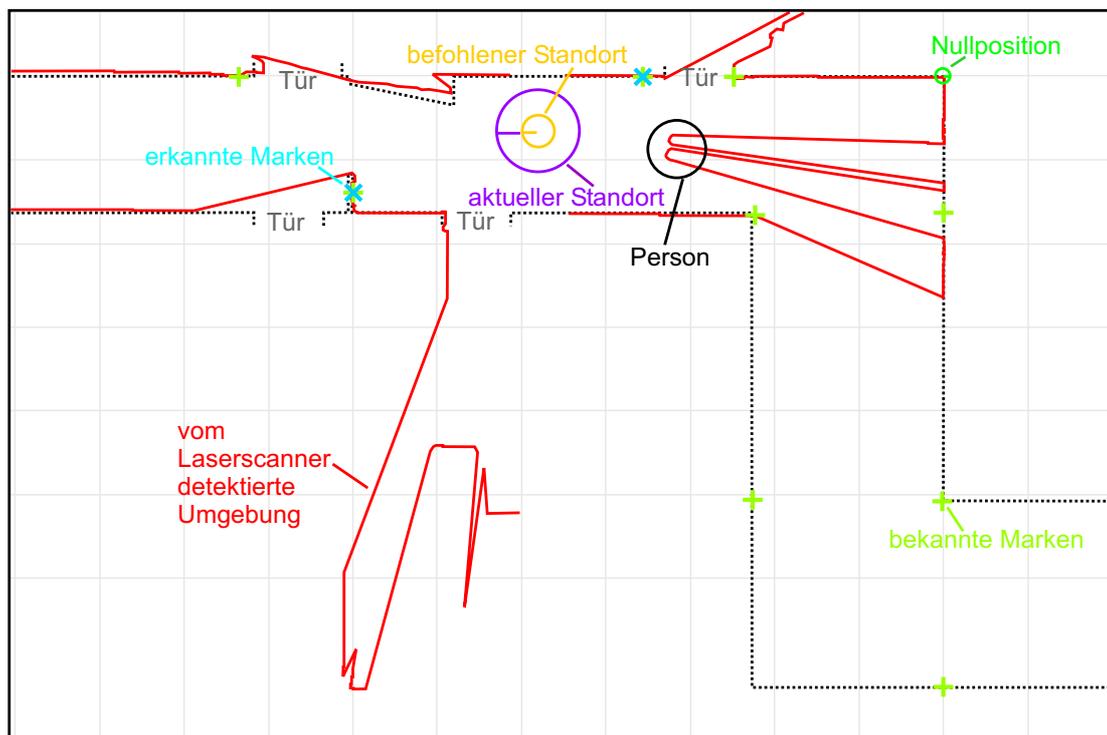


Abbildung 3.2: Navigation des autonomen Roboters im Labor. Der autonome Roboter steht mit der Vorderseite nach links, dahinter befindet sich ein Person. Die im Labor angebrachten Markierungen sind in der Karte als senkrechte grüne Kreuze dargestellt. Die durch den Laserscanner detektierten Markierungen erscheinen als diagonale Kreuze in blau.

3.2 Navigation

Die Bewegungssteuerung beziehungsweise Navigation der Plattform erfolgt durch Odometrie, das heißt, die Position der Plattform wird aus den Bewegungen der Antriebsräder berechnet. Bei dieser Form der Lokalisation kann es zum Beispiel durch Schlupf der Antriebsräder oder Messungenauigkeiten der Radumfänge sehr leicht zu Positionsfehlern kommen. Daher wird die Position der Plattform mit den beiden Laserscannern in Bezug auf die Umgebung überprüft und kann gegebenenfalls korrigiert werden. Zu diesem Zweck sind im Laboratorium retroreflektierende Markierungen angebracht. Diese Markierungen werden durch den Grad der Reflexion vom Laserscanner erkannt. Die Position der Markierungen ist in einer Karte des Labors vermerkt, so dass über einen Vergleich von tatsächlicher und theoretischer Position ein Positionierfehler detektiert und korrigiert werden kann. Des Weiteren dienen die Laserscanner zur Hinderniserkennung und Kollisionsvermeidung. Die Umgebungserkennung ist in Abbildung 3.2, Seite 49, dargestellt.

3.3 Bildverarbeitung

Nach Erreichen der Zielposition der autonomen Plattform, wird der Roboterarm auf die Grundstellung für die nächste Manipulation bewegt. Mit der Kamera wird eine Aufnahme, in der die Markierung des Gerätes sichtbar ist, gemacht. In Abbildung 3.3 auf Seite 50 ist ein Teil der zur Berechnung gehörenden Schritte dargestellt. Danach werden in dieser Aufnahme blaue, rote und gelbe Regionen gesucht und deren Schwerpunkt bestimmt. Im Idealfall werden nur die zur Markierung gehörenden Regionen detektiert. Es erfolgt eine

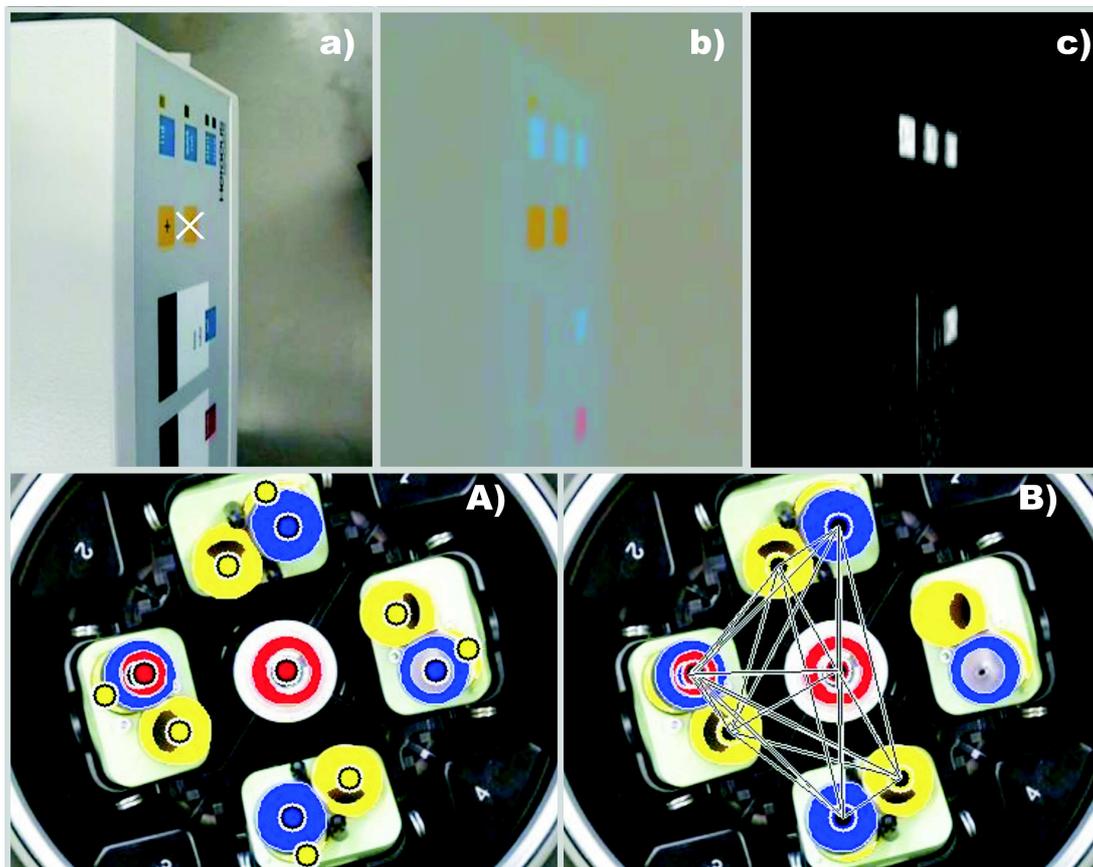


Abbildung 3.3: Bildverarbeitung des autonomen Roboters. In der Bildsequenz a) bis c) ist die Ermittlung von blauen Farbregionen dargestellt. Bild a) zeigt die Originalaufnahme, b) eine Aufnahme in der alle Bildpixel die gleiche Sättigung besitzen und in c) sind alle Pixel, die einem Blauton entsprechen hell dargestellt. Die Ermittlung der anders farbigen Regionen erfolgt auf gleiche Weise. In Bild A) sind die Schwerpunkte von blauen, roten und gelben Regionen markiert. B) zeigt für einen Teil der in A) markierten Regionen eine beispielhafte Berechnung der Lage verschiedener Regionen zueinander, mit deren Hilfe zum Beispiel die Orientierung des Roboters zum Objekt bestimmt werden kann. Nach Korrektur der Orientierung kann die Greifbewegung durchgeführt werden.

Vergleichsberechnung zwischen den in der Aufnahme erkannten Regionen und jenen, die für die jeweiligen Geräte (Modelle) bekannt sind. Das Ergebnis dieser Berechnung ist zum einen ein Wert, der die Übereinstimmung mit dem bekannten Modell angibt. Zum anderen die Verschiebung beziehungsweise Rotation gegenüber dem Modell. Gegebenenfalls wird die Positionierung des Greifers korrigiert. Danach wird die Position ein weiteres Mal überprüft, und wenn die Position des Greifers korrekt ist, wird mit der Manipulation begonnen. Werden zusätzliche, nicht zum Modell gehörige, Regionen erkannt, dann werden die Berechnungen lediglich für eine größere Datenmenge durchgeführt.

3.4 Objektmanipulation

Die Manipulation der Objekte erfolgt mit einem elektrischen Greifer. Die Parallelbacken eines elektrischen Greifers schließen sich langsamer und daher kontrollierter als solche eines pneumatischen Greifers. Zusätzlich wird bei vielen Bewegungen, während denen Objekte manipuliert werden, auf die Daten des Kraft/Momentensensors zugegriffen. Ein wichtiges Beispiel ist das Öffnen und Schließen der Zentrifuge. Die Betätigung der Knöpfe zum Öffnen des Deckels und die Überprüfung des korrekten Einrasten des Deckels basiert auf den Daten des Kraft/Momentensensors. Auch das Absetzen der Röhrchen in den Halterungen wird mit dem Kraft/Momentensensors durchgeführt.

3.5 Laboreinsatz

Das Gesamtsystem wurde in mehreren Kultivierungen in verschiedensten Situationen eingesetzt. Die Durchführung der Aufgaben gelang tagsüber mit Sonneneinstrahlung sowie nachts bei Kunstlicht. Mehrere Probenentnahmen wurden nacheinander automatisch gestartet und autonom durchgeführt. Die Bearbeitung der Proben, das Einfrieren der Überstände sowie Speichern der Daten wurde korrekt durchgeführt. Am nächsten Tag konnten die durchgeführten Aktionen in der Protokolldatei überprüft werden. Ein Beispielprotokoll ist in Tabelle 3.1, Seite 52, gezeigt. Ein Film, in dem das durch den Roboter ausgeführte Probenmanagement gezeigt wird, befindet sich unter:

- http://www.techfak.uni-bielefeld.de/ags/zellkult/rob2004_med.mpg (137 MB)

beziehungsweise

- http://www.techfak.uni-bielefeld.de/ags/zellkult/rob2004_low.mpg (90 MB).

Tabelle 3.1: Protokolldatei einer Probenentnahme. Anfangs- und Endzeit sowie die Bezeichnung der jeweiligen Aktion sind vermerkt. Zusätzlich werden eventuelle Parameter beziehungsweise ermittelte Daten aufgezeichnet.

```

Mon Mar 24 22:24:01 2003
*****
Die Befehlssequenz beginnt jetzt...
*****

RoboterChargerWeg      Mon Mar 24 22:24:01 2003
VorbereitenCedex      Mon Mar 24 22:24:08 2003
AltesCupCedex         Mon Mar 24 22:24:32 2003
RoboterCedexAbfall    Mon Mar 24 22:24:32 2003
RoboterVorratProbe    Mon Mar 24 22:26:34 2003
RoboterReaktorWarten  Mon Mar 24 22:27:42 2003
Reaktor1Entnahme      Mon Mar 24 22:28:51 2003
Wartezeit             Mon Mar 24 22:30:26 2003
RoboterReaktorPipette Mon Mar 24 22:35:06 2003
PipettierenProbe      Mon Mar 24 22:36:45 2003
RoboterPipetteWeg     Mon Mar 24 22:38:31 2003
RoboterLadenZentrifuge Mon Mar 24 22:38:52 2003
RoboterCedexPipette   Mon Mar 24 22:40:53 2003
AusgebenProbe         Mon Mar 24 22:42:25 2003
RoboterPipetteCedex   Mon Mar 24 22:42:40 2003
StartenCedex          Mon Mar 24 22:44:08 2003
RoboterOeffnenTiefkuehl Mon Mar 24 22:44:37 2003
PipetteSpuelen2       Mon Mar 24 22:46:13 2003
FertigZentrifuge      Mon Mar 24 22:51:38 2003
RoboterZentrifugePipette Mon Mar 24 22:51:38 2003
PipettierenArchiv     Mon Mar 24 22:54:51 2003
RoboterPipetteAbfall  Mon Mar 24 22:55:13 2003
RoboterArchivPipette  Mon Mar 24 22:56:27 2003
AusgebenArchiv        Mon Mar 24 22:58:26 2003
RoboterArchivBarcode  Mon Mar 24 22:58:40 2003
StartenBarcode        Mon Mar 24 22:59:20 2003
RoboterBarcodeWeg     Mon Mar 24 22:59:23 2003
RoboterTiefkuehlUndZu Mon Mar 24 22:59:34 2003
ErgebnisCedex        Mon Mar 24 23:01:46 2003

ErgebnisMFCS         Mon Mar 24 23:01:59 2003

RoboterChargerHin     Mon Mar 24 23:02:04 2003
PipetteSpuelen2       Mon Mar 24 23:02:39 2003
Mon Mar 24 23:08:05 2003

*****
Die Befehlssequenz wurde vollstaendig abgearbeitet!
*****

```

		rob030305 rob030305 R018	Mon Mar 24 22:24:08 2003
			Mon Mar 24 22:24:32 2003
			Mon Mar 24 22:24:32 2003
			Mon Mar 24 22:26:34 2003
			Mon Mar 24 22:27:42 2003
			Mon Mar 24 22:28:51 2003
			Mon Mar 24 22:30:26 2003
	280		Mon Mar 24 22:35:06 2003
			Mon Mar 24 22:36:45 2003
	Spuelen1		Mon Mar 24 22:38:31 2003
			Mon Mar 24 22:38:51 2003
			Mon Mar 24 22:40:53 2003
			Mon Mar 24 22:42:25 2003
	1.03		Mon Mar 24 22:42:40 2003
			Mon Mar 24 22:44:08 2003
		rob030305	Mon Mar 24 22:44:36 2003
			Mon Mar 24 22:46:13 2003
			Mon Mar 24 22:51:38 2003
	Zeit		Mon Mar 24 22:51:38 2003
			Mon Mar 24 22:54:51 2003
	2.5		Mon Mar 24 22:55:13 2003
			Mon Mar 24 22:56:27 2003
			Mon Mar 24 22:58:26 2003
	2.5		Mon Mar 24 22:58:40 2003
			Mon Mar 24 22:59:20 2003
	0226		Mon Mar 24 22:59:23 2003
			Mon Mar 24 22:59:34 2003
			Mon Mar 24 23:01:46 2003
		Probe:R018 Tot:2.17E+005 Lebend:9.41E+005 Viability:81.3 SD:1.42E+005 SDrel:15.09 Bilder:20	Mon Mar 24 23:01:59 2003
		Tot:2.17E+005 Lebend:9.41E+005 Viability:81.3 SD:1.42E+005 SDrel:15.09 Bilder:20 Barcode:226 Cedex:18	Mon Mar 24 23:02:04 2003
			Mon Mar 24 23:02:39 2003
			Mon Mar 24 23:08:05 2003

Kapitel 4

Roboterhilfen

Der Roboter soll die gleichen Handlungsabläufe durchführen, die auch bei einer manuellen Probenentnahme ausgeführt werden. Die Möglichkeiten den Roboter direkt mit Hilfsmitteln auszustatten sind begrenzt. Am Greifer des Roboters sind bereits ein Kraft/Momentensensor und die Kamera befestigt. Geräte wie zum Beispiel eine Handpipette könnten nur mit einem Spezialgreifer bedient werden. Für die Entnahme einer Probe aus einem Reaktor sind gegebenenfalls sogar zwei Arme notwendig. Nur ein unverhältnismäßig hoher Aufwand in der Roboterausstattung würde die Durchführung solcher Aufgaben ohne zusätzliche Hilfsmittel erlauben. Um daher die Arbeit des Roboters überhaupt zu ermöglichen beziehungsweise bestimmte Schritte zu erleichtern, werden sogenannte *Roboterhilfen* eingesetzt. Diese Roboterhilfen ermöglichen dem Roboter durch relativ einfache Bewegungsabläufe die gleichen Arbeiten zu erledigen wie ein Mensch. Die häufigsten Bewegungsabläufe, die durchgeführt werden sind: abstellen, hochheben oder halten eines Probenentnahmeröhrchens. Die Konstruktion der Roboterhilfen war daher darauf ausgelegt, durch die aufgeführten Bewegungen die notwendigen Aufgaben durchführbar zu machen.

4.1 Probenentnahmestation

Bei der manuellen Probenentnahme am Bioreaktor wird in den meisten Fällen ein Schraubventil geöffnet, ein Hebel oder anderer Mechanismus betätigt. Über einen Auslaufstutzen wird die Probe in einem Gefäß aufgefangen. Danach wird eine Sterilisationskappe oder Sterilisationshülse aufgesetzt und das System sterilisiert. Generell gibt es diese Ventile auch pneumatisch angesteuert, aber das Prinzip des Aufsatzes einer Sterilisationshülse bleibt bestehen. Dabei bleibt der Bioreaktor steril, die Probe jedoch nicht. Auch bei Verwendung von anspruchsvolleren Systemen wie zum Beispiel dem aerosolfreien HI CONTAINMENT-Probenentnahmesystem von Bioengineering (Wald, Schweiz), das die Entnahme einer sterilen Probe erlaubt, bleibt das Prinzip der manuellen Befestigung der Abdeckung für die Sterilisation bestehen. Diese manuelle Befestigung ist für den Roboter mit einem einfachen Greifer nicht direkt zu bedienen. Daher muss eine robotergerechte Lösung für das jeweils bestehende Probenentnahme-System entwickelt werden.

4.1.1 Bestehende automatisierte Lösungen

Die meisten automatischen Probenentnahmesysteme, die Proben aufbewahren und gegebenenfalls sogar kühlen, kommen aus der Abwasserüberwachung. Das PB 150 der Firma WTW (Weilheim, Deutschland) entnimmt einem Flüssigkeitsstrom regelmäßig Proben und füllt diese in Vorratsbehälter, dort erfolgt eine aktive Kühlung [WTW GmbH, 2004]. Ein sehr ähnliches Gerät wird von der Firma GIMAT (Polling, Deutschland) vertrieben [GIMAT Umweltmesstechnik, 2004]. Querkontamination von Proben haben bei diesen Systemen keine Bedeutung, so dass es höchstens einen Spülvorgang des Leitungssystems zwischen den Probenentnahmen gibt. Bei dem in dieser Arbeit gegebenen Einsatzbereich muss aber der Sterilität des Reaktors, aus dem die Probe entnommen wird, die höchste Priorität zugeordnet werden, so dass diese Systeme hier nicht eingesetzt werden können.

Einige weitere Probenentnahmesysteme dienen der schnellen Entnahme und Inaktivierung von Reihenproben, das heißt es werden zum Beispiel nach einer Glukosedosage pro Sekunde bis zu fünf Proben genommen, um danach die Dynamik der Metabolisierung zu untersuchen [Schaefer et al., 1999]. Bei diesem und ähnlichen Systemen handelt es sich aber um Eigenkonstruktionen für jeweils ein spezielles Projekt, die nicht käuflich erhältlich sind. Der Aufbau ist sehr ähnlich der während dieser Arbeit verwendeten und in Kapitel 2.6.1, ab Seite 20, beschriebenen Konstruktion. Über ein schaltbares Ventil wurden Proben in Gefäße mit 50 ml Inhalt gefüllt, die sich in Transportmagazinen befanden und über einen Zahnriemen weitertransportiert wurden. Dies ermöglicht die kontinuierliche Entnahme mehrerer Proben direkt nacheinander.

In einer weiteren Veröffentlichung [Sandeep et al., 1993] wurde die Probenentnahme auf einfachste Weise durchgeführt. Über einen 30 cm langen Schlauch wurde dem Reaktor eine Probe ohne weitere Sterilisation entnommen. Durch die häufige Probenentnahme, alle zwei Stunden oder häufiger, konnten selbst mobile Mikroorganismen die Strecke bis zum

Reaktor nicht überwinden. Nach mehreren Wochen wurde der Schlauch ausgetauscht, um zu verhindern, dass an der Wand haftende Mikroorganismen in den Reaktor einwachsen konnten. Beschrieben wird eine Prozessüberwachung einer Hybridom-Kultivierung in einer über diese Probenentnahmevorrichtung an eine HPLC angeschlossene mit 70 ml Inhalt gefüllte T-Flasche der Größe 175 cm². Diese Probenentnahme folgt dem selben Prinzip wie das bereits in Kapitel 1.3, Seite 7, vorgestellte ONLINE-PROBENAHME-MODUL FÜR FERMENTER der Firma IUL und besitzt die gleichen steriltechnischen Risiken.

4.1.2 Validierung der Probenentnahmestationen

ELVamat

Für den Einsatz der Probenentnahmestation gibt es mehrere wichtige Kriterien. Die zwei wichtigsten Kriterien sind zum einen die Sterilität des Bioreaktors und zum anderen die Unverfälschtheit der entnommenen Probe. Weiterhin ist die Menge des Vorlaufs wichtig, die benötigt wird, um eine repräsentative Probe zu erhalten und die Zeitdauer, um diese Probe zu entnehmen. Zusätzlich ist zum Beispiel zu prüfen, ob es eine Erwärmung des Reaktors durch die Sterilisation des Systems gibt und wie groß der zeitliche Abstand bis zur nächsten Probe sein muss, um eine Erwärmung und Beeinflussung der Probe zu verhindern.

Die Entwicklung der **ELVamat**-Probenentnahmestation war Teil der Diplomarbeit die von Sandra Plahl [Plahl, 1998] im Sommersemester 1998 durchgeführt wurde. Seitdem wurde das System bei vielen Kultivierungen im 20 l Maßstab erfolgreich eingesetzt. Näheres zur Hardware, dem technischen Aufbau oder der Programmierung ist Kapitel 2.6, ab Seite 20, zu entnehmen. Bei den in diesem Kapitel vorgestellten Kultivierungen lag der Schwerpunkt auf dem Vergleich einer automatischen mit einer manuellen Probenentnahme. Dazu musste primär gezeigt werden, dass es zu keiner Zellschädigung durch das System kommt. Weitere Punkte, die Einfluss auf die Probenqualität haben, sind zum Beispiel mögliche Verdünnungen der Probe durch in den Leitungen stehendes Kondensat.

Bei den in Kapitel 5, ab Seite 87, gezeigten Kultivierungen wurde das Gesamtsystem der automatischen Probenbearbeitung getestet, so dass eventuelle Abweichungen zwischen einer manuell und automatisch durchgeführten Probenentnahme auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden können. Aus diesem Grund wurde die Probenentnahmestation separat validiert.

Es wurde eine Kultivierung mit rekombinanten CHO-Zellen (rCHO) im 20 l Maßstab und eine Kultivierung mit *Euglena gracilis* im 100 l Maßstab durchgeführt. CHO-Zellen eignen sich gut für die Durchführung von Kultivierungen zur Validierung eines Systems, da dies eine sehr häufig verwendete Zelllinie ist. Der Flagellat *Euglena gracilis* ist hingegen auf Grund der Größe und des höheren Gewichts gut geeignet, um Sedimentationseffekte in den Schläuchen während der Positionierbewegung zu detektieren. Das hohe Gewicht dieses Organismus ergibt sich durch die Einlagerung eines Kohlenhydrats (Paramylon) als Speicherstoff.

Tabelle 4.1: Probenmengen je Ventilöffnungszeit, 20 l Reaktor bei 200 mbar Überdruck

Öffnungszeit [s]	1	2	3	4	5
Menge [ml]	11,6	24,1	36,6	47,0	58,1

Die **20 l Kultivierung** von CHO-Zellen wurde über 110 h bei einer Temperatur von 37 °C, pH-Wert von 7,1 und einem pO₂ von 40 % durchgeführt. Der Füllstand des Reaktors betrug 18 l bei einem Überdruck von 200 mbar. Über einen taumelnden Membrankorb wurde blasenfrei begast. Die Drehzahl betrug dabei 35 U·min⁻¹. Nach den in Tabelle 4.1, Seite 56, aufgeführten Volumina wurden Ventilöffnungszeiten von vier Sekunden für den Vorlauf und drei Sekunden für die eigentliche Probe gewählt. In Tabelle 4.2, Seite 56, sind die Längen der Schläuche für diesen Versuchsaufbau angegeben. Die Spüldauer mit Kondensat aus der Dampfleitung betrug 12 Sekunden und die Sterilisationszeit 20 Minuten. Während der Kultivierung wurden insgesamt zu neun Zeitpunkten Proben genommen, davon jeweils eine manuell und eine mit der Probenentnahmestation. Analysiert wurden Zelldichte, Glukose, Laktat und Laktatdehydrogenaseaktivität (LDH-Aktivität).

In Abbildung 4.1, Seite 57, ist der Verlauf der Lebend- und Totzellidichte der rCHO-Kultivierung im 20 l Maßstab gezeigt. Es ist erkennbar, dass die Messungen für die Lebendzellidichte gut übereinstimmen. Für die Totzellidichte ergeben sich jedoch Abweichungen zwischen den beiden Kurven. Diese Abweichungen können durch die geringere statistische Sicherheit einer Zählung mit der Neubauerzählkammer bei geringen Zelldichten erklärt werden. Aus diesem Grund können diese Abweichungen in Hinblick auf die gute Übereinstimmung der Kurven für die lebenden Zellen unberücksichtigt bleiben. Des Weiteren lässt sich die Befürchtung, dass die Zellen durch die Probenentnahme geschädigt werden, mit dem in Abbildung 4.3, Seite 58, gezeigten Verlauf der LDH-Aktivität ausschließen. LDH ist ein intrazelluläres Enzym, das im Kulturüberstand nur bei Schädigung der Zellen nachweisbar ist. Da die Werte der manuellen Probenentnahme sogar noch über denen der automatischen liegen, ist bewiesen, dass die automatische Variante der manuellen, in Hinblick auf den Zustand der Zellen, ebenbürtig oder sogar überlegen ist. Weiterhin zeigen die Glukose- und Laktatmessungen in Abbildung 4.2, Seite 57, dass es zu keiner Verdünnung

Tabelle 4.2: Schlauchlängen und Durchmesser der Probenentnahmestation am 20 l Reaktor

Verbindung	Länge [cm]	Durchmesser [mm]	Volumen [ml]
Dampfleitung → Ventil 3	160	9	102
Ventil 3 → Ventil 1	100	7	38
Ventil 1 → Ventil 2	30	7	12
Ventil 2 → Nadel	81	4	10

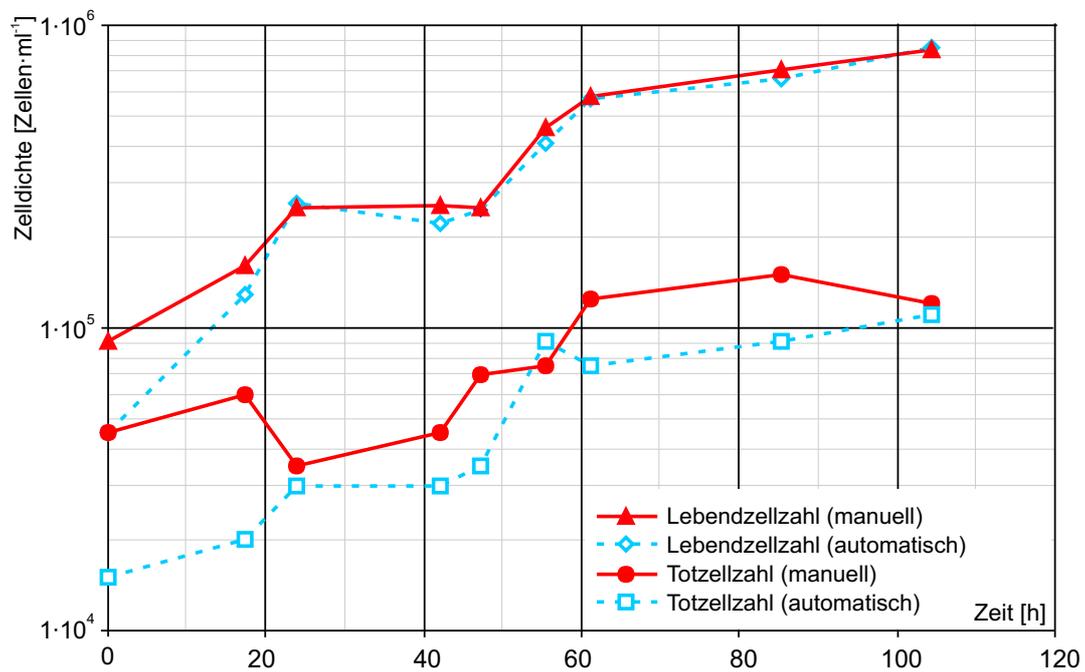


Abbildung 4.1: Vergleich des Verlaufs der Lebend- und Totzellichte (halblogarithmische Darstellung) zwischen manueller und automatischer Probenentnahme mit dem ELVAMAT während einer 20l Kultivierung einer rCHO-Zelllinie.

oder sonstiger Beeinflussung der Probe kommt und die Homogenität der genommenen Probe gegeben ist.

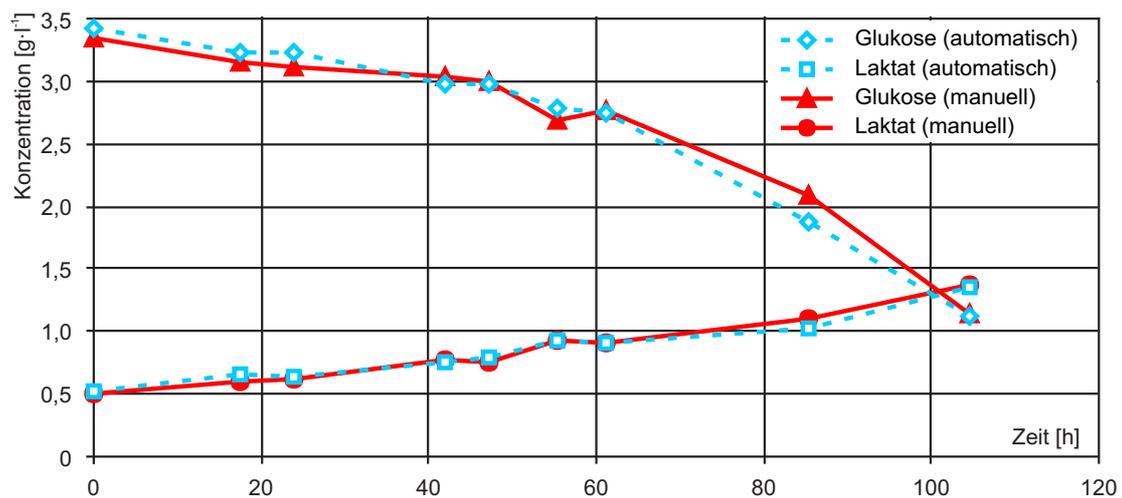


Abbildung 4.2: Vergleich des Verlaufs der Glukose- und Laktatkonzentrationen zwischen manueller und automatischer Probenentnahme mit dem ELVAMAT während einer 20l Kultivierung einer rCHO-Zelllinie.

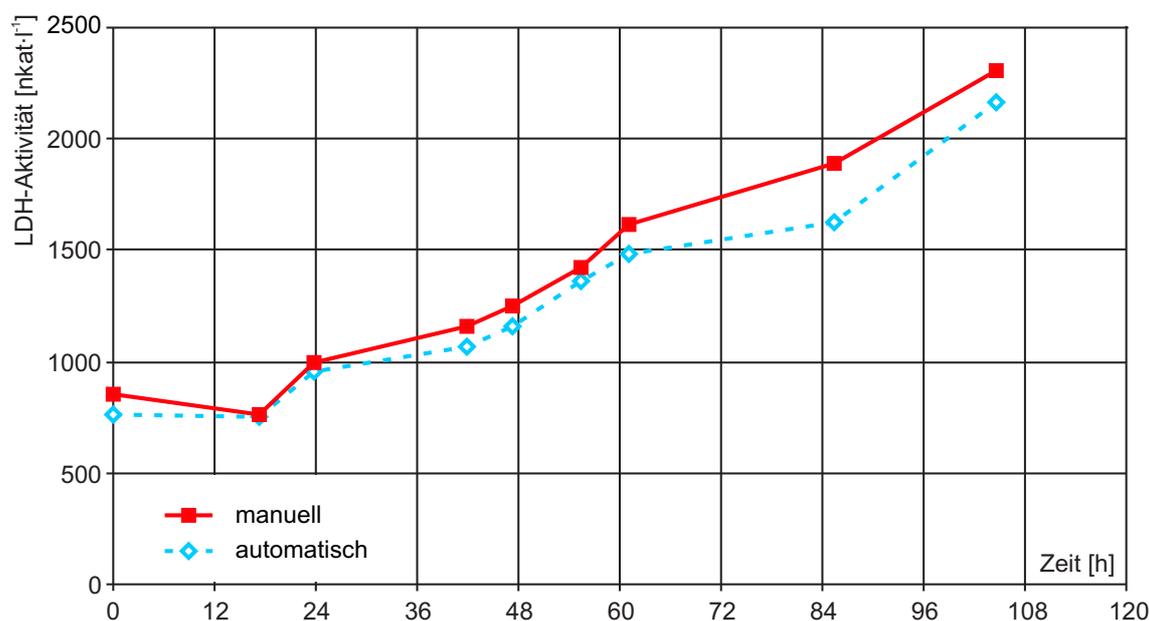


Abbildung 4.3: Vergleich des Verlaufs der LDH-Aktivität zwischen manueller und automatischer Probenentnahme mit dem ELVAMAT während einer 20 l Kultivierung einer rCHO-Zelllinie.

Die **100 l Kultivierung** von *Euglena gracilis* erfolgte über 190 h in zwei Sätzen bei einer Temperatur von 30 °C, pH-Wert von 3,5, pO₂ von 40 % und einer Rührerdrehzahl von 45 U·min⁻¹. Die Begasung erfolgte durch Blasenbegasung ohne Kopfraumüberdruck bei einem Füllvolumen von 110 l.

Es wurden insgesamt siebzehn Proben genommen, die auf dieselben Parameter (Lebend- und Totzellzahl, Glukose, LDH) wie bei der 20 l Kultivierung untersucht wurden. Laktat wurde nicht gemessen, da dieses von *Euglena gracilis* nicht produziert wird. Während der Kultivierung wurden dreimal verbrauchte Nährstoffe supplementiert. Zum Zeitpunkt 48 Stunden wurden 5 l Kulturflüssigkeit entnommen und durch Glukoselösung (300 g·l⁻¹) ersetzt. In gleicher Weise, mit zusätzlicher Supplementierung von Aminosäuren, wurde zu den Zeitpunkten 143 Stunden und 167 Stunden verfahren.

Durch die unterschiedlichen Betriebsbedingungen des Reaktors und der unterschiedlichen Anordnung der Dampfanschlüsse wurden die Öffnungszeiten der Ventile und die Verschlauchung gegenüber der 20 l Kultur verändert. Die Angaben für die Schläuche und die Ventilöffnungszeiten sind in den Tabellen 4.3, Seite 59, und 4.4, Seite 59, dargestellt, die Ventilöffnungszeit betrug für den Vorlauf neun Sekunden, für die Probe zwei Sekunden und für das Spülen 15 Sekunden. Die Sterilisation erfolgte für 20 Minuten.

Wie in Abbildung 4.4, Seite 60, zu sehen ist, sind die Unterschiede in den ermittelten Zelldichten der automatischen und der manuellen Probenentnahmemethode zueinander während des ersten Satzes nicht gravierend. Des Weiteren zeigt sich keine systematische,

Tabelle 4.3: Probenmengen je Ventilöffnungszeit, 100 l Reaktor ohne Überdruck

Öffnungszeit [s]	1	2	3	4	5
Menge [ml]	14,0	27,8	42,3	56,0	69,8

Tabelle 4.4: Schlauchlängen und Durchmesser der Probenentnahmestation am 100 l Reaktor

Verbindung	Länge [cm]	Durchmesser [mm]	Volumen [ml]
Dampfleitung → Ventil 3	144	9	92
	162	8	81
Ventil 3 → Ventil 1	145	7	56
Ventil 1 → Ventil 2	144	7	55
Ventil 2 → Nadel	81	4	10

gleichbleibende Abweichung. Hingegen zeigen sich im zweiten Satz deutliche Abweichungen, bei denen die Zellzahlen der automatischen Probenentnahme gleichbleibend unter denen der manuellen Probenentnahme liegen. Eine Erklärung hierfür ist die unterschiedliche Anreicherung des Speicherstoffes Paramylon im Zellinneren, siehe Abbildung 4.5 auf Seite 60. Während des ersten Satzes lag der Gesamtkohlenhydratgehalt, der sich zu 98 % aus Paramylon ergibt, zwischen 287 und $670 \mu\text{g}\cdot 10^{-6}$ Zellen, beim zweiten Satz lag dieser Wert hingegen zwischen 445 und $1085 \mu\text{g}\cdot 10^{-6}$ Zellen. Dadurch sinken die Zellen bei annähernd doppeltem Gewicht schneller ab und setzen sich während der Positionierbewegung der Nadel am Schlauchboden ab. Wird danach das Ventil für die Probenentnahme wieder geöffnet, dann werden nicht alle Zellen mitgerissen und es kommt somit zur Verdünnung der Probe. An Hand der Glukosekonzentration, siehe Abbildung 4.6 auf Seite 61, bei der sich keine Unterschiede zwischen manuell und automatisch genommener Probe zeigen, lässt sich belegen, dass die Ausverdünnung der Zellen in der Probe durch die Sedimentation hervorgerufen wird und nicht durch eine Verdünnung mit Kondensat.

Der Einsatz des ELVAMAT während der Kultivierungen lieferte zufriedenstellende Ergebnisse. Im Hinblick auf die Sterilität ist das System für die Entnahme von Proben aus dem Bioreaktor geeignet. Allerdings war bei der Kultivierung von *Euglena gracilis* zu sehen, dass es durch die langsame Positionierbewegung zu Problemen durch Sedimentation der Zellen im Schlauchsystem kommt. Aus diesem Grund wurde die Probenentnahmestation mit einem anderen Positioniersystem ausgerüstet.

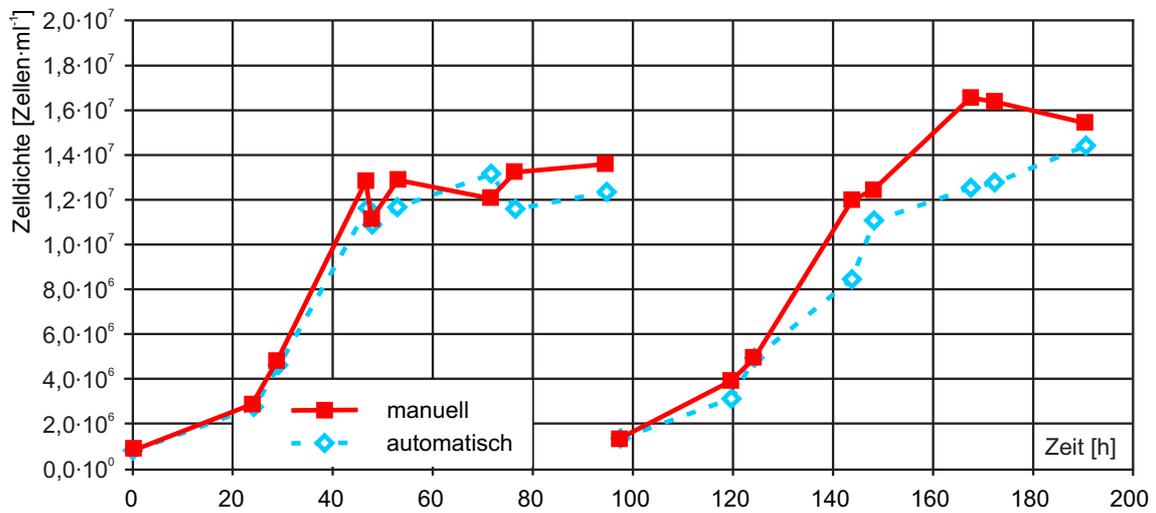


Abbildung 4.4: Vergleich des Verlaufs der Gesamtzellendichte von *Euglena gracilis* während einer 100 l Kultivierung zwischen manueller und automatischer Probenentnahme mit dem ELVamat.

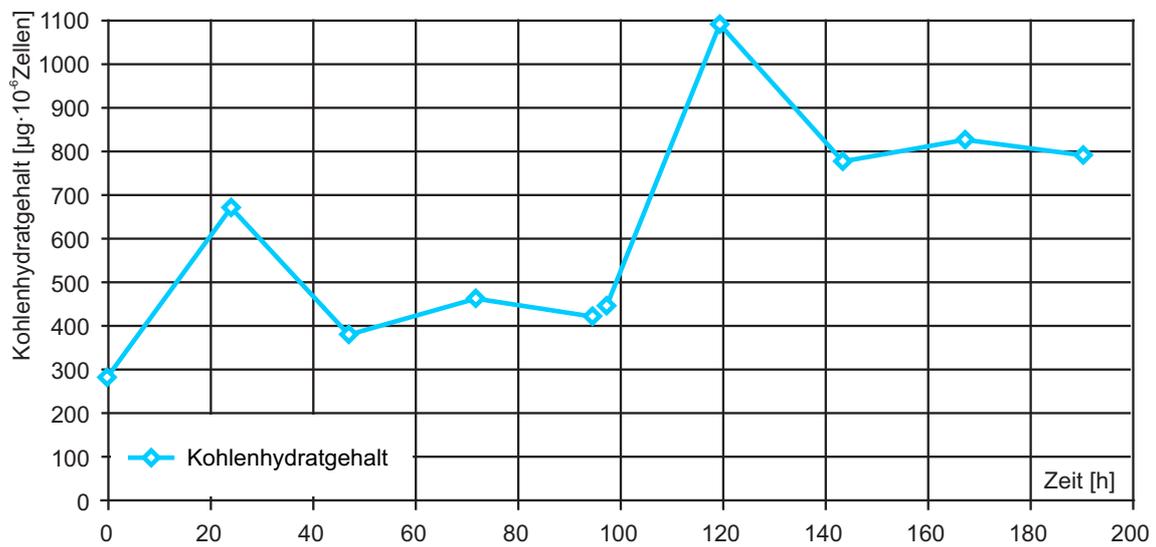


Abbildung 4.5: Kohlenhydratgehalt von *Euglena gracilis* während der Kultivierung im 100 l Reaktor. Während des zweiten Satzes wurden annähernd die doppelten Werte erreicht.

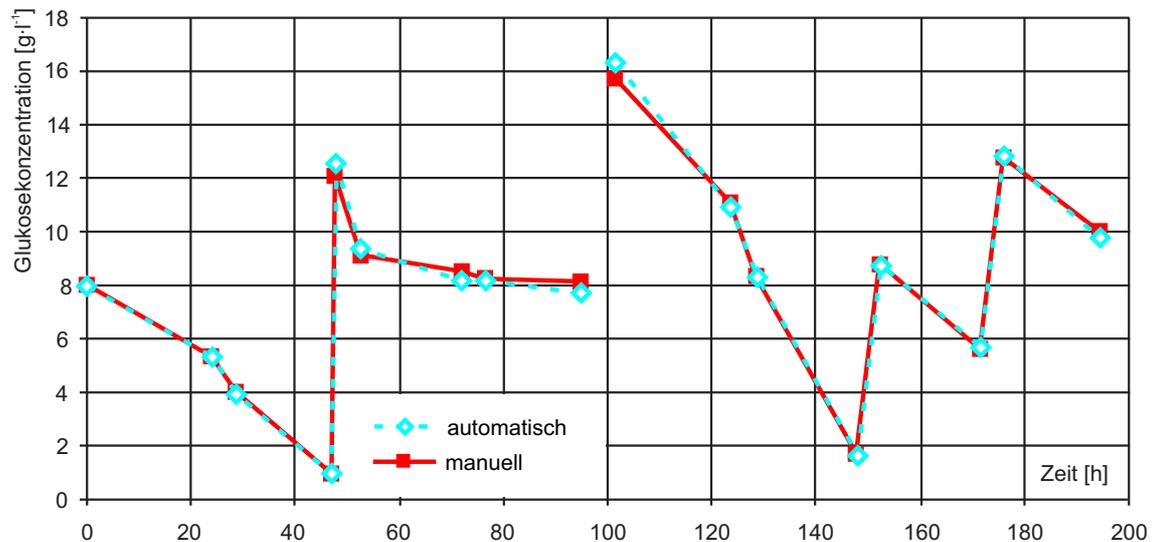


Abbildung 4.6: Glukosekonzentration während der Kultivierung von *Euglena gracilis* im 100 l Reaktor. Es erfolgte eine dreimalige Nachdosierung von Glukose zu den Zeitpunkten 48 h, 150 h und 175 h.

Linear-Roboter

Der Einsatz einer technisch optimierten Probenentnahmestation war auf Grund der langsamen Maximalgeschwindigkeit des ELVAMAT und vor allem wegen der nicht verifizierbaren Positionierung notwendig. Die Entwicklung und Programmierung dieser optimierten Probenentnahmestation, des Linear-Roboters, erfolgte in Zusammenarbeit mit Andre Korrat. Weite Teile der Entwicklung und Validierung erfolgten während seiner Diplomarbeit [Korrat, 2003] im Sommersemester 2003. Näheres zur Hardware, dem technischen Aufbau oder der Programmierung ist Kapitel 2.6 ab Seite 20 zu entnehmen. Auf Grund der bis dahin erzielten positiven Ergebnisse mit dem ELVAMAT in Bezug auf die Sterilsicherheit und Repräsentanz der Probe wurde ein Schwerpunkt auf die Vorversuche, die die physikalischen Gegebenheiten und den Aufbau des Gerätes untersuchen gelegt. Daraus folgend wurde der Aufbau weiter optimiert und zum Beispiel die Vorlaufmenge reduziert. Zum Abschluss wurde eine Kultivierung von rCHO-Zellen durchgeführt. Auf eine Kultur mit schwereren Zellen/Organismen wurde verzichtet, da die Bewegungen des Linear-Roboters mit etwa $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ für die Z-Achse und fast $2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ für die X-Achse in einem Bereich liegen, in dem es nicht zu einer Sedimentation kommen kann.

Die Optimierungen wurden für die Vorlaufmenge bei verschiedenen Schlauchdurchmessern durchgeführt. Durch Leitfähigkeitsmessung der entnommenen Probe, die in diesem Fall aus einer physiologischen Natriumchloridlösung bestand, wurde die Verdünnung der Probe durch das in den Leitungen verbliebene Kondensat gemessen. Erwartungsgemäß sammelt sich in einem dünneren Schlauch weniger Kondensat, das dementsprechend auch schneller ausgespült wird. Wie in Abbildung 4.7, Seite 62, dargestellt ist, reichen bei einem

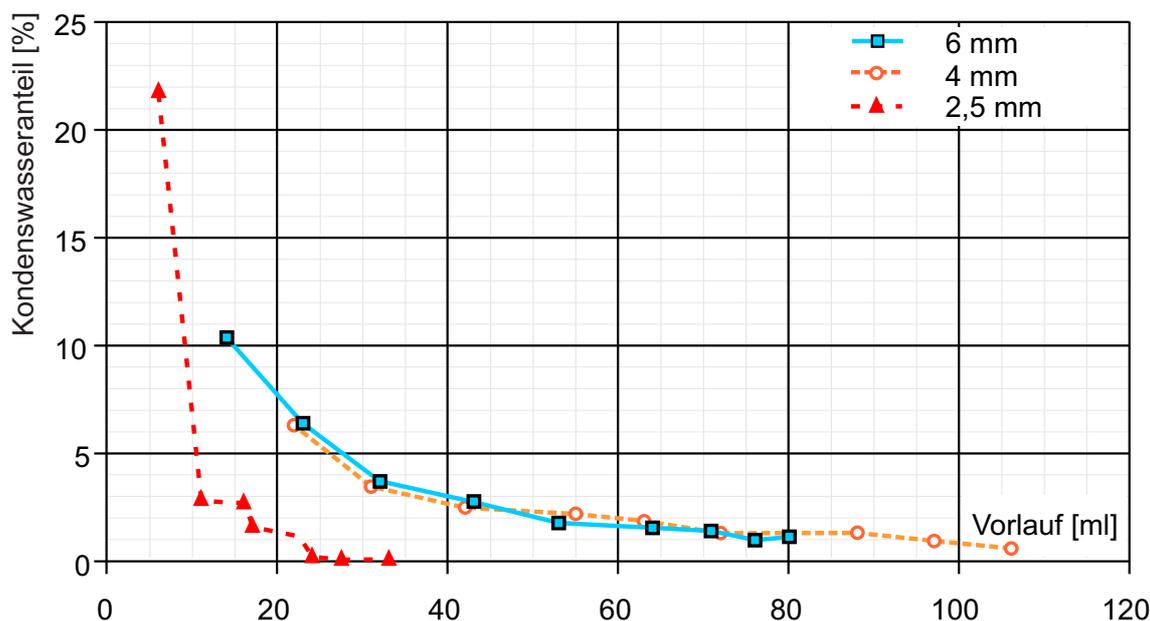


Abbildung 4.7: Verdünnung der entnommenen Probe durch Kondensat in den Schläuchen.

Schlauchdurchmesser von 2,5 mm 25 ml Vorlauf, um auf eine Verdünnung deutlich unter 1 % zu kommen. Diese Ergebnisse konnte in verschiedenen Testreihen für alle Schlauchdurchmesser reproduziert werden. Die Messreihen für den 2,5 mm Schlauch sind in Abbildung 4.8, Seite 63, dargestellt.

Ein weiteres Kriterium für eine Beeinflussung der Probe ist ihre Temperatur. Durch die Sterilisation wird das Schlauchsystem auf 121 °C aufgeheizt. Würde man sofort danach eine Probe entnehmen, käme es zu einer Schädigung der Zellen. Dieser Fall ist zwar sehr unwahrscheinlich, denn eine Probenentnahme findet im Normalfall im Abstand von mehreren Stunden statt, muss aber dennoch berücksichtigt werden. In Abbildung 4.9, Seite 63, ist die Temperatur einer Probe nach einer bestimmten Wartezeit nach einer Sterilisation dargestellt. Nach sechs Minuten liegt die resultierende Temperatur der Probe bei 37 °C, so dass die Probe als unbeeinflusst gelten kann. Zu berücksichtigen bleibt dabei allerdings, dass es durchaus sein kann, dass auch nach Ablauf dieser Zeit im System punktuell höhere Temperaturen vorliegen. Solche Stellen können zum Beispiel Metallteile an Ventilkörpern sein, die Wärmekapazität beziehungsweise Wärmeleitung reicht dann zwar nicht für eine Erhöhung der Temperatur der Probe, aber es könnte durchaus noch ein Teil der Zellen geschädigt werden.

Zur Erprobung des Linear-Roboters wurde eine Kultivierung von rCHO-Zellen bei konstantem pH von 7,2, pO_2 von 40 %, Rührerdrehzahl von $50 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ und Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Prozesswerte dieser Kultivierung sind in Abbildung 4.10, Seite 64, dargestellt. Die Testkultivierung für den Linear-Roboter war der zweite Satz in Folge auf ein anderes Experiment. Zur Erhöhung der Datenmenge wurde mit der Probenentnahme

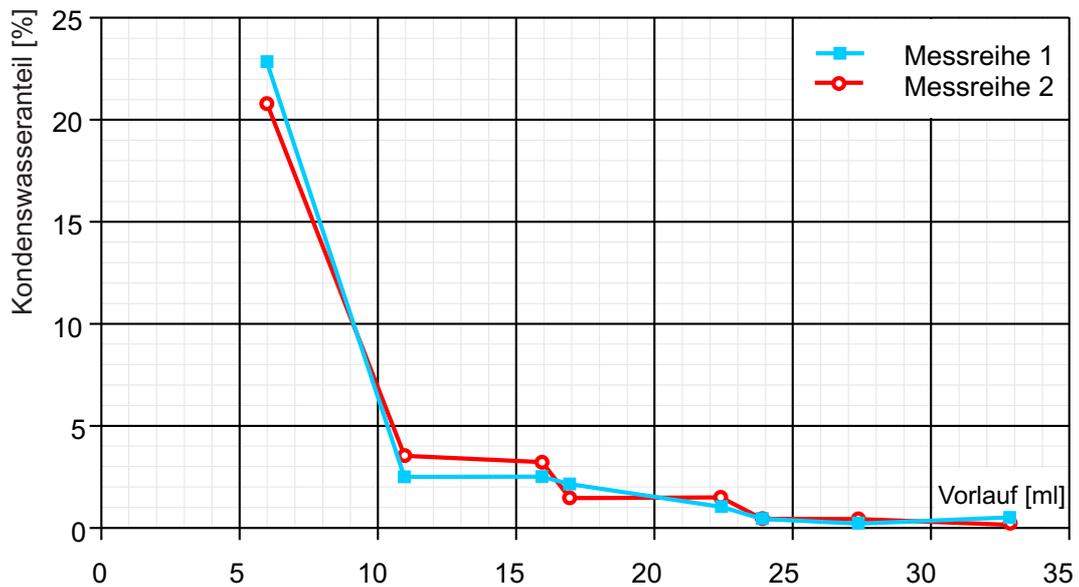


Abbildung 4.8: Reproduzierbarkeit der Verdünnungsmessung für den Schlauchdurchmesser 2,5 mm.

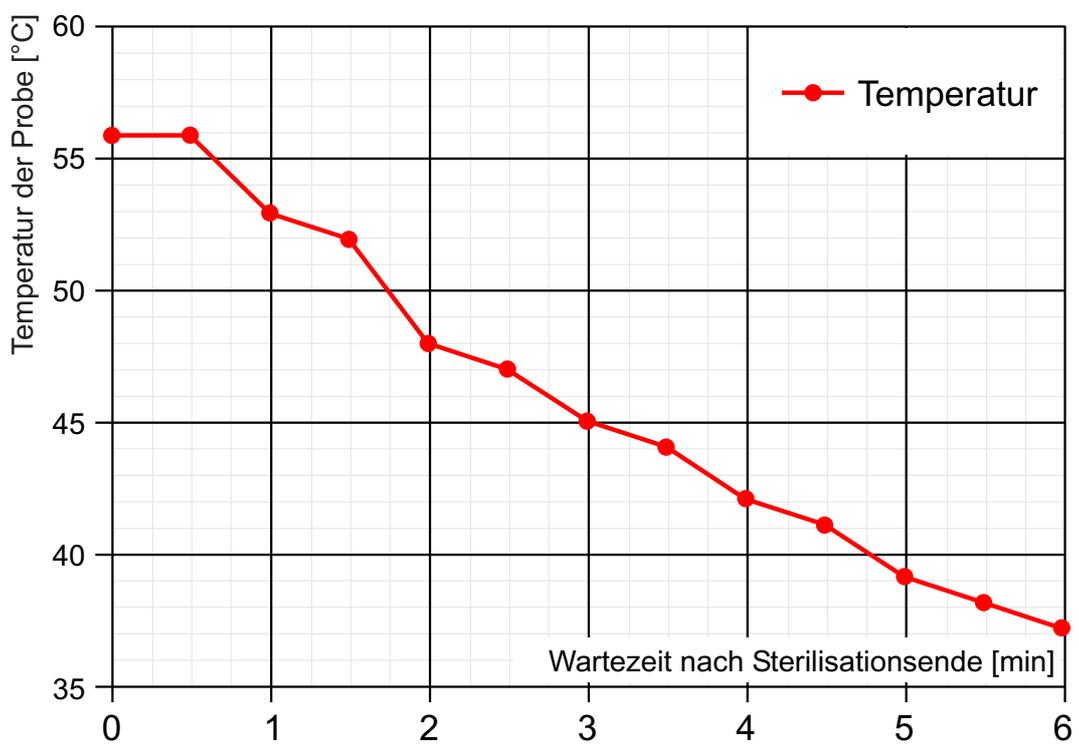


Abbildung 4.9: Temperatur einer Reaktorprobe in Abhängigkeit von der Wartezeit nach Sterilisationsende.

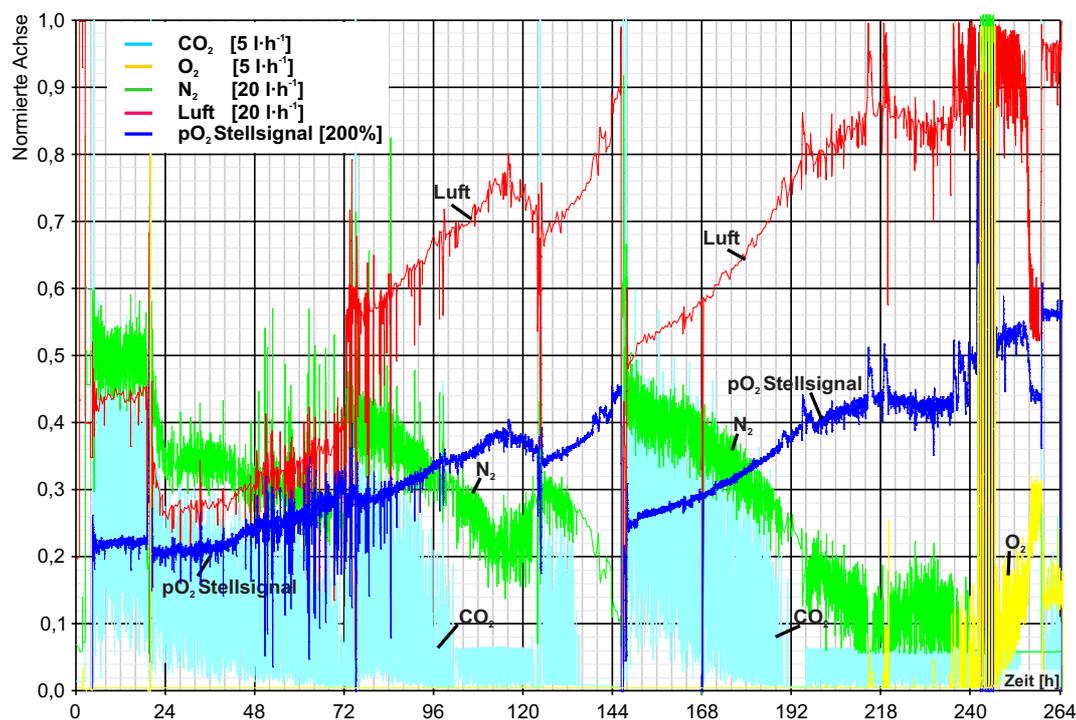


Abbildung 4.10: Verlauf der Prozesswerte während einer Kultivierung von rCHO-Zellen im 20 l Maßstab. Zur einfacheren Darstellung wurde die Y-Achse normiert. Der Maximalwert entspricht dem in der Legende jeweils angegebenem Absolutwert. 100 % pO₂-Stellsignal entspricht 100 % Luftbegasung.

für das Experiment schon am Ende des ersten Satzes begonnen. Aus diesem Grund beginnt die Darstellung der offline Daten, siehe Abbildungen 4.11, Seite 65, bis 4.13, Seite 66, im Negativen. Der tatsächliche Start des zweiten Batches beginnt zum Zeitpunkt 0 h.

Abbildung 4.11, Seite 65, zeigt den Verlauf der Lebendzelldichte und der Viabilität für die manuelle sowie die automatische Probenentnahme. Es lässt sich erkennen, dass es keine systematischen Abweichungen gibt. Die Lebendzelldichte zeigt ein paar größere Abweichungen zwischen den Entnahmehethoden, deren Richtung aber zufällig ist und sich durch statistische Schwankungen bei der Zellzählung erklären lassen. Dadurch ist gezeigt, dass es weder durch Verdünnung mit Kondensat noch durch Sedimentation der Zellen zu einer Beeinflussung der genommenen Probe kommt.

Vor allem in Bezug auf die Verdünnung mit Kondensat, liefert auch die Analyse der Glukose- und Laktatwerte, Abbildung 4.12 auf Seite 65, die gleichen Ergebnisse wie die Ermittlung der Zelldichte und Viabilität. Die ermittelten Werte für die automatische und manuelle Probenentnahme schwanken zufällig und es lässt sich kein systematischer Fehler erkennen.

Als weiterer Parameter für den Beweis, dass die entnommene Probe durch die automatische Probenentnahme nicht beeinträchtigt wird, ist der Verlauf der LDH-Aktivität

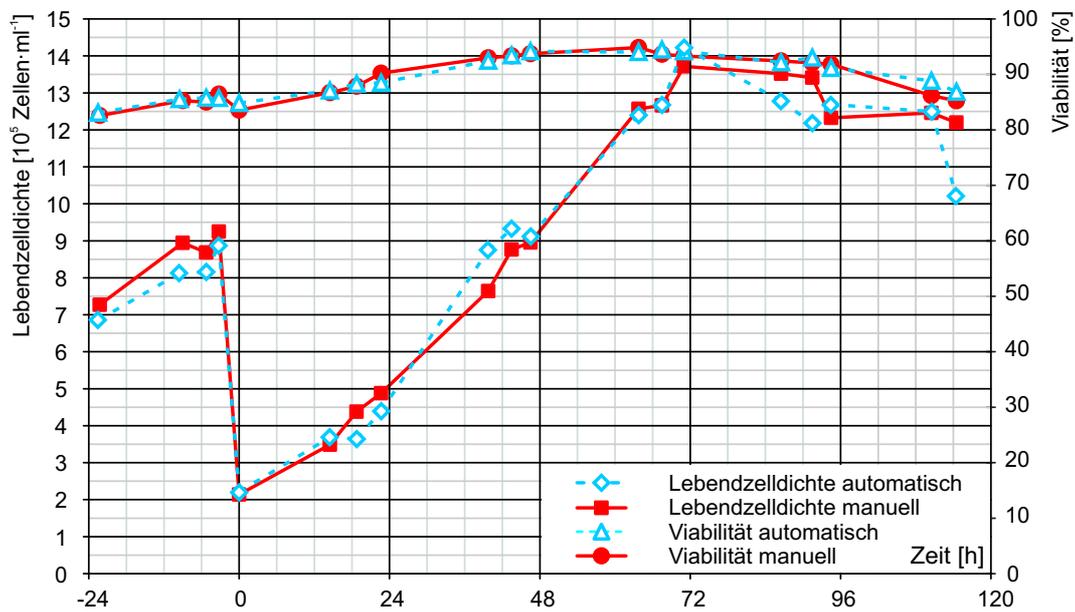


Abbildung 4.11: Verlauf der Lebendzellichte und der Viabilität während einer Kultivierung von rCHO-Zellen im 20 l Maßstab

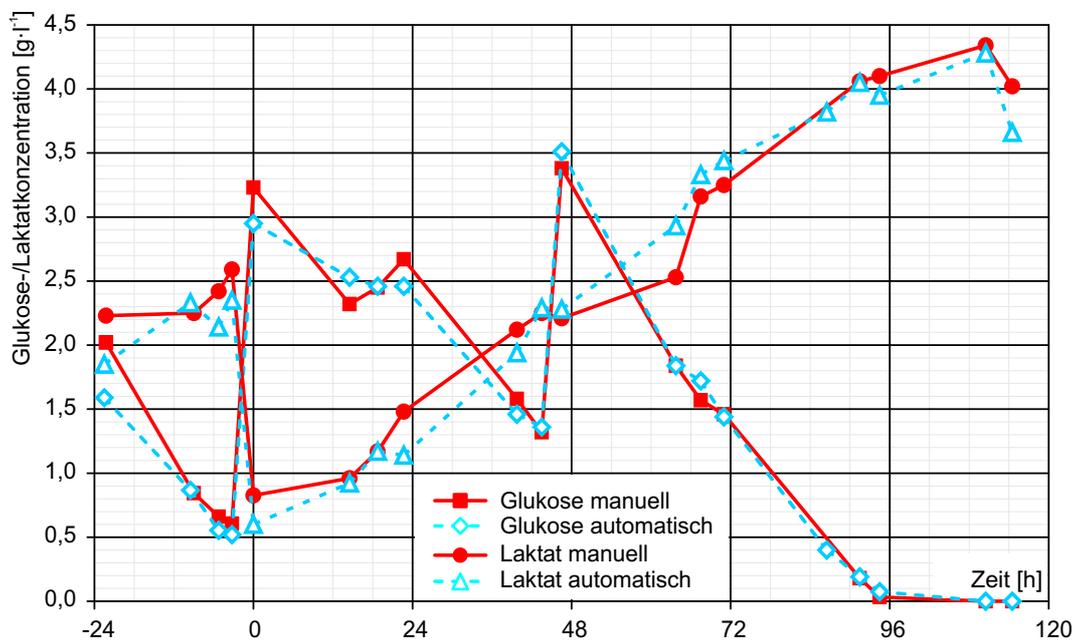


Abbildung 4.12: Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration während einer Kultivierung von rCHO-Zellen im 20 l Maßstab

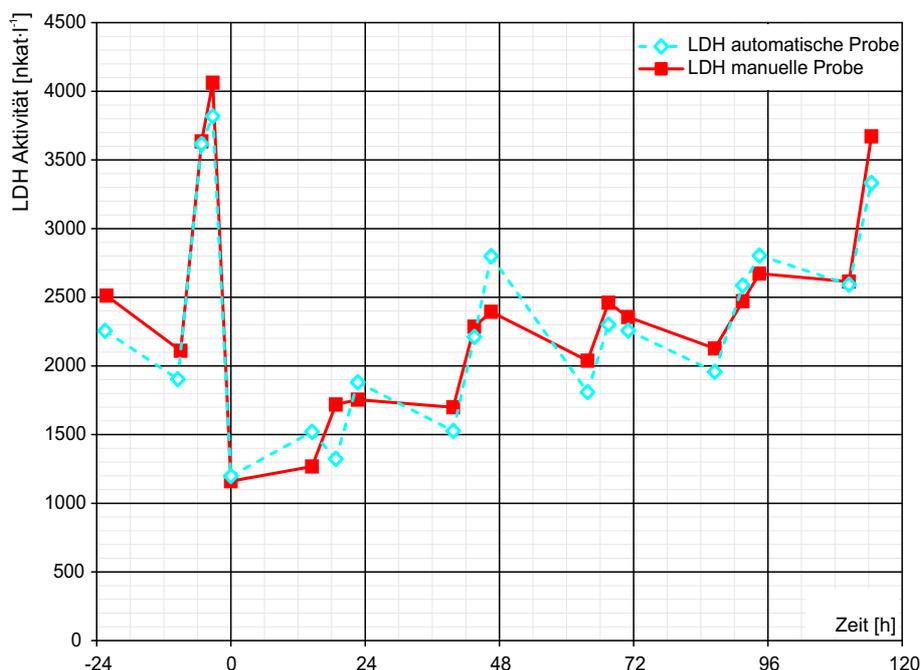


Abbildung 4.13: Verlauf der LDH-Aktivität während einer Kultivierung von rCHO-Zellen im 20l Maßstab

aufgeführt. Abbildung 4.13, Seite 66, zeigt den Verlauf über die Kulturdauer. Auch hier kann man erkennen, dass die Kurven nur zufällige Abweichungen zueinander haben, eine Verdünnung mit Kondensat kann daher ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann durch den Verlauf der LDH-Aktivität gezeigt werden, dass die Zellen nicht durch Scherkräfte oder weitere mechanische Einflüsse der Probenentnahmestation geschädigt werden. Wie bereits erwähnt ist LDH ein intrazelluläres Enzym, durch welches auf eine Schädigung der Zellmembran geschlossen werden kann. Der leichte kontinuierliche Anstieg der LDH-Aktivität über die Kultivierungsdauer erklärt sich durch die steigende absolute Zahl von toten Zellen. Ein systematischer Unterschied zwischen den Entnahmearten der Probe lässt sich nicht beobachten, daher kann eine mechanische Schädigung der Zellen durch die Probenentnahmestation ausgeschlossen werden.

Die Sedimentation der Zellen in den Schläuchen konnte durch Einsatz des Linear-Roboters anstelle des ELVAMAT verhindert werden. Auf Grund der durch die Bauart bedingten Größe des Gerätes wurde mit dem Linear-Schlitten noch ein weiteres System mit geringeren Abmessungen für die Positionierung im Probenentnahmesystem eingesetzt.

Linear-Schlitten

Die Optimierung der mechanischen und elektrischen Eigenschaften der Probenentnahmestation war mit dem Linear-Roboter gelungen, allerdings wäre eine geringere Baugröße für

den Laboreinsatz besser geeignet. Eine Optimierung dieser Art ist der pneumatisch angetriebene Schlitten der Firma Festo (Esslingen, Deutschland). Durch den herstellerseitig in geringerem Abstand abstufbaren Verfahrensweg beträgt die Breite des Gerätes nur circa ein Drittel des Linear-Roboters. Des Weiteren entfallen durch den pneumatischen Antrieb die Motoren. Dieses trägt zur weiteren Verringerung der Baugröße bei, zusätzlich entfällt die Wärmeentwicklung und dadurch notwendige Belüftung. Siehe dazu auch Kapitel 2.6 ab Seite 20. Versuche mit Zellsuspensionen wurden nicht durchgeführt.

4.1.3 Zusammenfassung

Durch die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, dass sich das entwickelte Grundkonzept der Probenentnahmestation eignet, um wiederholt eine repräsentative Probe aus einem Bioreaktor zu entnehmen. Sterilitätsprobleme oder gar eine Kontamination des Reaktors traten nicht auf. Die Ventilöffnungszeiten müssen den Gegebenheiten des jeweiligen Reaktors angepasst werden. Einfluss nehmende Parameter sind zum Beispiel Reaktorüberdruck, Schlauchdurchmesser und Schlauchlängen. Ist dies geschehen, dann können dem Reaktor regelmäßig Proben entnommen werden. Die Probenentnahme kann zu vorbestimmten Zeitpunkten oder nach einem festgelegten Intervall durchgeführt werden. Der prinzipielle Aufbau der einzelnen Probenentnahmestationen unterscheidet sich nicht, daher sind auch die Ergebnisse der Versuche zu den verschiedenen Probenentnahmestationen untereinander konsistent. Einzige Ausnahme dabei ist die Sedimentation von schweren Zellen während der Positionierbewegung des ELVAMAT, die in diesem Fall eine Verfälschung der Ergebnisse erzeugt. Bei allen weiteren Versuchen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die Messung von Zelldichten, Viabilität, Glukose, Laktat oder LDH, so dass gesagt werden kann, dass sich die Probenentnahmestationen für den praktischen Einsatz im Laboralltag eignen.

Ein Einsatz des ELVAMAT in einer Produktions- oder Forschungseinrichtung kann trotz der guten Ergebnisse während der Kultivierung der CHO-Zellen auf Grund der nicht sicher überprüfaren, langsamen Positionierung nicht empfohlen werden. Mit dem Linear-Schlitten wurden keine Kultivierungen durchgeführt. Es lässt sich allerdings keinen Grund erkennen, dass es alleine durch den Einsatz eines anderen Positionierprinzips unterschiedliche Ergebnisse als mit dem Linear-Roboter ergeben könnten. Eine Entscheidung für den Einsatz des einen oder anderen Gerätes ließe sich nur durch unterschiedliche Voraussetzungen in den Einsatzstätten fällen. Die elektrischen Motorantriebe des Linear-Roboters erzeugen Wärme und benötigen eine ausreichende Belüftung. Sollten diese Tatsachen Probleme bereiten oder liegt im Umgebungsbereich eine hohe Luftfeuchtigkeit vor, dann ist der Linear-Schlitten mit der pneumatischen Ansteuerung zu favorisieren.

4.2 Pipettierstation

4.2.1 Aufgaben

Die Pipettierstation wird benötigt, um der Reaktorprobe, die sich in einem 50 ml Probengefäß befindet, ein definiertes Volumen zu entnehmen. Diese Volumenentnahme ist zu zwei Zeitpunkten während des Probenmanagements notwendig. Zum einen für die Bestimmung der Zelldichte am Anfang der Probenbehandlung und zum weiteren am Ende zur Archivierung der zellfreien Probe. Eine weitere Aufgabe, die mit der Pipettierstation durchgeführt werden kann ist die Auflösung von Aggregaten. Am Ende jeder Routine muss das System gespült werden, um Probenreste zu entfernen. Mindestens einmal am Tag sollte, zur Verhinderung von Rückständen, eine Reinigung mit Detergenzien durchgeführt werden.

Es ist notwendig, dass die entnommenen Aliquots von der Pipettierstation unbeeinflusst bleiben. Einerseits könnten die Zellen vom Transport durch die Kapillaren des Gerätes geschädigt werden, andererseits könnte die Probe durch Rückstände im System verdünnt oder beeinträchtigt werden. Des Weiteren verweilt das entnommene Aliquot eine gewisse Zeit in der Spritze der Pipettierstation während der Roboter das Gefäß zur Aufnahme dieses Aliquots vorbereitet. Während dieser Zeitdauer kommt es zu Sedimentation der Zellen im System. Ein weiterer Punkt ist die Genauigkeit des pipettierten Volumens, dieses kann zum Beispiel durch im Kapillarsystem verbleibende Tröpfchen beeinflusst werden.

4.2.2 Allgemeine Beobachtungen

Für die 1 ml Spritze wurde beobachtet, dass die aufgenommene Flüssigkeit nicht im Spritzenenschaft nach unten läuft, wenn sich dort vorher schon Luft befunden hat. Die Flüssigkeit strömte in die ungebrauchte 2,5 ml Spritze langsamer ein, als in die bereits in Benutzung befindliche. Hierbei muss aufgepasst werden, dass mögliche Ventilbewegungen nicht vor der Einstellung eines Gleichgewichts erfolgen, so dass das aufzunehmende Volumen noch nicht vollständig einströmen konnte. Dieses Phänomen konnte auch an der gebrauchten Spritze während der Entwicklung der Reinigungsroutine beobachtet werden. Da eine mögliche Schädigung der Zellen nicht beachtet werden muss, werden während der Reinigungsroutine höhere Stempelgeschwindigkeiten eingesetzt. Dabei kann es passieren, dass die Flüssigkeit langsamer durch die Kapillaren strömt als es durch die Hubgeschwindigkeit des Stempels vorgegeben ist. Aus der Mischkammer konnten bei der Geschwindigkeit zehn Sekunden pro Hub nicht die kompletten 2,5 ml wieder entfernt werden bevor das MVP (Modular Valve Positioner) auf die nächste Zuleitung gewechselt hatte. Bei der in Benutzung befindlichen Spritze entwickeln sich am Stempel Luftblasen. Denkbar wären Ausgasungen beziehungsweise Ausdehnung von bereits vorhandenen Mikroblasen durch den entstehenden Unterdruck bei der Stempelbewegung oder Undichtigkeiten am Stempel. Bei der in Tabelle 4.5, Seite 69, dargestellten Vergleichsmessung konnten allerdings keine Volumenunterschiede außerhalb der Messgenauigkeit festgestellt werden, daher muss es sich um

Tabelle 4.5: Vergleichsmessung, Genauigkeit verschiedener Spritzen. Das pipettierte Volumen betrug $1000\ \mu\text{l}$. Aus zehn Einzelmessungen wurden Mittelwert und Standardabweichung für die Messreihe ermittelt. Bei den fünf verschiedenen Spritzen lagen die Messungenauigkeiten jeweils im Bereich der Anzeigengenauigkeit der verwendeten Waage. Bei 20°C beträgt die Dichte von Wasser $0,9982\ \text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Spritze [μl]	Mittelwert [mg]	SD [mg]	SD _{rel} [%]	Mittelwert [μl]	Abweichung [%]
1000 ^a	1002	12,29	1,23	1004	+0,4
1000	994	9,66	0,97	996	-0,4
2500 ^b	989	7,38	0,75	991	-0,9
2500 ^c	999	8,76	0,88	1001	+0,1
5000	991	5,68	0,57	1004	+0,4

^aEppendorf Handpipette

^bin Gebrauch befindliche Spritze

^cungebrauchte Spritze

Ausgasungen beziehungsweise Ausdehnung bereits vorhandener, kleiner Luftblasen durch den entstehenden Unterdruck handeln.

Es ist nicht möglich die komplette Flüssigkeit aus der Spritze zu entfernen. Es verbleiben mindestens $60\ \mu\text{l}$ im Hals, die die nächste aufgenommene Flüssigkeit verdünnen. Ein umdrehen des Spritzenmoduls könnte hier Abhilfe schaffen. Ein daraus resultierendes mögliches Problem ist das durchsprudeln einer zellhaltigen Probe mit Luft, dadurch könnten empfindliche Zellen geschädigt werden. Des Weiteren kann im Falle des umgedrehten Spritzenmoduls die im Verbindungsschlauch befindliche Luft beziehungsweise Flüssigkeit nicht ausgeblasen werden. Zum Beispiel wird bei der Mischroutine zu dem sich in der Spritze befindlichen Volumen zusätzliche Flüssigkeit aufgenommen. Das von der ersten Flüssigkeit verbleibende Volumen muss aber zuerst aus den Kapillaren entfernt werden. Mit einem umgedrehten Spritzenmodul ist dieses nicht möglich. Die zum Ausblasen benötigte Luft würde sich am oberen Ende des Spritzenschaftes sammeln und das gesamte Volumen würde entfernt werden.

4.2.3 Entnahme eines Aliquots

Bei der Entnahme eines Aliquots aus der Probe ist es selbstverständlich, dass das entnommene Volumen korrekt entnommen werden muss. Versuche zur Genauigkeit des entnommenen Volumens sind in den Tabellen 4.5, Seite 69, 4.6, Seite 70, und 4.7, Seite 70, aufgeführt. Es lässt sich erkennen, dass die Pipettiergenauigkeit in Bezug auf das Volumen gute Resultate liefert. Es werden zwar systematisch geringere Mengen als das Sollvolumen entnommen, aber die Abweichung liegt im Bereich unter 1%. Außerdem wurde bei

Tabelle 4.6: Genauigkeit der Pipettierstation. Vergleich zwischen manueller und automatischer Pipettierung. Für die Entnahme der automatischen Probe wurde eine 2,5 ml Spritze verwendet, pipettiert wurde mit vier Sekunden pro Hub. Die manuelle Entnahme wurde mit einer 1000 μl Eppendorfpipette durchgeführt.

Menge	Art	M.wert [mg]	SD [mg]	rel. SD [%]	M.wert [μl]	Abw. [%]
1 ml	autom	989,4	2,3	0,23	991,2	-0,88
	Hand	995,3	0,9	0,09	997,1	-0,29
0,5 ml	autom	498,0	1,8	0,37	498,9	-0,21
	Hand	498,1	1,3	0,26	499,0	-0,20
0,9 ml	autom	888,3	3,2	0,36	889,9	-1,12
	Hand	896,7	1,7	0,19	898,3	-0,19
0,1 ml	autom	98,9	1,3	1,32	99,0	-0,97

Tabelle 4.7: Genauigkeit der Pipettierstation. Vergleich der Genauigkeit bei verschiedenen Pipettiergeschwindigkeiten.

Spritze [μl]	Speed [s·Hub ⁻¹]	M.wert [mg]	SD [mg]	SD _{rel} [%]	M.wert [μl]	Abw [%]
1000	10	987,5	11,0	1,12	989,3	-1,07
1000	5	993,5	8,2	0,82	995,3	-0,47
2500	10	995,6	3,3	0,33	997,4	-0,26
5000	10	995,7	2,3	0,23	997,5	-0,25
5000	5	995,4	9,4	0,95	1000,0	0,00

Vergleichsmessungen mit einer Handpipette auch hierbei systematisch geringere Volumina pipettiert. Bei der Wiederholbarkeit der Messungen liegt die Standardabweichung der Messreihen bis auf eine Ausnahme unter 1 %.

In Abhängigkeit von der Pipettiergeschwindigkeit, die von einer bis 60 Sekunden pro Hub variiert werden kann, werden die Zellen bei der Passage durch die Kapillaren geschädigt. Die größtmögliche Geschwindigkeit entspricht bei einem Innendurchmesser der Kapillare von 1 mm einer Geschwindigkeit von 3 m·s⁻¹. In Abbildung 4.14, Seite 71, ist der Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit des Spritzenkolbens und der Geschwindigkeit der Flüssigkeit in den Kapillaren unter Verwendung einer 2,5 ml Spritze dargestellt. Es wurden Versuche durchgeführt, bei denen die LDH-Aktivität im Überstand und der Anteil der toten Zellen als Maß für die Schädigung der Kultur durch das Pipettieren genommen wurden. In Abbildung 4.15, Seite 72, ist die LDH-Aktivität und der Totanteil von pipettierten Proben

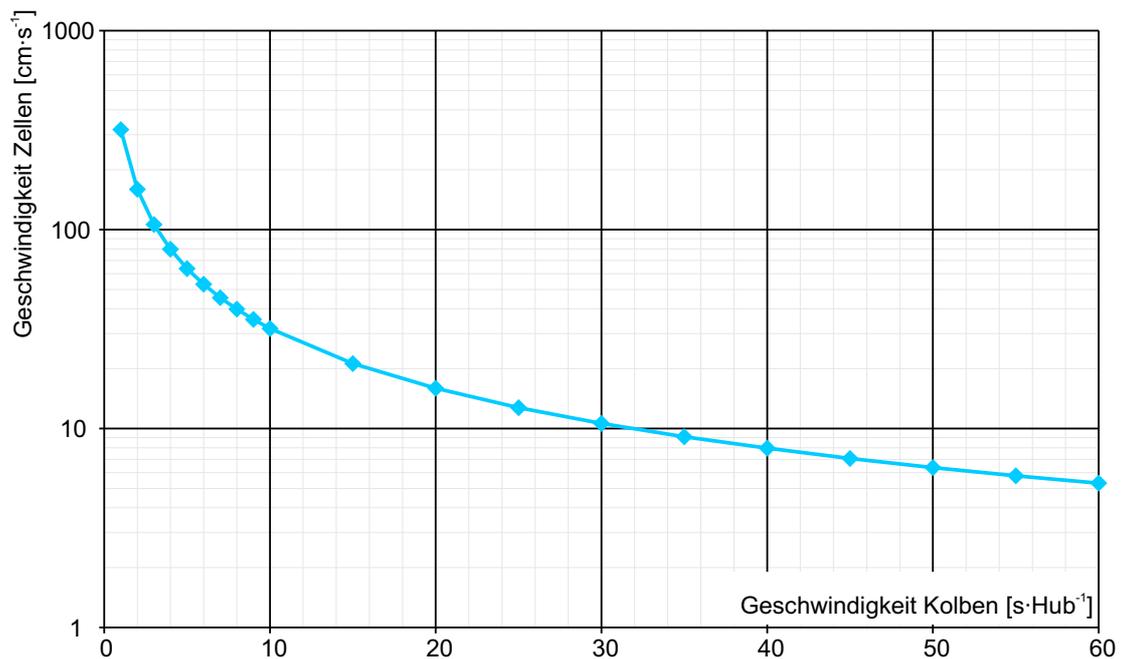


Abbildung 4.14: Zusammenhang zwischen der Hubgeschwindigkeit des Spritzenkolbens der 2,5 ml Spritze und der Geschwindigkeit der Flüssigkeit in den Kapillaren des Systems bei einem Innendurchmesser von einem Millimeter

im Vergleich zum Mittelwert aus fünf manuellen Pipettierungen gezeigt. Zur Erhöhung der Datenmenge wurden für die LDH-Aktivität zwei Messreihen aufgenommen. Es zeigt sich, dass die erste Messreihe der LDH-Aktivität etwa zehn Prozent unter der zweiten liegt, aber ab einer Pipettiergeschwindigkeit von acht Sekunden pro Hub liegen bei allen drei Kurven die Werte der automatischen Pipettierung unter den gemittelten manuellen Werten. Bei der gemittelten Vergleichsmessung lag die Standardabweichung der manuellen Pipettierung bei 2,3 % und die der automatischen bei 5,3 %. Die maximale LDH-Aktivität einer durch Ultraschallen zerstörten Zellprobe liegt bei circa $15000 \text{ nkat}\cdot\text{l}^{-1}$, das ist etwa doppelt so hoch wie bei einer Pipettiergeschwindigkeit von zwei Sekunden pro Hub. Ein weiterer Versuch wurde durchgeführt, um eine mögliche zeitlich versetzte Abnahme der Viabilität nach dem Pipettieren zu detektieren. Die Proben wurden wie in den vorherigen Experimenten mit unterschiedlichen Kolbengeschwindigkeiten pipettiert und sofort in die Gefäße für die automatische Zelldichtebestimmung überführt. Die Messung erfolgte erst nach einer Wartezeit von zehn Minuten. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4.16, Seite 73, dargestellt. Für Kolbenhubgeschwindigkeiten zwischen fünf und $15 \text{ s}\cdot\text{Hub}^{-1}$ ergibt sich für die Messungen nach zehnminütiger Wartezeit ein bis zu maximal 5 % höherer Totzellanteil. Die gemessenen Werte mit Wartezeit zeigen eine stärkere Streuung als die Messungen ohne Wartezeit. Allerdings liegen die Werte, bis auf die Messung mit $5 \text{ s}\cdot\text{Hub}^{-1}$, unter dem Mittelwert für manuelle Pipettierungen. Für die während des Probenmanagements verwendete Hubgeschwindigkeit von $10 \text{ s}\cdot\text{Hub}^{-1}$ zeigt sich eine Abweichung von 5 %.

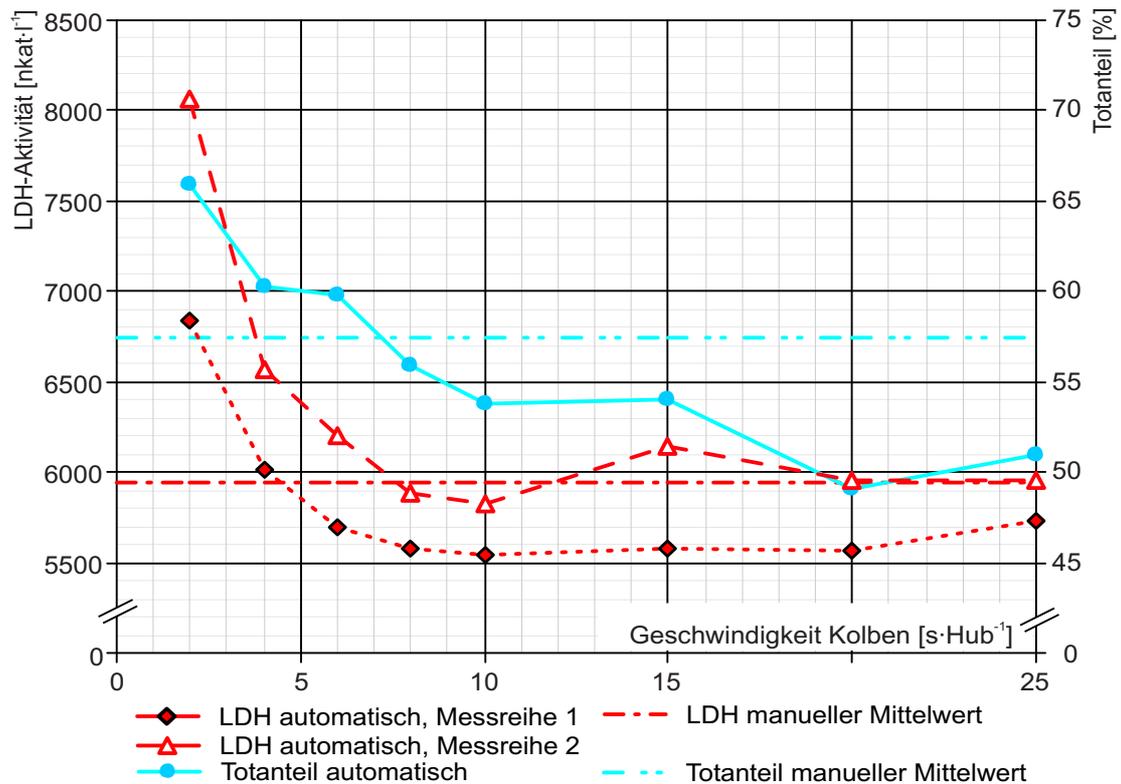


Abbildung 4.15: Messung der LDH-Aktivität und des Totanteils bei verschiedenen Geschwindigkeiten des Spritzenkolbens. Zur Erhöhung der Datenmenge wurden für die LDH-Aktivität zwei Messreihen aufgenommen.

Im Verlauf der Routine wird zuerst das Totvolumen in den Schläuchen gefüllt und die in der Spritze aufgenommene Luft durch den Ausgang am PSD/2 (Precision Syringe Drive) entfernt. Sollte das Totvolumen größer sein als das maximale Volumen der Spritze, so erfolgt das Füllen des Totvolumens in mehreren Schritten. Um mögliche Reste destillierten Wassers, die sich vom letzten Schritt der Spülroutine noch in den Schläuchen befinden könnten, zu entfernen beziehungsweise zu verdünnen, kann ein Vorspülen der Spritze mit Puffer ausgewählt werden. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die Zellen, die mit dem ersten Teil der Probe aufgenommen werden, auf Grund einer falschen Osmolarität geschädigt werden und somit zu einem falschen Messergebnis führen. Um den Verdünnungseffekt des Puffers aufzuheben wird die Spritze zusätzlich einmal komplett mit Probe gefüllt und dieser Teil in das Probenentnahmegefäß zurückgegeben, danach erfolgt die Aufnahme der tatsächlichen Probe.

Bei den ersten Kultivierungsexperimenten, bei denen zellhaltige Suspension pipettiert wurde zeigte sich, dass es eine deutliche systematische Abweichung zwischen den ermittelten Zellzahlen der automatischen und der manuellen Pipettierung gab. Dies kann zu einem daran liegen, dass Zellen an den Wänden oder Verbindungsstücken des Systems auf Grund von Oberflächenintraaktion zurückgehalten werden. Zum anderen kommt es innerhalb des

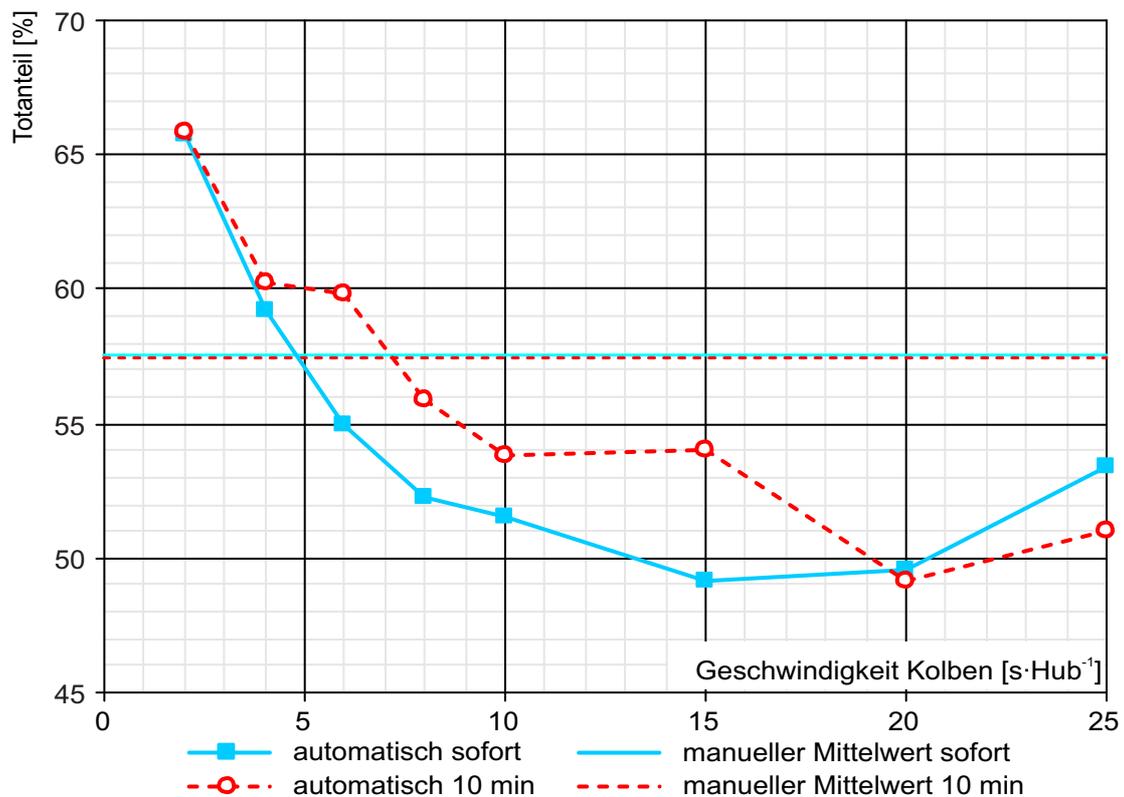


Abbildung 4.16: Vergleich einer Totanteilmessung bei verschiedenen Geschwindigkeiten des Spritzenkolbens. Die erste Messung erfolgte sofort nach der Entnahme des Aliquots, während die zweite Messung erst nach zehn Minuten vorgenommen wurde.

Systems zur Sedimentation von Zellen. Je länger es dauert bis der Roboter das Gefäß für die Abgabe des Aliquots in die richtige Position gebracht hat, desto größer wird dieser Einfluss werden. Zu diesem Effekt wurden Pipettierversuche mit zellhaltiger Kultursuspension gemacht. Die Ergebnisse von der ersten Messreihe sind in Abbildung 4.17, Seite 74, dargestellt. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und dann der Mittelwert aus diesen Messungen gebildet. Es zeigt sich, dass bei den einzelnen Messungen mit Verweilzeiten in der Pipettierstation deutliche Abweichungen der Messungen untereinander auftreten. Bei den sofort wieder ausgegebenen Proben ist dies nicht der Fall. Die Abweichung der höchsten zur niedrigsten Messung beträgt etwa -10%. Auch die manuell pipettierten Proben zeigen eine Abweichung von etwa -8%. Die Messung der Viabilität ist bei allen Messungen gut reproduzierbar. Die ermittelten Werte der Gesamtzelldichte liegen nach einer zehnmütigen Verweilzeit 3,5% unter den Werten ohne Verweilzeit. Die Abweichung gegenüber einer manuellen Pipettierung liegen sogar bei -6,2%. Die ermittelten Werte für die Lebendzelldichte weichen etwas stärker ab.

Erklärungsmöglichkeiten für die niedrigeren Werte der automatischen Pipettierung sind Sedimentation im System während der Verweildauer oder Adsorptionseffekte an den Ka-

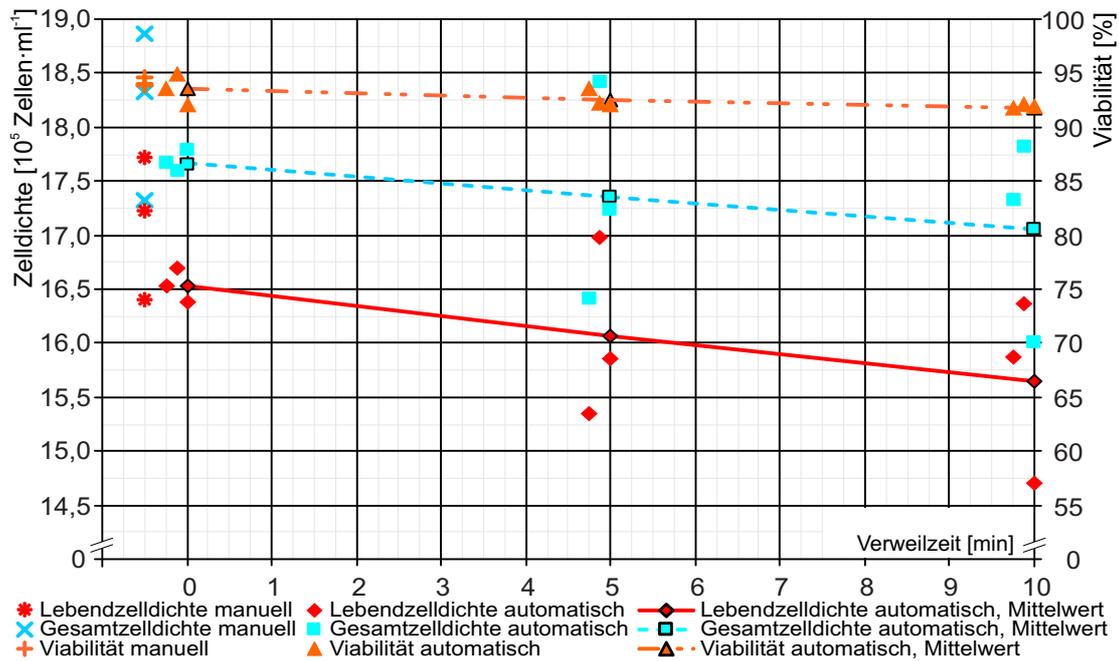


Abbildung 4.17: Veränderung der Zelldichte und Viabilität bei unterschiedlichen Verweilzeiten der Zellsuspension im System im Vergleich zur manuell pipettierten Ausgangszelldichte

pillarwänden. Im Mittel sedimentieren Zellen mit einem Zentimeter pro Stunde, das heißt schon nach sechs Minuten Verweilzeit sind sämtliche Zellen in einer waagrecht verlaufenden Kapillare vom Durchmesser 1 mm abgesunken und lassen sich im ungünstigen Fall nicht komplett herauspülen.

Die Entnahme der zellhaltigen Kulturflüssigkeit beschränkt sich immer auf den für die automatische Zellzählung notwendigen Milliliter, daher wurde nach diesen Versuchen die Pipettierstation so modifiziert, dass sich das zu entnehmende zellhaltige Aliquot in einem vertikalen Reservoir direkt über der Nadel befindet, siehe Abbildung 4.18 auf Seite 75. Wenn die Zellen sedimentieren, dann bewegt sich der Großteil der Zellen innerhalb des Volumenaliquots, das später wieder ausgegeben wird. Nur die Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe des Übergangs zur Nadel befinden setzen sich auf einer Oberfläche ab. Dieser Effekt würde die Zellzahl in diesem Probenspeicher etwas verringern. Mit der aus obigem Beispiel angenommenen Sedimentationszeit von sechs Minuten würden nur 2,8 % der in diesem Milliliter enthaltenen Zellen sedimentieren. Ein Sedimentieren von Zellen aus der angeschlossenen Kapillare in den Probenspeicher hinein, ist auf Grund des geringen Durchmessers der Kapillare zu vernachlässigen.

Bei der unter diesen Bedingungen aufgenommenen Messreihe, siehe Abbildung 4.19 auf Seite 76, wurde vor jeder automatischen Pipettierung mit Verweilzeit eine manuelle dreifach Messung zur Ermittlung des aktuellen Referenzwerts durchgeführt. Auch hier zeigen sich systematisch Abweichungen der Mittelwerte der automatisch pipettierten Proben ge-

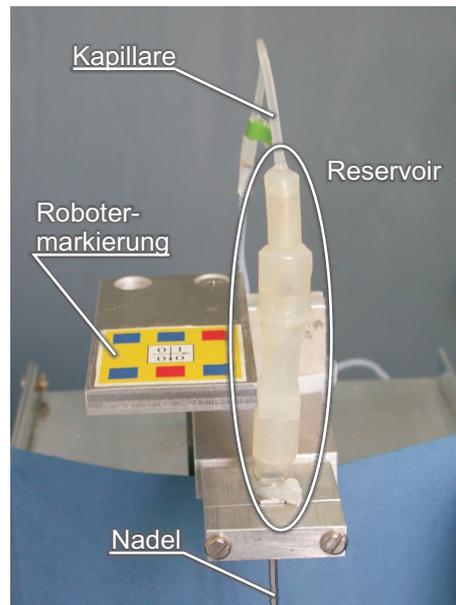


Abbildung 4.18: Das Reservoir für das zellhaltige Aliquot oberhalb der Nadel

genüber den Mittelwerten der manuell pipettierten Proben. Die Abweichungen liegen im Bereich um fünf Prozent. Allerdings lässt sich bei den automatischen Proben eine zeitliche Tendenz erkennen. Die später pipettierten Proben liegen in den Werten für die Zelldichten und die Viabilität niedriger. Dieses kann dadurch hervorgerufen worden sein, dass der niedrigere Mittelwert der automatischen Proben nicht durch einen Effekt der Pipettierstation, sondern durch eine Veränderung der Ausgangsprobe über die Zeit hervorgerufen wurde. Die farbliche Änderung der Probe vom normalen „Himbeer-Rot“ zu dunklerem „Purpur“ ist durch die Ausgasung des gelösten CO_2 und damit einhergehender pH-Wert Änderung normal. Bei dieser Probe war die Farbänderung über den Messzeitraum von 90 Minuten stärker als normal. Wenn man davon ausgeht, dass die Veränderung der Probe nicht linear voranschreitet, sondern dass der Effekt nach einer Weile abnimmt, erklärt das auch, dass die Proben mit zehn Minuten Verweilzeit zueinander eine geringere Abweichung aufweisen als die früheren Proben. Folglich kann man aus diesem Grund für die Beurteilung der Abweichung der manuellen zur automatischen Probe nur die erste automatische Probe betrachten. Diese Probe liegt dann gut im Bereich der manuellen Proben und die Abweichung von manueller zu automatischer Pipettierung wird sehr viel geringer. In diesem Fall muss also davon ausgegangen werden, dass die Intention durch eine Mittelung der Messwerte eine größere statistische Sicherheit zu erzielen nicht erreicht wurde und eher das Gegenteil der Fall war.

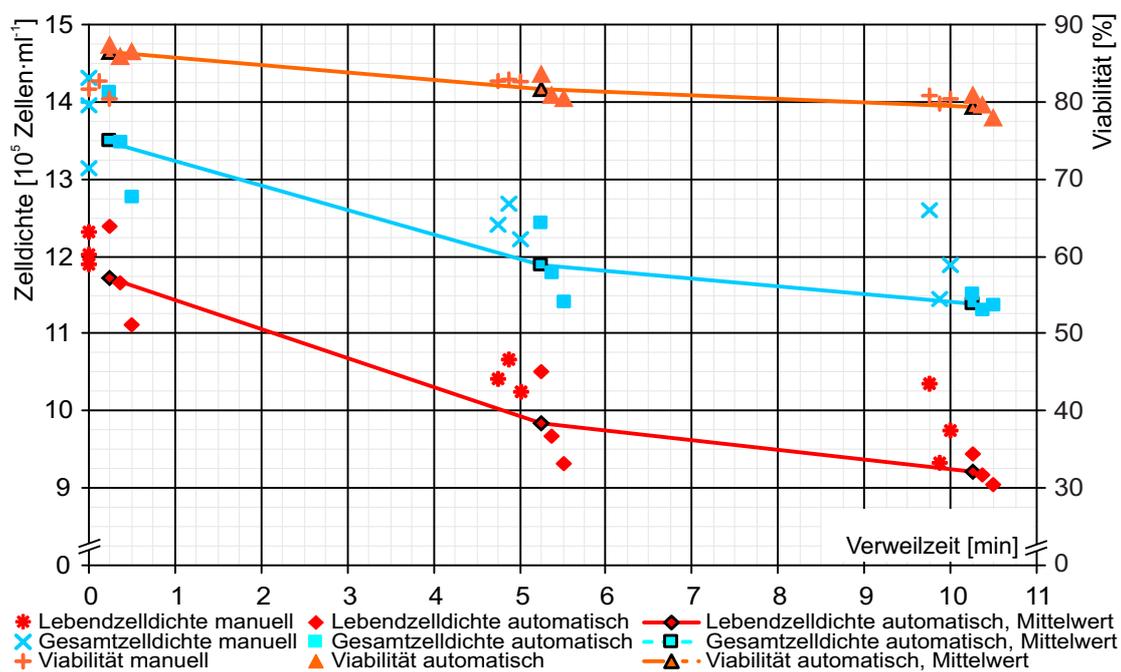


Abbildung 4.19: Veränderung der Zelldichte bei unterschiedlichen Verweilzeiten der Zellsuspension im System im Vergleich zu jeweils manuell pipettierten Ausgangszelldichten. Die zeitlichen Abstände der einzelnen Proben zueinander sind nur für die Unterscheidbarkeit eingeführt und geben nicht die reale Dauer zwischen den Pipettierungen wieder!

4.2.4 Desintegrieren von Aggregaten

Das automatische Zellzählgerät CEDEX benötigt eine Suspension von vereinzelt Zellen, um die korrekte Zelldichte zu ermitteln. Kleinere Aggregate, bis zehn Zellen, können ausgewertet werden. Bei größeren Aggregaten beginnen die ermittelten Werte ungenau zu werden, da die räumliche Ausdehnung des Aggregats nicht mit berücksichtigt werden kann. Diese Bilder werden von der Ermittlung der Zelldichte automatisch ausgeschlossen. Durch dieses Vorgehen ist die ermittelte Zelldichte geringer als die tatsächlich vorliegende. Kulturen, in denen sich aggregierende Zellen befinden, sollten daher vor der Messung mit einer Enzymlösung, welche die Aggregate auflöst, behandelt werden. Ein Problem für den Dauerbetrieb der Aggregatauflösung ist allerdings die Aufbewahrung der Enzymlösung, da diese aus Stabilitätsgründen gekühlt erfolgen sollte. Der Anschluss an die Pipettierstation und die in den Schläuchen stehende Lösung kann nicht oder nur mit größerem Aufwand gekühlt werden. Für die hier durchgeführten Versuche wurde immer frische, gekühlt aufbewahrte Enzymlösung benutzt, die nur während der Versuchsdauer an die Pipettierstation angeschlossen wurde.

Anders als bei der Aufnahme der Probe, bei der das Totvolumen gefüllt bleibt, muss für die Aggregatlöseroutine das Totvolumen geleert werden. Ein weiterer Teil der Probe wird verworfen und der Rest mit der Enzymlösung gemischt. Während dieser Prozedur kommt es zu Tröpfchenbildung an den Wänden der Kapillaren. Des Weiteren verbleibt etwas Restflüssigkeit in der Mischkammer. Aus diesem Grund wird die Aggregatlöseroutine mit einem Volumen durchgeführt, das größer als die später benötigte Probenmenge ist. Das zusätzlich benötigte Volumen wird aus dem überschüssigen Totvolumen zurückbehalten und der Rest der Probe wird verworfen. Von diesem Volumen ausgehend wird nun ein weiterer Teil verworfen. Die Menge hängt vom Mischverhältnis des verwendeten Enzyms ab. Zum Schluss wird die benötigte Menge Enzym aufgenommen.

Es wurden Vorversuche über die Zählbarkeit von Aggregaten mit dem Zellzählgerät CEDEX im Vergleich zu manuellen Zählungen durchgeführt. Diese Versuche sind in Kapitel 4.3, ab Seite 81, dargestellt. Weitere Versuche wurden mit verschiedenen Enzymlösungen durchgeführt. Zum einen wurde die Enzymlösung AccuMax (PAA, Pasching, Österreich) eingesetzt. Die Mischung erfolgt hierbei im Verhältnis 1:2. Des Weiteren wurde TrypsinEDTA 0,25 % (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) im Mischverhältnis 1:10 verwendet.

Bei den für die Versuche verwendeten Zellen wurde für die manuelle Zellzählung eine Behandlung mit Trypsin-EDTA für zehn Minuten durchgeführt. Nach einer gründlichen Durchmischung der Probe war für die folgende Einwirkzeit keine weitere Durchmischung erforderlich. Erst vor der eigentlichen Zählung wurde die Suspension mit der Pipette nochmals durchmischt. Für die automatische Aggregatlöseroutine wurden die entsprechenden Mengen Probe und Enzym aufgenommen und wie bei der manuellen Behandlung eine Einwirkzeit von zehn Minuten gewählt. Um der Gefahr der Sedimentation der Zellen und Aggregate in der Spritze zu entgehen wurde die Suspension zwischen der Spritze und der Mischkammer hin- und hergepumpt. Zur Schonung der Zellen wurde die Anzahl der Passagen durch die Kapillaren reduziert und nach jedem Umpumpen eine Pausenzeit eingehalten.

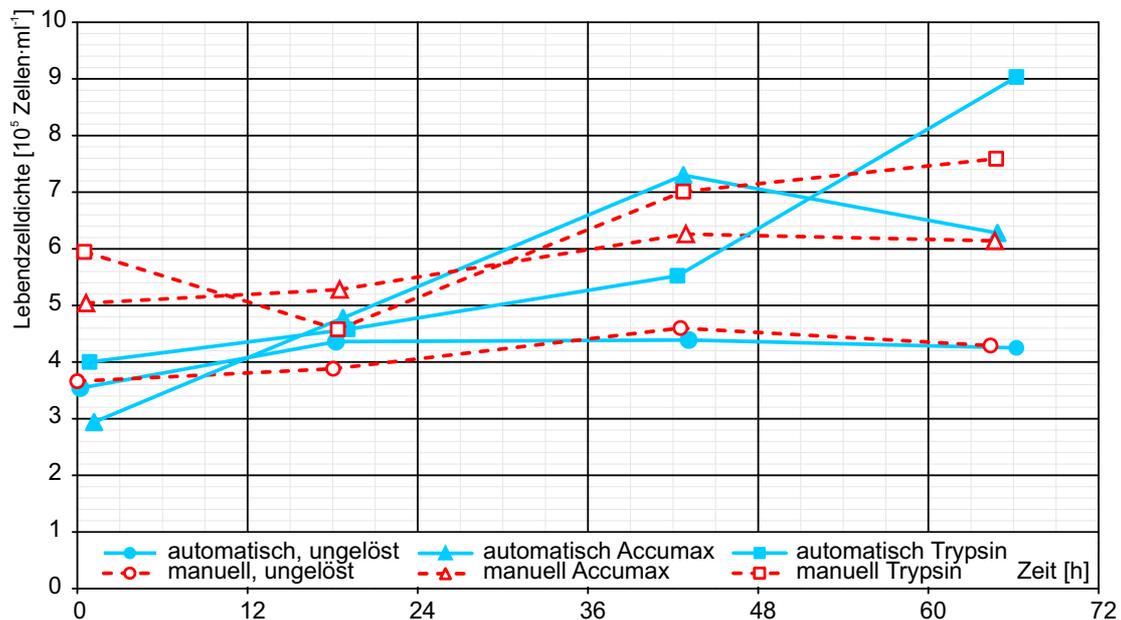


Abbildung 4.20: Versuch zur Auflösung von Aggregaten, Lebendzellzahl. Von jeder genommenen Probe wurden jeweils drei Proben automatisch und drei Proben manuell behandelt. Von diesen drei Proben wurde jeweils die Zellzahl bestimmt. Eine Probe wurde ohne Vorbehandlung gemessen, die anderen beiden nach einer enzymatischen Behandlung mit Trypsin-EDTA beziehungsweise AccuMax. Für den Versuch wurden CHO-Zellen aus einer 2 l Kultivierung verwendet.

ten. Da die Zellsuspension bei der manuellen Behandlung während der Einwirkzeit nicht geschüttelt wurde, ist in diesem Fall eine Pausenzeit von zehnmal größerer Dauer gewählt worden, als das Umpumpen der Suspension dauert. Diese Zeit kann über den Parameter „Active“ der Pipettensteuerung variiert werden.

Während einer Kultivierung von CHO-Zellen, die Aggregate bildeten, wurde eine vergleichende automatische Zellzählung von unterschiedlich behandelten Proben durchgeführt. Die Kultur wurde jeden Tag im Verhältnis 1:2 ausverdünnt, so dass sich jeden Tag annähernd die gleiche Zellzahl ergab. Es wurden jeweils manuell und automatisch Proben pipettiert, bei denen entweder unbehandelt oder nach einer enzymatischen Behandlung mit Trypsin oder AccuMax die Zelldichte und Viabilität bestimmt wurden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.20, Seite 78, und 4.21, Seite 79, dargestellt. Zum ersten Probezeitpunkt 0 h liegen die Werte der manuell behandelten Proben deutlich über den Ausgangswerten. Die automatische Trypsin-Behandlung der Probe erhöht die Zellzahl nicht signifikant, die AccuMax-Probe liegt sogar unter dem Ausgangswert. Zum Zeitpunkt 18 h ist diesmal für alle Proben keine Erhöhung der Zellzahl durch die enzymatische Behandlung erkennbar, allerdings liegen die ermittelten Werte insgesamt gleichmäßiger beieinander als zu den anderen Probenentnahmezeitpunkten. Für die zwei folgenden Proben liegen die Werte der

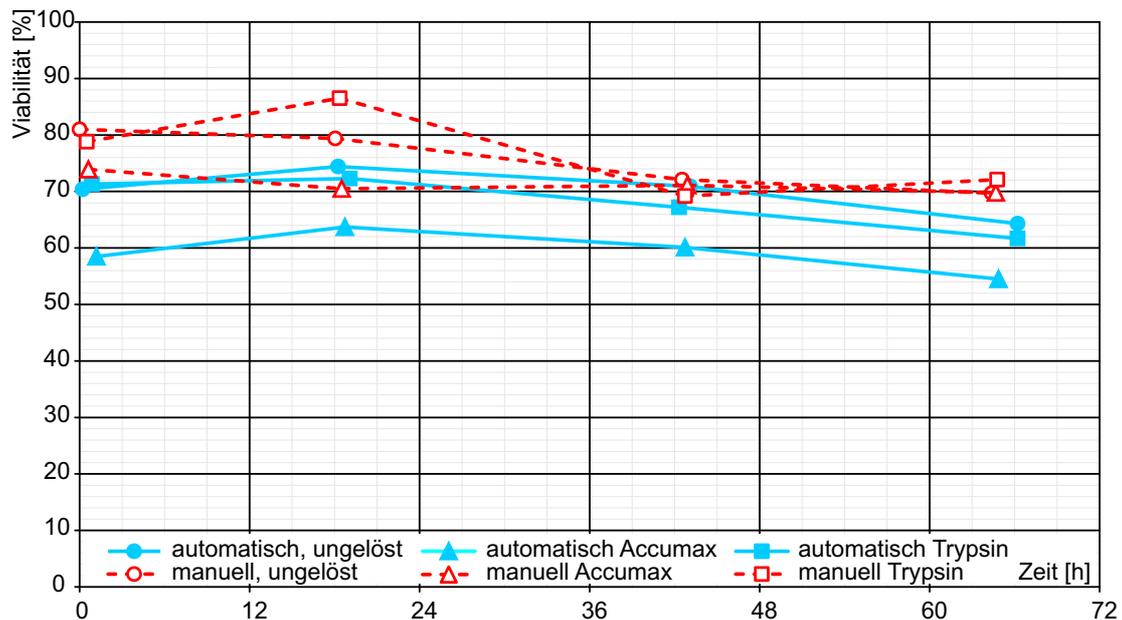


Abbildung 4.21: Versuch zur Auflösung von Aggregaten, Viabilität. Von jeder genommenen Probe wurden jeweils drei Proben automatisch und drei Proben manuell behandelt. Von diesen drei Proben wurde jeweils die Viabilität bestimmt. Eine Probe wurde ohne Vorbehandlung gemessen, die anderen beiden nach einer enzymatischen Behandlung mit Trypsin-EDTA beziehungsweise AccuMax. Für den Versuch wurden CHO-Zellen aus einer 2 l Kultivierung verwendet.

behandelten Proben deutlich über den unbehandelten, ein systematischer Unterschied zwischen den automatischen und den manuellen Proben ist nicht erkennbar.

Die automatisch mit AccuMax behandelte Probe liegt mit ihrer Viabilität systematisch mindestens sechs Prozent unter den anderen Proben, allerdings lassen sich für die restlichen Proben keine eindeutigen Aussagen treffen. Es scheint, dass die Aggregat-Desintegration keinen Einfluss auf die so ermittelte Viabilität hat.

Etwas bessere Aussagen lassen sich treffen, wenn man die für die automatische Zellzählung aufgenommenen Bilder betrachtet. Man erkennt die Anzahl und Größe der Zellaggregate und kann auch erkennen welche Bilder vom CEDEX nicht ausgewertet wurden, da die Aggregate für eine Zählung zu groß waren. Auf den Bildern für die manuelle Auflösung der Aggregate sind trotz Enzymeinsatzes noch sehr viele Aggregate erkennbar, während die automatische Auflösung in diesem Fall weniger Aggregate hinterlassen hat. Die Vermutung, dass Aggregate in der Spritze oder Mischkammer sedimentiert sind, und aus diesem Grund nicht mehr auf den Bildern erscheinen, kann ausgeschlossen werden, da die ermittelte Zelldichte für die Aggregat-Löseroutine über alle Messungen auf jeden Fall höher ist als die Messungen der unbehandelten Proben.

Durch diese variierenden Ergebnisse lässt sich sagen, dass es sehr wichtig ist die Abstimmung der Enzyme und die Durchführung der Versuche auf die jeweilige Zelllinie und Kultivierungsbedingung anzupassen, so dass sichergestellt ist, dass auch wirklich alle Aggregate gelöst werden.

4.2.5 Reinigen und Spülen

Beim Säubern der Spritze und der Kapillaren wird zwischen Spülen und Reinigen unterschieden. Beim Spülen werden Spritze und Schläuche einmal mit Ethanol geflutet und danach mit destilliertem Wasser durchgespült. Das Wasser wird danach wieder aus der Spritze hinausgedrückt, so dass nur eine geringe Restmenge Wasser in den Schläuchen und der Spritze verbleibt. Im Gegensatz dazu wird beim Reinigen mit Detergenz gearbeitet, so dass mögliche Rückstände gelöst und vollständig entfernt werden können. Danach wird wiederum mit destilliertem Wasser gespült und dieses hinausgedrückt. Beide Routinen können sowohl mit, wie auch ohne Auffangbehälter durchgeführt werden.

4.2.6 Zusammenfassung

Die Sedimentation der Zellen in den Komponenten der Pipettierstation ist der kritischste Faktor beim mechanischen Aufbau und Betrieb der Pipettierstation. Diese Tatsache muss berücksichtigt werden. In dem während der Kultivierungen durchgeführten Probenmanagement wird das Probenentnahmegefäß zuerst in der Zentrifuge abgesetzt. Die Zentrifugation wird gestartet und danach das Gefäß zur Aufnahme des zellhaltigen Aliquots vorbereitet. Dieser Ablauf dauert im Mittel fünf Minuten, bei einer ungünstigen Situation an der Zentrifuge, zum Beispiel Rotorstellung oder Bildverarbeitung, oder einem Hindernis auf der Fahrtstrecke kann die Zeitdauer deutlich länger werden. Die Sedimentation macht sich vor allem bei geringen Volumina und längerer Verweildauer im System bemerkbar. Weiterhin wird durch die Wahl der Pipettiergeschwindigkeit die mechanische Belastung der Zellen im System beeinflusst. Beim Einsatz des Systems mit empfindlichen Zelllinien müssen gegebenenfalls Tests durchgeführt und die Pipettiergeschwindigkeit herabgesetzt werden.

Eine Pipettierstation, die die Probe nach der Aufnahme sofort in ein weiteres Gefäß abgibt, wäre eine Alternative, um die Sedimentation der Zellen im System zu verhindern. Dadurch wäre die Verweilzeit eliminiert und die Sedimentation der Zellen entfällt. Eine weitere Möglichkeit die Verweilzeit im System zu reduzieren wäre eine Pipettierstation, die es erlaubt die Nadel horizontal auf verschiedene Positionen zu schwenken. Nach Entfernen des Probenentnahmegefäßes, könnte das Aliquot sofort in ein vorbereitetes Gefäß abgegeben werden.

Durch eine schwenkbare Nadel könnte auch die Reinigungs- und Spülroutine verbesserte werden. Die Nadel könnte direkt oberhalb eines Auffangbehälters positioniert werden, so dass die abgegebene Reinigungsflüssigkeit aufgenommen werden könnte.

4.3 Automatisches Zellzählsystem Cedex

Während einer Kultivierung von CHO-Zellen, die zur Aggregation neigen, wurden Versuche zur Auswertung der Zelldichte und Viabilität durch das CEDEX gemacht. Für diese Versuche wurden dem CEDEX Proben sowohl unbehandelt, wie auch nach einer fünf- beziehungsweise zehnmütigen Behandlung mit der Enzymlösung AccuMax zugeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.22, Seite 81, und 4.23, Seite 82, dargestellt. Während aller Kultivierungen liegt die Lebendzellichte der sofort gemessenen unbehandelten Probe deutlich unter den Ergebnissen der enzymatisch behandelten Proben. Dies ist zu erwarten, da Aggregate mit mehr als zehn Zellen vom CEDEX nur unvollständig ausgezählt werden. Weiterhin liegen die Zelldichten für Proben, die zehn Minuten mit der Enzymlösung AccuMax behandelt wurden, zwischen fünf und fünfzehn Prozent über den Werten der nur fünfminütigen Einwirkzeit. Die manuelle Zelldichtebestimmung, die nach einer Behandlung mit Trypsin durchgeführt wurde, korrespondiert während der ersten drei Kultivierungen sehr gut mit den automatisch ermittelten Werten. Für die während der vierten Kultivierung beginnende und in der fünften Kultivierung kontinuierlich niedrigere Zelldichte der manuellen Messung können äußere Einflüsse ausgeschlossen werden. Es hat zwar die Via-

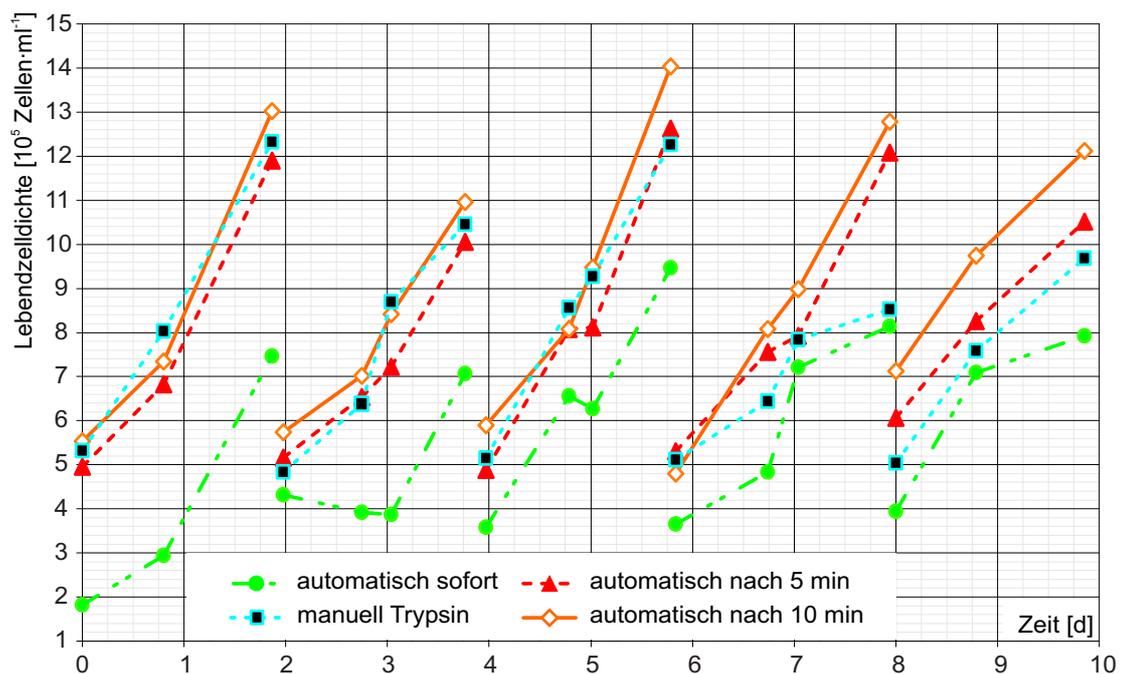


Abbildung 4.22: Repeated Batch Kultivierung einer CHO-Zelllinie im 2l Maßstab. Die Lebendzellichte wurde für jeden Probenentnahmezeitpunkt einmal manuell und dreimal automatisch bestimmt. Die manuelle Zählung erfolgte nach einer Behandlung mit Trypsin, für die automatischen Zählungen wurden die Proben einmal unbehandelt gezählt, die weiteren Zählungen wurden nach einer Behandlung mit AccuMax für fünf beziehungsweise zehn Minuten durchgeführt.

bilität der Zellen über die Dauer der Kultivierung stetig zugenommen, allerdings lag die höchste Wachstumsrate während der dritten Kultivierung vor und war während der letzten Kultivierung am geringsten. Dass dies einen Einfluss auf die enzymatische Behandlung hat ist nicht anzunehmen.

Der Kurvenverlauf für die Viabilität der Kultivierung zeigt zwischen den verschiedenen automatisch gemessenen Proben keine signifikanten Unterschiede. Das lässt darauf schließen, dass sich der Fehler in der Ermittlung der Zelldichten auf Grund der Aggregate sowohl für lebende Zellen wie auch tote Zellen gleich auswirkt. Die kontinuierlich höhere Viabilität der manuellen Zählung könnte an der Interpretation der Erscheinung der Zellen im mikroskopischen Bild liegen oder auch in der Verwendung von Trypsin anstelle von AccuMax. Mit Berücksichtigung der Ergebnisse für die Aggregatlöse-Routine der Pipettierstation, siehe Kapitel 4.2.4 ab Seite 77, bei denen sich kein systematischer Unterschied zwischen den mit Trypsin beziehungsweise AccuMax behandelten Proben feststellen ließ, kann man sagen, dass sich die höhere Viabilität durch eine andere Interpretation der als tot erkannten Zellen ergibt.

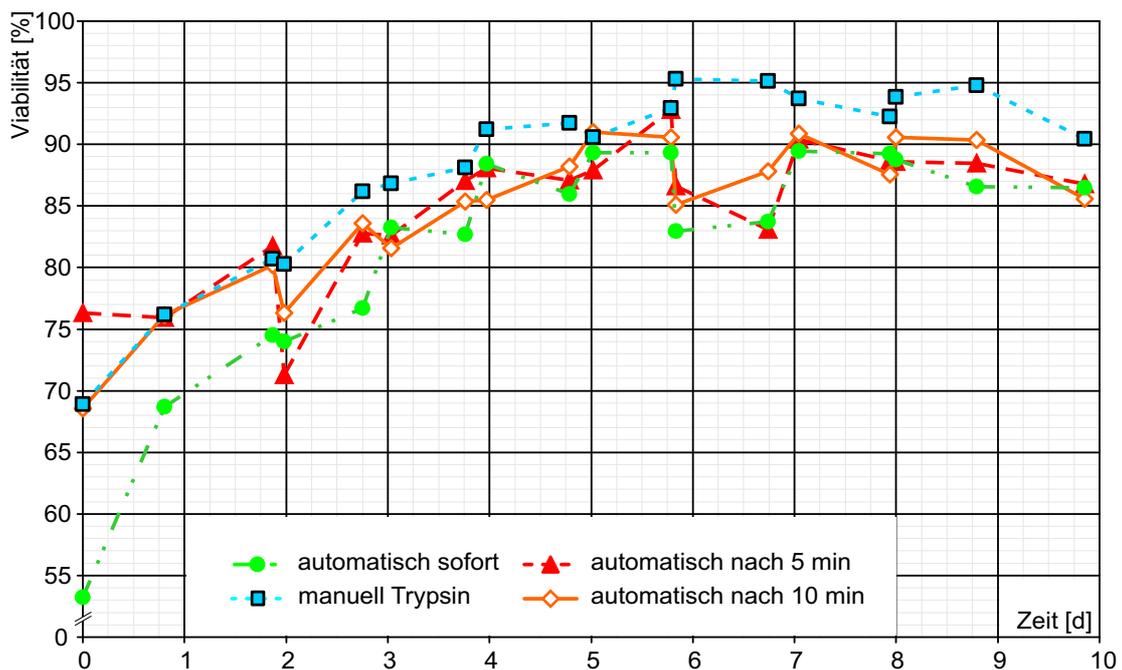


Abbildung 4.23: Repeated Batch Kultivierung einer CHO-Zelllinie im 2l Maßstab. Die Viabilität wurde für jeden Probenentnahmezeitpunkt einmal manuell und dreimal automatisch bestimmt. Die manuelle Zählung erfolgte nach einer Behandlung mit Trypsin, für die automatischen Zählungen wurden die Proben einmal unbehandelt gezählt, die weiteren Zählungen wurden nach einer Behandlung mit AccuMax für fünf beziehungsweise zehn Minuten durchgeführt.

4.3.1 Zusammenfassung

Das CEDEX eignet sich gut für die automatische Bewertung von Zellproben, in denen die Zellen vereinzelt vorliegen. Kleine Aggregate können gezählt werden, allerdings muss für stärker aggregierende Zelllinien eine automatische Aggregatlöse-Routine mit der Pipettierstation durchgeführt werden, um korrekte Ergebnisse zu erhalten. Dazu müsste die Aggregatlöse-Routine entweder prinzipiell für jede Probe durchgeführt werden, oder aber eine Möglichkeit geschaffen werden Anzahl und Größe der Aggregate zu detektieren. Das CEDEX bietet hierbei einen Ansatz für ein solches Detektionskriterium. Es besteht die Möglichkeit die Anzahl der aufgenommenen und der ausgewerteten Bilder abzufragen. Das CEDEX-System schließt Bilder, die nicht ausgewertet werden können, automatisch aus der Berechnung aus und macht eine zusätzliche Aufnahme. Daher ergibt sich aus den Werten für aufgenommene und ausgewertete Aufnahmen eine Differenz, die einen Hinweis darauf liefert, dass möglicherweise Aggregate vorliegen.

Für den komplett automatischen Betrieb des CEDEX wäre eine Füllstandsmessung der Reagenzienbehälter notwendig. Durch einen rechtzeitigen Alarm kann verhindert werden, dass auf Grund fehlender Reagenzien eine Messung nicht durchgeführt werden kann. Ein paar Zustände des Systems, die während eines automatischen Betriebs vorkommen können, lassen sich nicht so leicht verhindern. Dieses sind zum Beispiel Luft im System, blockierte Kapillaren oder eine Verunreinigung der Zählkammer. Diese Vorkommnisse machen in den meisten Fällen einen Benutzereingriff notwendig. Eine Verunreinigung der Zählkammer kann vom System detektiert werden, da vor dem Start einer Messung eine optische Kontrolle des Kammerbildes durchgeführt wird. Dieses könnte dann in Messprotokoll vermerkt werden. Tritt eine Verunreinigung, wie zum Beispiel Luft im System, erst nach dieser Kontrolle auf, dann wird das Bild automatisch nicht in die Auswertung einbezogen. Es gibt allerdings keine zusätzliche Fehlermeldung über die der Benutzer informiert wird. Das heißt, während der Fernsteuerung kann dieser Zustand mit dem System nicht erkannt werden. Die Möglichkeit zur Detektion dieses Problems besteht, wie bereits geschildert, in der Auswertung der Anzahl der aufgenommenen Bilder im Vergleich zur Anzahl der für die Berechnung des Ergebnisses verwendeten Bilder.

4.4 Weitere Roboterhilfen

4.4.1 Barcodescanner

Die Barcodes werden mit einem Laserdrucker ausgedruckt und vertikal fast vollständig um das Gefäß herum geklebt. Es bleibt ein kleiner Spalt bestehen, in dem die Bezeichnung des Gefäßes im Klartext lesbar ist. Dadurch, dass ein Scanner mit Rasterstrahl verwendet wird, ist die Lücke innerhalb der Erkennungszone kein Problem. In ausreichendem Abstand vom Scanner ist die Auffächerung des Strahls weit genug, so dass einer der Strahlen immer die maschinenlesbare Markierung trifft. Der Scanner und zwei markierte Gefäße sind in Kapitel 2.9.1 in Abbildung 2.15, Seite 39, gezeigt.

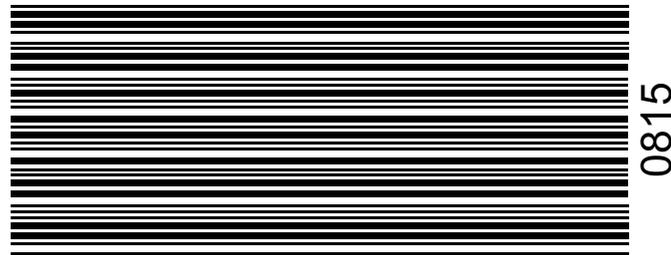


Abbildung 4.24: Beispiel eines Barcodes mit dem die Probengefäße markiert werden. Im Seitenformat A4 erfolgt die Darstellung in der Originalgröße.

In Abbildung 4.25, Seite 85, sind die gelesenen und an das MFCS (Prozeßleitsystem) übertragenen Barcode-Werte dargestellt. Die Zuordnung erfolgt in diesem Fall über die Kultivierungsdauer. Zu dem Zeitpunkt an dem sich der Wert ändert wurde eine Probe genommen und die Markierung ausgelesen. Eine weitere Möglichkeit die Nummerierung der Probe auszulesen besteht über die Protokolldatei.

4.4.2 Zentrifuge

Nach Implementierung der Ansteuerung, siehe dazu auch Kapitel 2.9.2, ab Seite 41, wurde die Zentrifuge im automatischen Betrieb eingesetzt. Die Übertragung von Drehzahl, vorgewählter Zeit und Abfrage des Deckelschalters funktionierte in allen Fällen. Der Einsatz des Deckelschalters wurde durch den Einsatz des Kraft/Momentensensors des Roboters entbehrlich. Näheres dazu findet sich in der Dissertation von Torsten Scherer [Scherer, 2004].

4.4.3 Prozessleitsystem (MFCS)

Während eines Vorversuchs wurde das CEDEX-System ferngesteuert, so dass die ermittelten Ergebnisse automatisch vom DCS (Device Control System, Laborsteuerprogramm) in das

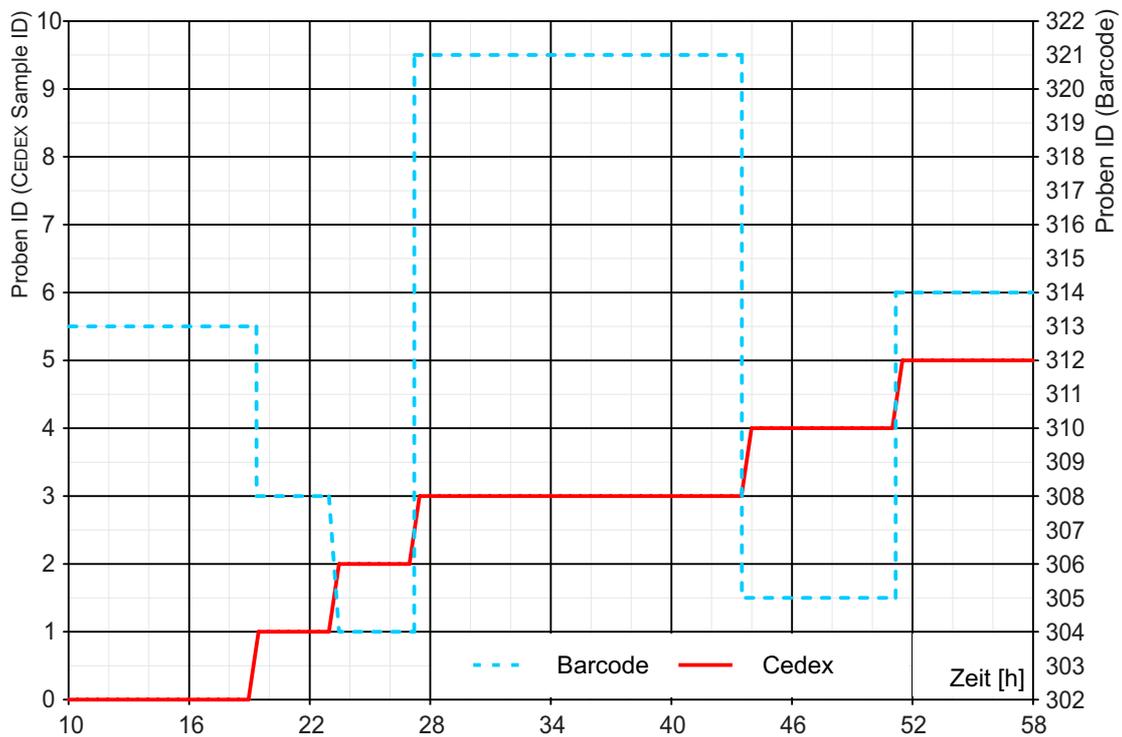


Abbildung 4.25: Automatische Datenübertragung. Die Nummerierungen der Barcodelesungen und CEDEX-Messungen werden automatisch in das MFCS übertragen.

MFCS (Multi Fermenter Control System) übertragen wurden. Die Proben wurden dem CEDEX dabei manuell zugeführt. Die während dieses Versuchs erzeugten Ergebnisse sind in Abbildung 4.26, Seite 86, dargestellt.

4.4.4 Zusammenfassung

Die Ansteuerung von Barcodescanner, Zentrifuge und MFCS konnte durchgeführt werden. Selbst bei absichtlich beschädigten Barcodes klappte die Decodierung fast jedes Mal bei der ersten Lesung. Nach einer fehlgeschlagenen Lesung wird dem Roboter der Befehl erteilt die Positionierung des Gefäßes etwas zu verändern, danach wird eine erneute Lesung gestartet. Die gespeicherten Daten von Zentrifuge und MFCS können aus der Datenbank abgerufen werden. Die Routinen sind für den Einsatz im Gesamtsystem geeignet.

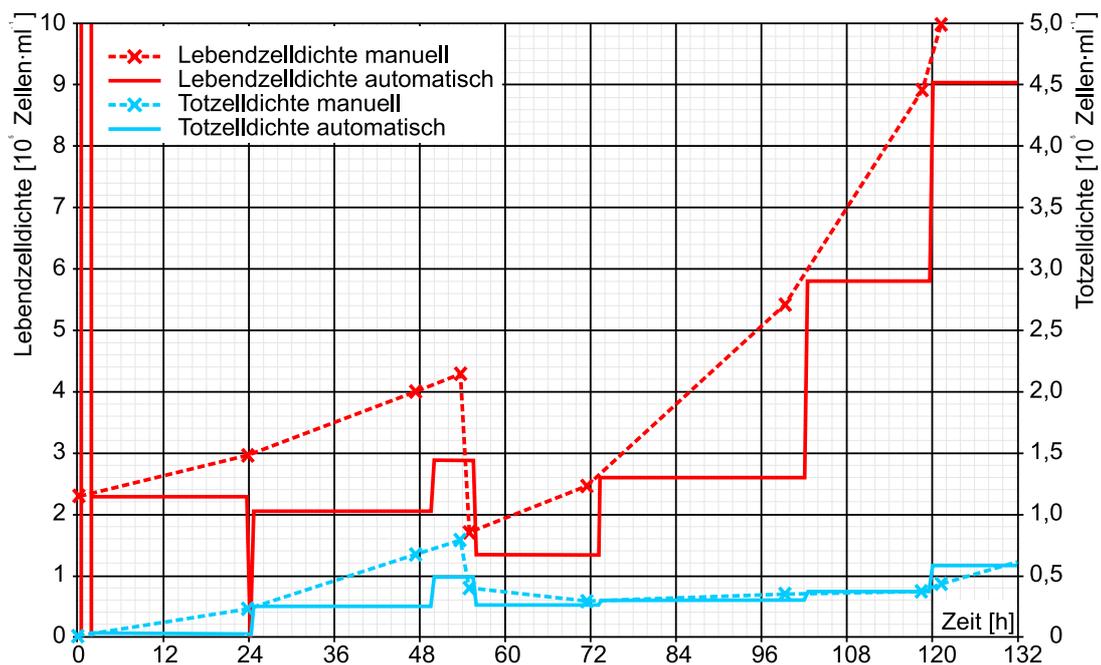


Abbildung 4.26: Beispiel einer Kultivierung mit automatischer Übertragung der Daten an das MFCS (treppenförmige Kurve). Die mit Kreuzen markierte Kurve sind manuelle Vergleichsmessungen, die über das Sampedata Modul an das MFCS übergeben wurden. Während der Vorkultur, bis zum Zeitpunkt 54 h, wurde die Probenentnahme am Ernteventil durchgeführt. Die Probenentnahme während der 20 l Kultivierung, ab 54 h, erfolgte am Probenentnahmeventil.

Kapitel 5

Roboterisierte Kultivierungen

Mit dem Gesamtsystem wurden mehrere Kultivierungen durchgeführt. Die Zuverlässigkeit der einzelnen Geräte wurde bereits in den vorherigen Kapiteln dargelegt, das Zusammenspiel der Komponenten und mögliche zeitliche Effekte können sich nur in der Durchführung aller Aktionen im korrekten zeitlichen Ablauf zeigen. Für die Probenentnahme wurde in allen Fällen der ELVAMAT eingesetzt. Die Kultivierungen erfolgten im 20 l Maßstab mit Hybridom- und rekombinanten CHO-Zelllinien. Die Zellzahlbestimmung für eine manuell durchgeführte Probenentnahme wurden mit dem CEDEX als Doppelbestimmungen durchgeführt. In Tabelle 5.1, Seite 87, sind die allgemeinen Kultivierungsparameter aufgeführt.

Tabelle 5.1: Standard-Kultivierungsparameter

Parameter	Wert
Temperatur	37 °C
pH	7,2
pO ₂	40 %
Reaktorüberdruck	200 mbar

5.1 Kultivierung einer Hybridomzelllinie

Während der Kultivierung wurde eine stufenweise Vorkultur durchgeführt. Vom Zeitpunkt Null bis 53,5 h betrug das Reaktorvolumen zehn Liter. Bis zum Zeitpunkt 75,3 h wurde mit elf Litern und bis zum Zeitpunkt 94,2 h mit 14,5 l kultiviert. Ab 94,7 h war der Reaktor mit dem Arbeitsvolumen von 20 l gefüllt. Die Kultivierung wurde mit einer Rührerdrehzahl von 20 U·min⁻¹ gestartet. Im Zeitraum von 32,2 h bis 48,1 h wurde mit 35 U·min⁻¹ gerührt, danach betrug die Drehzahl 50 U·min⁻¹. Die Kopfraumbegasung betrug bis zum Zeitpunkt

94,7 h $10 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$, danach $50 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Blasenbegasung zur Regelung des pO_2 wurde während der gesamten Kultivierung mit $20 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$ durchgeführt.

Die manuelle Probenentnahme erfolgte während der Vorkultur mit zehn Litern durch das im Boden des Reaktors eingelassene Ernteventil. Ab dem Reaktorfüllstand von 14 l, zum Zeitpunkt 77 h, wurde die manuelle Probenentnahme durch das Probenentnahmeventil an der Reaktorseite durchgeführt.

Abbildung 5.1, Seite 90, zeigt den Verlauf der ermittelten Lebend- und Totzellichten, Viabilität und Reaktorvolumen. Für die Viabilität und die Totzellichte sind der mit dem autonomen System ermittelte Wert sowie der Mittelwert aus einer dem Reaktor manuell entnommenen und mit dem CEDEX ausgewerteten Doppelbestimmung dargestellt. Zur Verdeutlichung der Schwankungen zwischen mehrfachen Messungen der selben Probe sind für die Lebendzellichte, zusätzlich zum Mittelwert, die der Doppelbestimmung zu Grunde liegenden Einzelmessungen gezeigt.

Während der Vorkultur liegen die Werte der Viabilität für die manuelle Probenbearbeitung häufig höher als die der automatischen Probenbearbeitung. Allerdings gibt es auch sehr gute Übereinstimmungen wie zum Beispiel zu den Zeitpunkten 49 h und 73,8 h. Während der Kultivierung mit 20 l Arbeitsvolumen sind die Abweichungen der ermittelten Werte zueinander kaum noch erkennbar. Aus diesem Grund kann man sagen, dass es keine systematischen Abweichungen der Viabilitätswerte von manueller und automatischer Probenbearbeitung gibt. Eine Beeinflussung der Viabilität durch das autonome System kann also ausgeschlossen werden.

Für die Werte der ermittelten Zelldichten muss eine differenziertere Betrachtung angestellt werden. Die Ergebnisse, der mit dem autonomen System gemessenen Lebendzellichten, liegen während der gesamten Kultivierung unter denen der manuell bearbeiteten Proben. Auch hier sind die Werte während der Vorkultur mit größeren Abweichungen behaftet als im Betrieb bei Arbeitsvolumen. Zu drei Zeitpunkten, 97,0 h, 117,2 h, und 134,0 h, liegt der mit dem autonomen System ermittelte Wert in guter Übereinstimmung mit dem niedrigeren Wert, der in der manuellen Doppelbestimmung gemessenen Werte. Für die Totzellichte ergeben sich im Mittel etwas geringere Abweichungen zwischen manuellen und automatischen Bestimmungen. Allerdings liegen auch hier bis auf zwei Messungen alle Ergebnisse der automatischen Proben unter denen der manuell ermittelten. Für die Totzellichte beträgt die gemittelte Abweichung für die Arbeitskultivierung -6,0 % im Vergleich zu -9,4 % für die Lebendzellichte. Die automatisch ermittelten Werte wurden dabei auf die manuelle Probe bezogen.

Abbildung 5.2, Seite 91, zeigt einen Vergleich zwischen Viabilität und mittlerem Zelldurchmesser. Es sind die manuell und automatisch ermittelten Ergebnissen dargestellt. Für eine zusätzliche Überprüfung, ob die Menge des verworfenen Vorlaufs aus der Probenentnahmestation korrekt eingestellt ist, wurden dort Proben entnommen und gemessen. Die Viabilitätswerte für die Proben aus dem Vorlauf zeigen keine auffälligen Abweichungen zu den Viabilitäten der anderen Proben. Dagegen zeigt sich in den ermittelten Werten für den mittleren Zelldurchmesser eine deutliche Abweichung für die Proben aus dem Vor-

lauf. Bei den Proben aus dem Vorlauf zeigte sich für die Zelldichten keine so ausgeprägte Abweichung zu den manuellen Proben, so dass diese hier nicht dargestellt sind.

In Abbildung 5.3, Seite 91, sind die Messungen für Glukose, Laktat und Ammonium (NH_4^+) dargestellt. Bei den Glukosemessungen sind die durch das automatische System ermittelten Werte während der Vorkultur geringer als die manuell ermittelten Ergebnisse. Die Abweichungen liegen aber deutlich innerhalb eines Fehlerbandes von 5 %. Die Tendenz der geringeren Glukosewerte setzt sich allerdings bei Betrieb mit dem Arbeitsvolumen von 20 l nicht fort. Des Weiteren zeigen die Laktatmessungen diese Tendenz nicht, so dass ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden kann. Eine Erklärung für die Abweichungen der Glukosemessungen ist eine Alterung der Biomembran, des Messgerätes. Die Glukose- und Laktatmessungen erfolgen für die manuellen Proben direkt nach Entnahme aus dem Reaktor. Die Proben des automatischen Systems wurden stattdessen zu einem späteren Zeitpunkt nach Beendigung des Experiments in einem Satz gemessen. Auf die Ermittlung des NH_4^+ -Gehalts der automatischen Proben wurde verzichtet, da ein Vergleich der über längere Zeit im Tiefkühler gelagerten mit den direkt gemessenen Proben nicht möglich ist.

In Abbildung 5.4, Seite 92, ist der Verlauf der Aminosäuren Glutamin, Alanin, Valin, Threonin, Lysin, Leucin, Phenylalanin und Methionin dargestellt. Die zu einer Messreihe gehörenden Proben wurden jeweils in einem Satz gemessen, so dass sich Abweichungen zwischen den Werten für das manuelle und automatische Probenmanagement durch zum Beispiel unterschiedliche Laufmittelchargen ergeben können. Innerhalb des Zeitraums zwischen 134,0 h und 139,5 h kam es zur Limitierung durch den kompletten Verbrauch der Aminosäure Glutamin. Das erklärt auch den rapiden Abfall der Lebendzell-dichte nach den Zeitpunkt 142,5 h der in Abbildung 5.1, Seite 90, zu sehen ist. Generell kann man erkennen, dass es zwischen den automatischen und manuellen Proben keine durchgehend systematischen Unterschiede gibt. In den meisten Bereichen der Kultivierung zeigen automatische und manuelle Probenbearbeitung sehr gute Übereinstimmungen. Die deutlichen Abweichungen zu den Zeitpunkten 0,0 h, 21,0 h und 25,0 h lassen sich wahrscheinlich auf einen Fehler bei der Vorbereitung der Proben für die Analysen zurückführen.

Für die gelösten Medien- beziehungsweise Überstandskomponenten zeigen sich keine systematischen Abweichungen zwischen den Proben des manuellen und des roboterisierten Probenmanagements. Die Messungen der Zelldichten mit dem automatischen System liegen allerdings systematisch unter den manuell ermittelten Werten. Es bestand die Vermutung, dass der Grund dafür in der Sedimentation der Zellen in den Kapillaren der Pipettierstation liegt. Daher wurde die Pipettierstation für die nächste Kultivierung wie in Kapitel 4.2, ab Seite 68, beschrieben umgebaut.

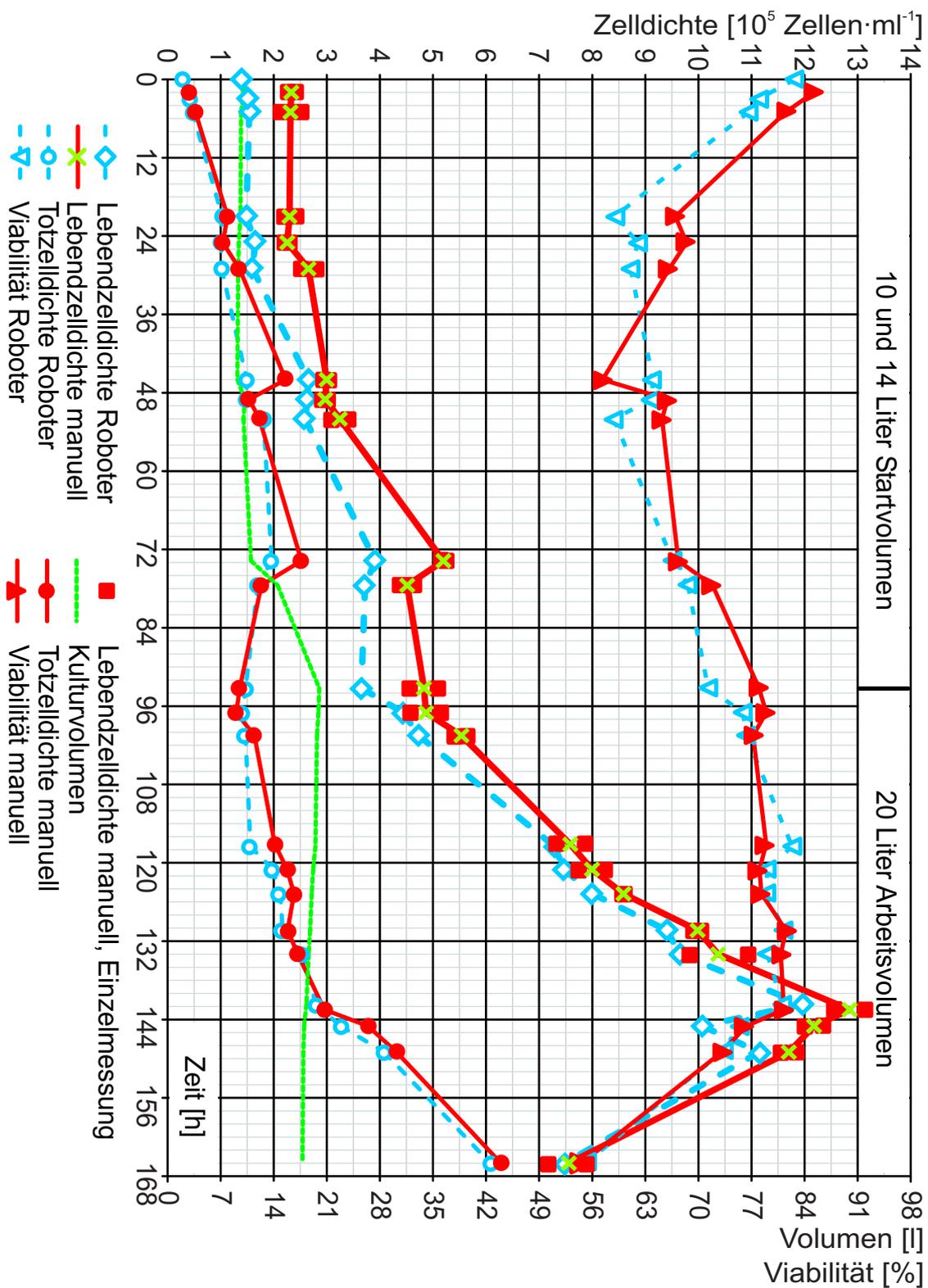


Abbildung 5.1: Verlauf von Lebend-, Totzellichte, Viabilität und Volumen während einer 20 l Kultivierung von Hybridomzellen.

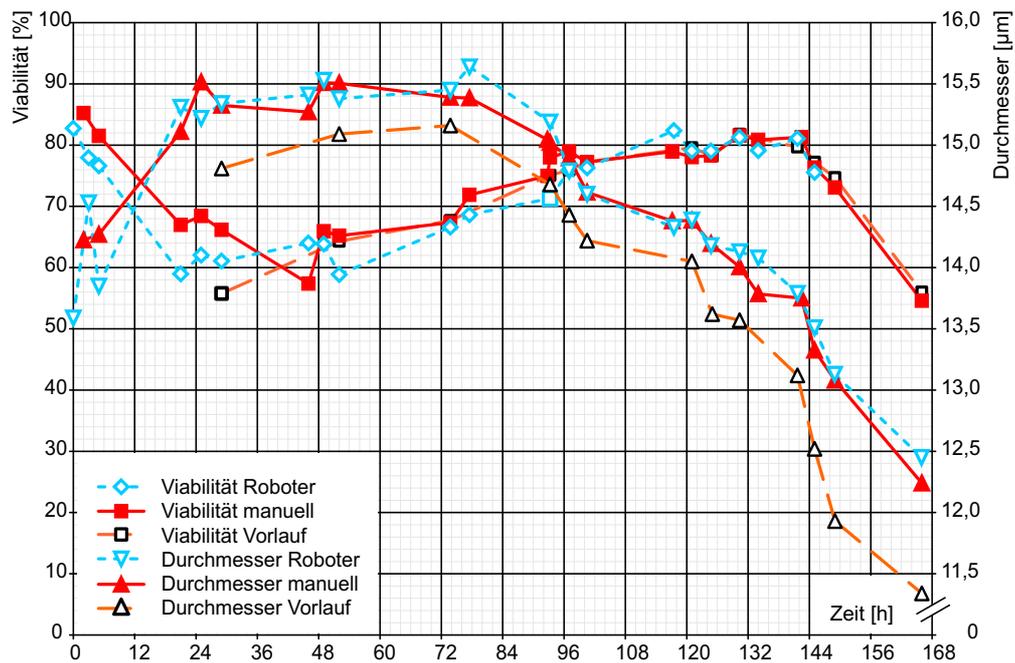


Abbildung 5.2: Verlauf der Viabilität und des Zelldurchmessers während einer 20 l Kultivierung von Hybridomzellen.

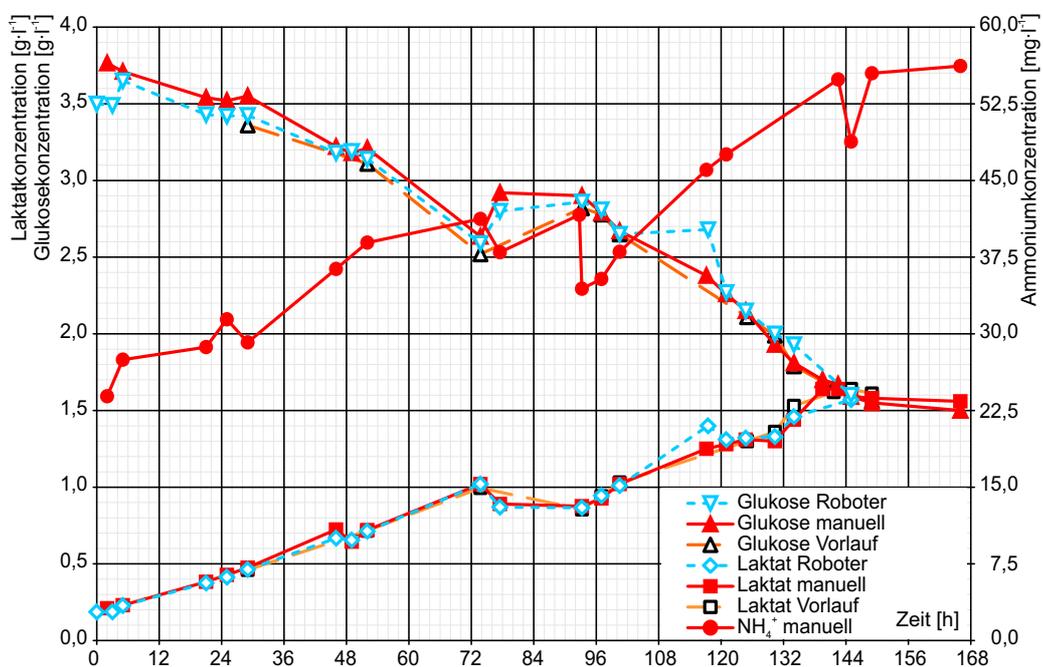


Abbildung 5.3: Verlauf der Glukose-, Laktat- und Ammoniumkonzentrationen (NH_4^+) während einer 20 l Kultivierung von Hybridomzellen.

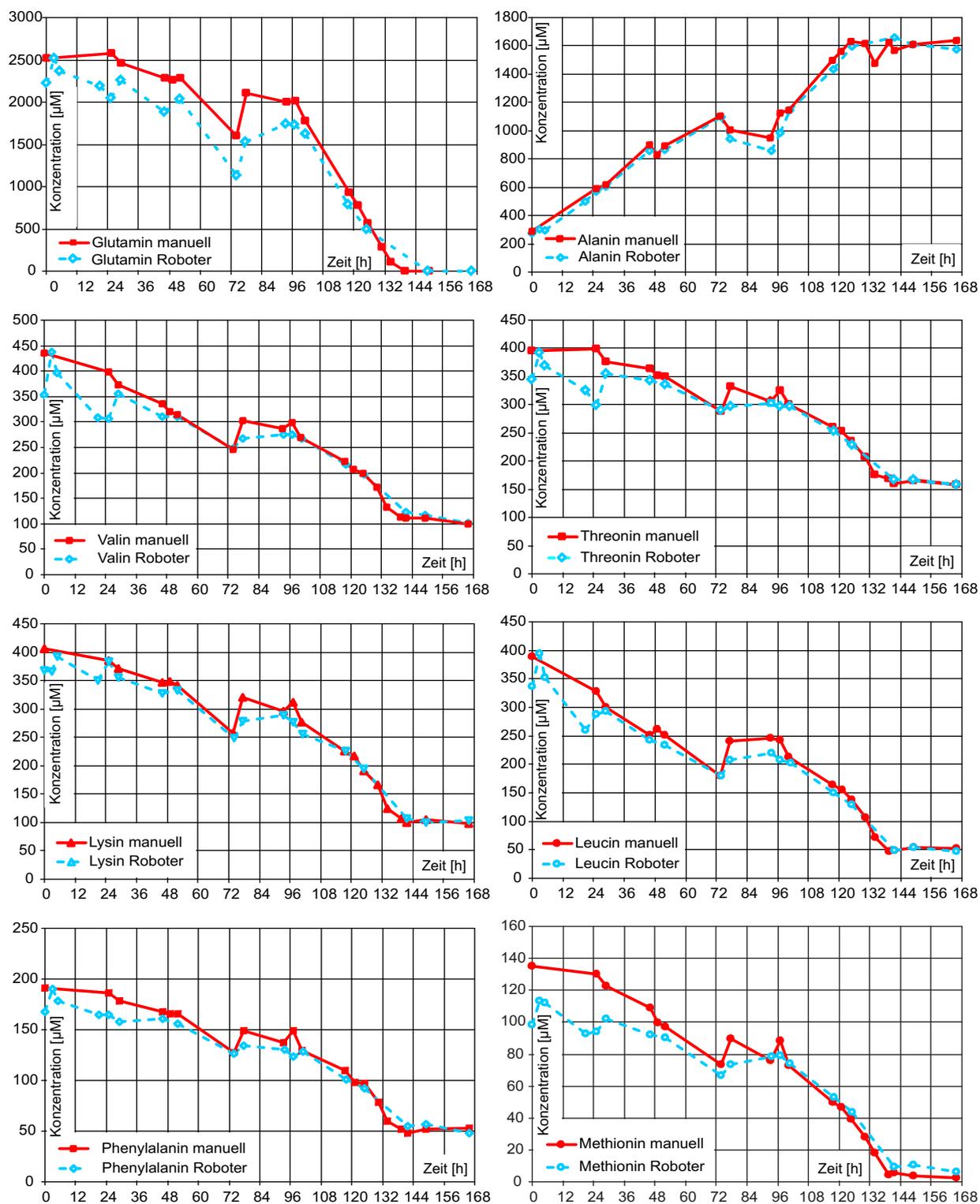


Abbildung 5.4: Verlauf der Aminosäurekonzentrationen während einer 20 l Kultivierung von Hybridomzellen. Dargestellt sind Glutamin, Alanin, Valin, Threonin, Lysin, Leucin, Phenylalanin und Methionin.

5.2 Erste Kultivierung einer rCHO-Zelllinie

Vom Zeitpunkt Null bis 50 h betrug das Reaktorvolumen elf Liter, danach war der Reaktor mit dem Arbeitsvolumen von 20 l gefüllt. Die gesamte Kultivierung wurde mit einer Rührerdrehzahl von $50 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ durchgeführt. Die Kopfraumbegasung betrug während der gesamten Kultivierung $20 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Blasenbegasung zur Regelung des pO_2 wurde während der gesamten Kultivierung mit $20 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ durchgeführt. Zum Zeitpunkt 67,5 h stieg das pO_2 -Stellsignal exponentiell an. Eine mikrobielle Infektion konnte darauf im mikroskopischen Bild nachgewiesen werden. Nach einer Antibiotikazugabe ging das pO_2 -Stellsignal auf den ursprünglichen Wert zurück. Das bereits vorher geringe Wachstum konnte aber während der folgenden 48 h nicht gesteigert werden, so dass aus diesem Grund das Experiment vor Erreichen der normalen Erntezelldichte von über $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter abgebrochen wurde.

Die manuelle Probenentnahme erfolgte während dieser Kultivierung die ganze Zeit über das Probenentnahmeventil, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen manueller und automatischer Probe zu ermöglichen.

Abbildung 5.5, Seite 95, zeigt den Verlauf der ermittelten Lebend- und Totzelldichten, Viabilität und Reaktorvolumen. Für die Viabilität und die Totzelldichte sind der automatisch mit dem roboterisierten System ermittelte Wert sowie der Mittelwert aus einer dem Reaktor manuell entnommenen und mit dem CEDEX ausgewerteten Doppelbestimmung dargestellt. Für die Lebendzellendichte sind wiederum zusätzlich die der Doppelbestimmung zu Grunde liegenden Einzelmessungen gezeigt.

Die Werte der manuellen Probenentnahme liegen für die Lebendzellendichte auch bei dieser Kultivierung häufig höher als die der automatischen Probenentnahme. Allerdings gibt es auch sehr gute Übereinstimmungen wie zum Beispiel zu den Zeitpunkten 64,5 h und 88,5 h. Zum Zeitpunkt 40,5 h liegt der durch das automatische System ermittelte Wert über dem der manuellen Probe. Für die Totzelldichte und Viabilität zeigen die Unterschiede der ermittelten Werte zwischen den automatisch und manuell bearbeiteten Proben keine systematischen Abweichungen. Zum Teil liegen die Werte des automatischen Systems über denen der manuellen Probe, zu anderen Zeitpunkten ist es aber genau umgekehrt. Die Abweichungen der Viabilitäten befinden sich innerhalb eines Bereichs von etwa fünf Prozent. Die Totzelldichte zeigt prozentual größere Abweichungen, allerdings sind die absoluten Werte hier so dicht am unteren Ende des Messbereichs, dass eine prozentuale Betrachtung nicht durchgeführt werden kann. Die absoluten Abweichungen der Werte liegen im Mittel deutlich unter $0,2 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter. Dabei entspricht dieser Wert genau einer absolut gezählten Zelle im CEDEX-Bild.

Die größten Abweichungen der manuellen Doppelbestimmungen zueinander liegen bei absolut $0,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter. Das entspricht einer Abweichung von 2,5 Zellen pro aufgenommenem Bild. Die Abweichungen der Messungen mit dem automatischen System liegen etwa in dem selben absoluten Bereich. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Hauptursache für die Abweichungen die niedrige Zelldichte mit den sich daraus erge-

benden großen Abweichungen ist. Durch den Umbau der Pipettierstation konnte also die systematische Abweichung zwischen den Messergebnissen der Zelldichten positiv beeinflusst werden.

Abbildung 5.6, Seite 96, zeigt den Vergleich des mittleren Zelldurchmessers und zusätzlich noch einmal den Verlauf der Viabilität. Es sind die manuell und automatisch ermittelten Ergebnisse dargestellt. Auf die Messung von Proben aus dem Vorlauf der Probenentnahmestation wurde bei dieser Kultivierung verzichtet. Nur die Probe zum Zeitpunkt 0 h liegt für beide Messarten deutlich unterhalb des sich über den restlichen Verlauf der Kultivierung ergebenden Mittelwertes von etwa 15 μm . Es kann keine systematische Abweichung zwischen manueller und automatischer Probenauswertung festgestellt werden.

In Abbildung 5.7, Seite 96, sind die Messungen für Glukose, Laktat und Ammonium (NH_4^+) dargestellt. Bei den Glukosemessungen sind die durch das automatische System ermittelten Werte während der Vorkultur geringer als die manuell ermittelten Ergebnisse. Die Abweichungen liegen wie bei der Kultivierung der Hybridomzellen im Bereich von etwa 5 %. Die Laktatmessungen zeigen eine ähnliche Tendenz. Zu den Zeitpunkten 24,5 h, 88,5 h und 96,5 h ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Werte von manueller Bestimmung und automatischem System. Die Messung der automatisch ermittelten Proben erfolgte in einem Satz nach Beendigung des Experiments, während die manuellen Proben jeweils direkt nach der Probenentnahme gemessen wurden. Auf Grund der nicht über die gesamte Kultivierung niedrigeren Messwerte kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Messabweichungen des Glukose/Laktatmessgerätes handelt und nicht um eine Abweichung die aus der Verwendung des automatischen Systems herrührt. Die NH_4^+ -Werte wurden wiederum nur für die manuellen Proben ermittelt.

In Abbildung 5.8, Seite 97, ist der Verlauf der Aminosäuren Glutamin, Alanin, Valin, Threonin, Lysin, Leucin, Serin und Asparagin dargestellt. Die zu einer Messreihe gehörenden Proben wurden jeweils in einem Satz gemessen, so dass sich Abweichungen zwischen den Werten für das manuelle und automatische Probenmanagement durch zum Beispiel unterschiedliche Laufmittelchargen ergeben können.

Innerhalb des Zeitraums zwischen 72,5 h und 88,5 h kam es zum kompletten Verbrauch der Aminosäure Asparagin. Der Beginn des rapiden Verbrauchs von Asparagin im Zeitbereich zwischen 68,5 h und 72,5 h fällt sehr genau mit dem Anstieg des pO_2 -Stellsignals zusammen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieses durch die mikrobielle Infektion hervorgerufen wurde. Weiterhin wäre, neben mikrobiellen Toxinen, der Mangel an Asparagin eine Erklärung für das schlechte Wachstum der Kultur im folgenden Zeitraum.

Generell kann man erkennen, dass es zwischen den automatischen und manuellen Proben keine durchgehend systematischen Unterschiede gibt. In den meisten Bereichen der Kultivierung zeigen automatische und manuelle Probenbearbeitung sehr gute Übereinstimmungen. Bis auf die Messung zum Zeitpunkt 68,5 h gibt es keine extremen Abweichungen. Diese Messung wurde mit einer anderen Laufmittelcharge durchgeführt. Weiterhin lässt sich im Spektrum eine Abweichung bei der Lysinderivatisierung erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei dieser Abweichung um einen Messfehler handelt.

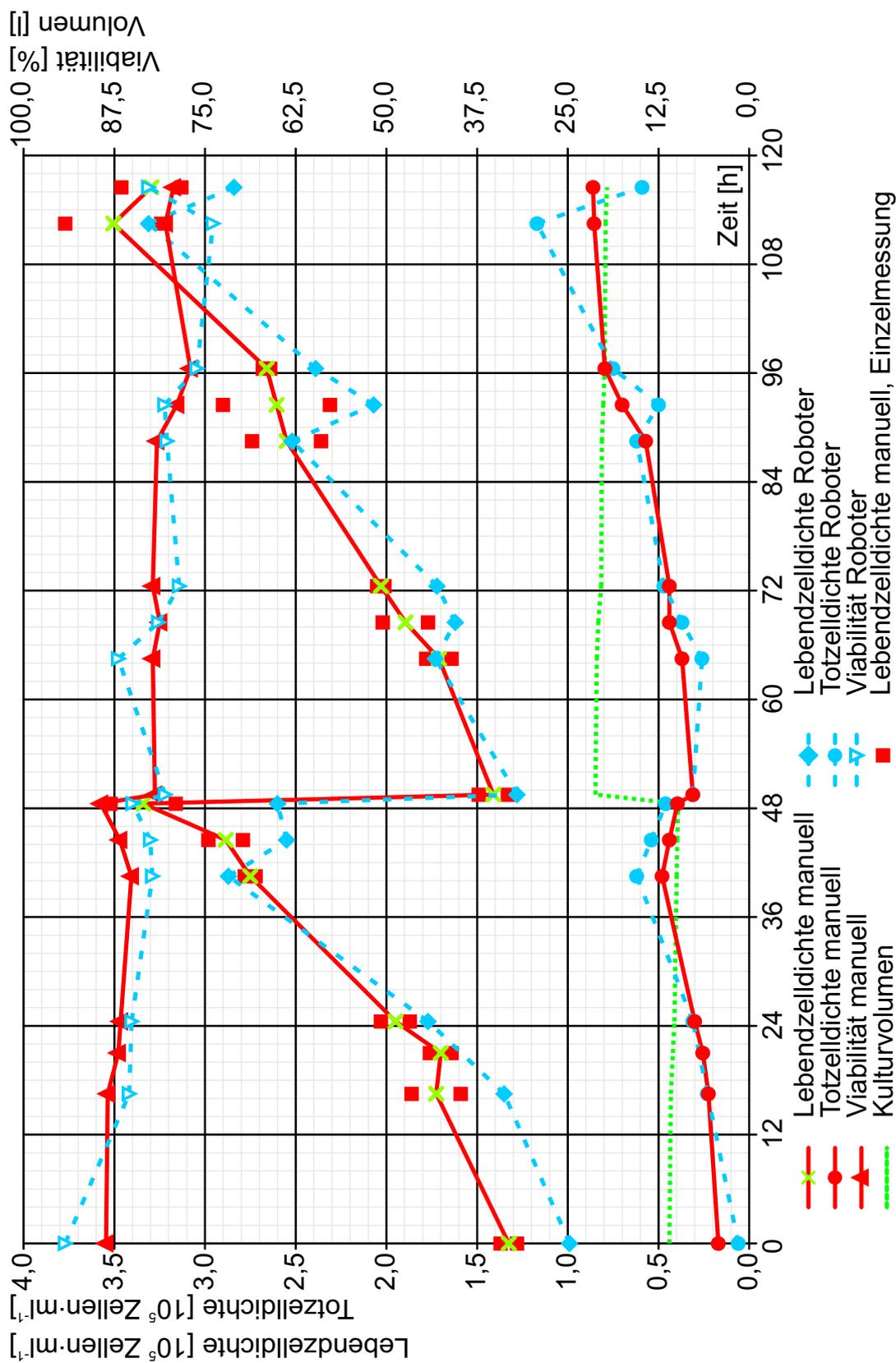


Abbildung 5.5: Verlauf der Lebendzellichte, Totzellichte, Viabilität und Volumen während der ersten 20 l Kultivierung von rCHO-Zellen.

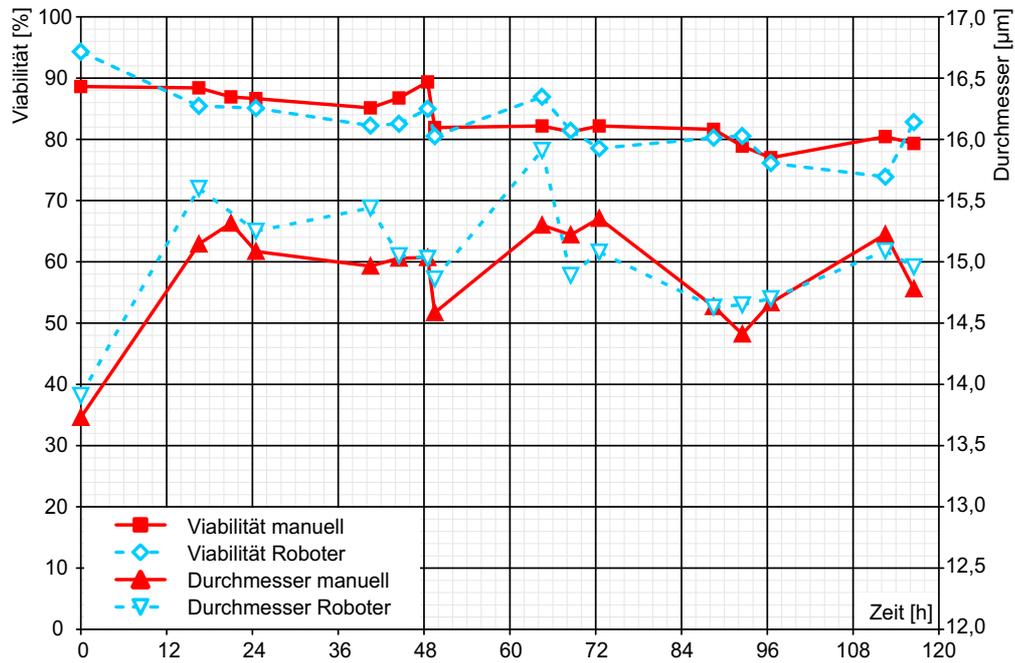


Abbildung 5.6: Verlauf der Viabilität und des Zelldurchmessers während der ersten 20 l Kultivierung von rCHO-Zellen.

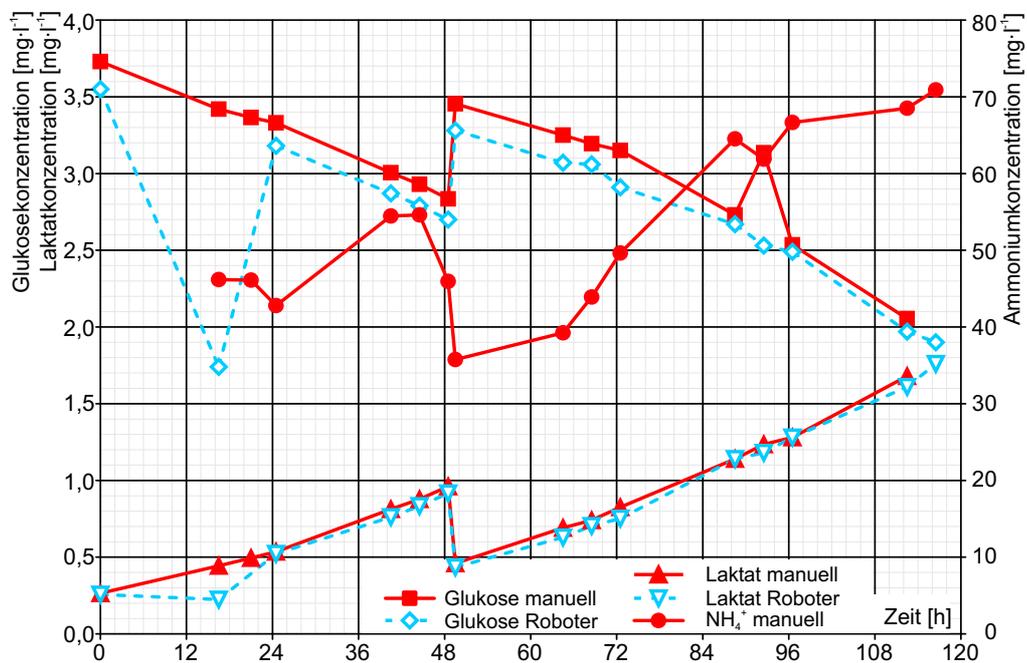


Abbildung 5.7: Verlauf der Glukose-, Laktat- und Ammoniumkonzentrationen (NH_4^+) während der ersten 20 l Kultivierung von rCHO-Zellen.

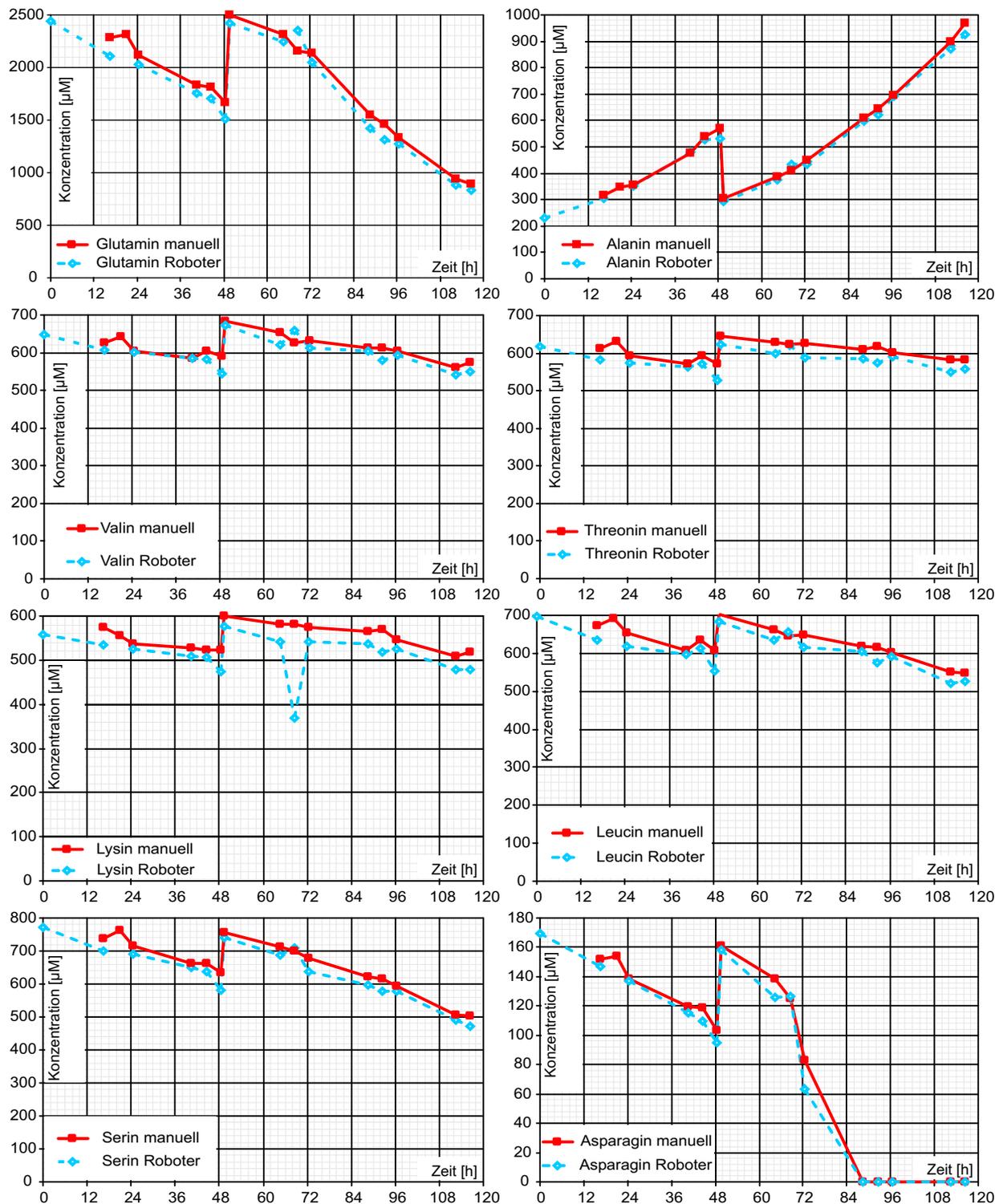


Abbildung 5.8: Verlauf der Aminosäurekonzentrationen während der ersten 20 l Kultivierung von rCHO Zelle. Dargestellt sind Glutamin, Alanin, Valin, Threonin, Lysin, Leucin, Serin und Asparagin.

5.3 Zweite Kultivierung einer rCHO-Zelllinie

Auf Grund eines technischen Problems konnte die automatisierte Probenbearbeitung nur bis zum Zeitpunkt 44,5 h durchgeführt werden. Das Reaktorvolumen betrug daher während der gesamten Kultivierung zwölf Liter. Die Kultivierung wurde mit einer Rührerdrehzahl von $50 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ durchgeführt. Die Kopfraumbegasung betrug $10 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Blasenbegasung zur Regelung des pO_2 wurde bis zum Zeitpunkt 19,7 h mit $10 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ durchgeführt, danach betrug die Begasungsrate $20 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$.

Die manuelle Probenentnahme erfolgte während der gesamten Kultivierung durch das Probenentnahmeventil an der Reaktorseite. Dieses ermöglicht einen besseren Vergleich mit den Ergebnissen des automatischen Systems, da das Ventil für die automatische Probenentnahme auch an der Reaktorseite eingebracht ist.

Abbildung 5.9, Seite 100, zeigt den Verlauf der ermittelten Lebend- und Totzellichten, Viabilität und Reaktorvolumen. Für die Viabilität und die Totzellichte sind der automatisch mit dem roboterisierten System ermittelte Wert sowie der Mittelwert aus einer dem Reaktor manuell entnommenen und mit dem CEDEX ausgewerteten Doppelbestimmung dargestellt. Für die Lebendzellichte sind zusätzlich die der Doppelbestimmung zu Grunde liegenden Einzelmessungen gezeigt.

Die Werte der Lebendzellichte der manuellen Probenentnahme liegen auch hier bei der Mehrheit der Messungen höher als die der automatischen Probenentnahme. Zum Zeitpunkt 44,5 h liegt der Wert der automatischen Probenentnahme höher als die manuelle Probe. Die Abweichungen liegen bei diesen geringen Zelldichten aber wiederum bei absolut $0,2 \cdot 10^5$ Zellen pro Milliliter. Das entspricht einer Abweichung von einer Zelle pro aufgenommenem Bild. Für die Totzellichte ergeben sich geringere Abweichungen zwischen manuellem und automatischem Probenmanagement als bei der Lebendzellichte. Auch für die Viabilität liefern beide Probenbearbeitungsverfahren ähnliche Ergebnisse, diese zeigen keine systematischen Unterschiede. Daher kann man für diese Kultivierung sagen, dass es keine systematischen Abweichungen der Werte von manueller und automatischer Probenbearbeitung gibt. Eine Beeinflussung der Proben durch das Robotersierte System kann also ausgeschlossen werden.

Abbildung 5.10, Seite 101, zeigt einen Vergleich zwischen Viabilität und mittlerem Zelldurchmesser. Es sind die manuell und automatisch ermittelten Ergebnisse dargestellt. Der Zelldurchmesser ist bei dieser Kultivierung im Mittel etwas geringer als bei der ersten rCHO-Kultivierung. Die Abweichung beträgt aber nur etwa $0,5 \mu\text{m}$, so dass dem keine Bedeutung zuzumessen ist.

In Abbildung 5.11, Seite 101, sind die Messungen für Glukose, Laktat und Ammonium (NH_4^+) dargestellt. Bei den Glukosemessungen sind die durch das automatische System ermittelten Werte geringer als die manuell ermittelten Ergebnisse. Die Abweichungen liegen bei dieser Kultivierung außerhalb des Fehlerbandes von 5%. Die Laktatmessungen zeigen diese Tendenz nur in den beiden Proben zu den Zeitpunkten $t = 36,5 \text{ h}$ und 46 h . Die Glukose- und Laktatmessungen erfolgten wie bei den anderen Kultivierungen für die

manuellen Proben direkt nach Entnahme aus dem Reaktor und für die Proben des automatischen Systems nach Beendigung des Experiments in einem Satz. Auch hier wurde auf die Ermittlung des NH_4^+ -Gehalts der automatischen Proben verzichtet.

In Abbildung 5.12, Seite 102, ist der Verlauf der Aminosäuren Glutamin, Alanin, Valin, Threonin, Lysin, Leucin, Serin und Asparagin dargestellt. Die zu einer Messreihe gehörenden Proben wurden jeweils in einem Satz gemessen, so dass sich Abweichungen durch zum Beispiel unterschiedliche Laufmittelchargen ergeben können. Generell kann man erkennen, dass es bei dieser Kultivierung zwischen den automatischen und manuellen Proben keinerlei Unterschiede gibt.

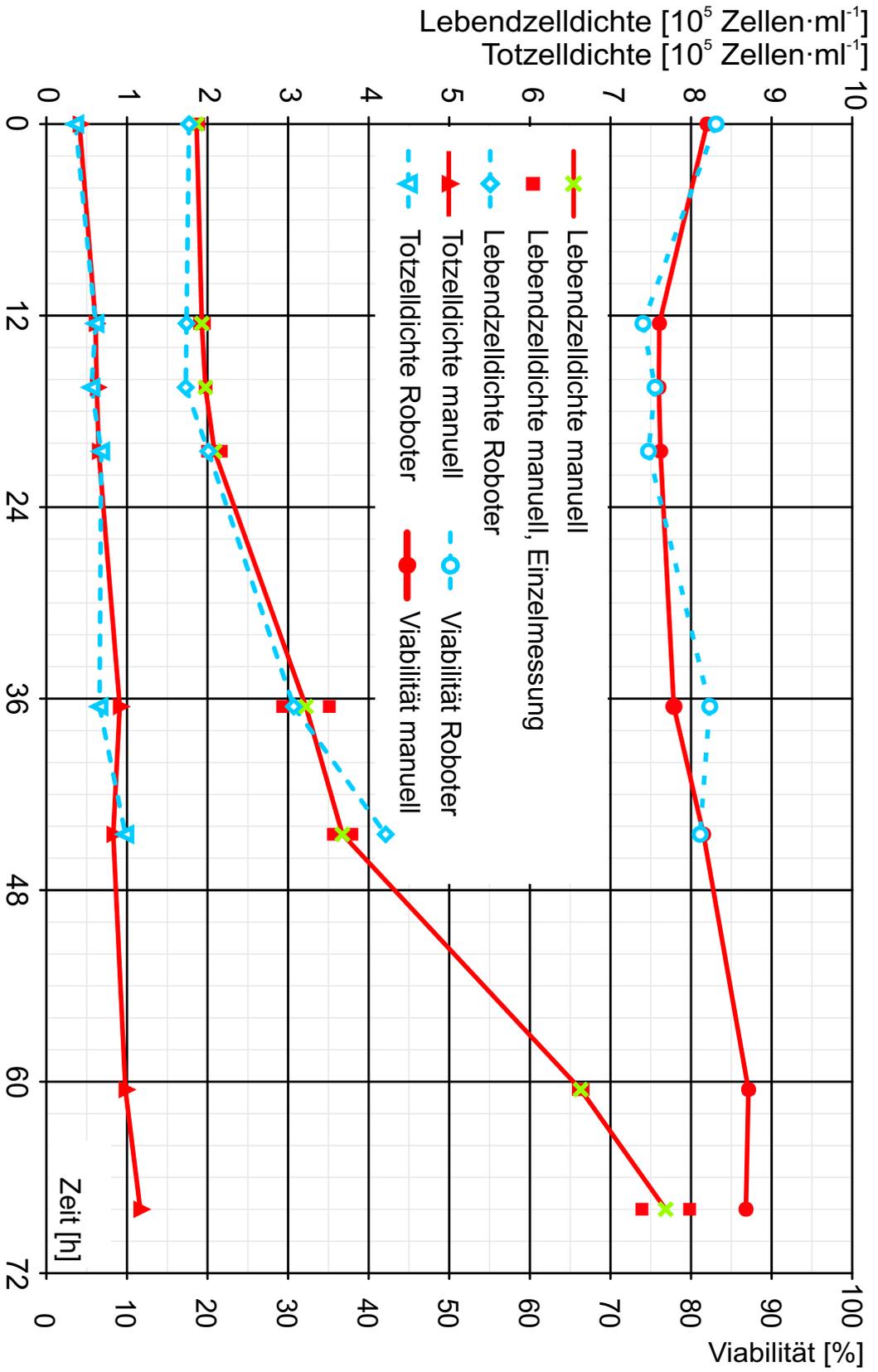


Abbildung 5.9: Verlauf der Lebendzellichte, Totzellichte, Viabilität und Volumen während der zweiten 20 l Kultivierung von rCHO-Zellen.

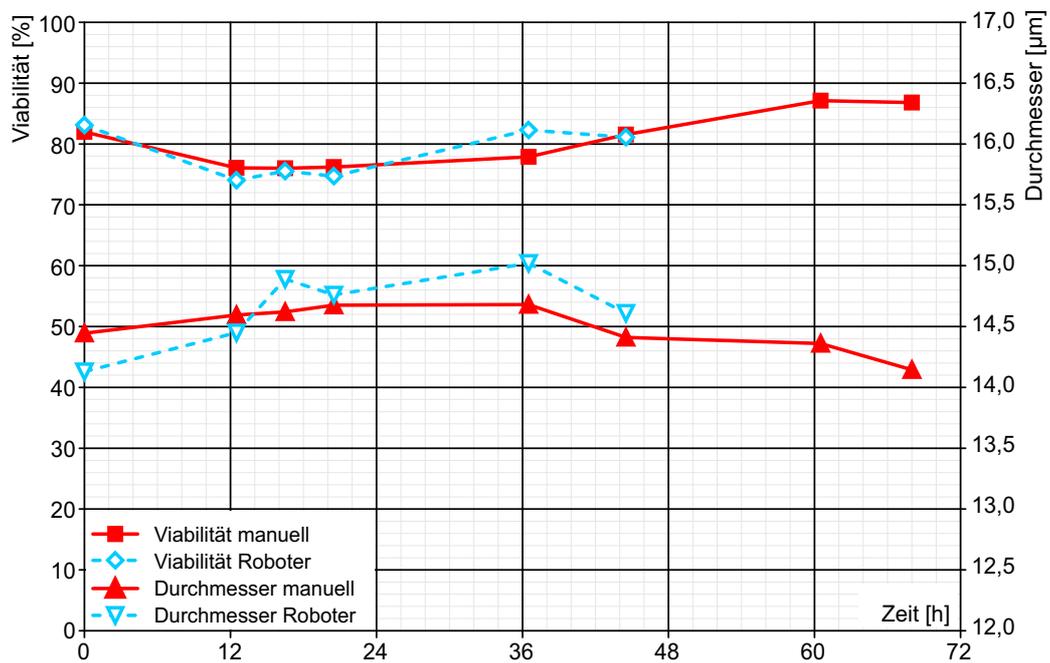


Abbildung 5.10: Verlauf der Viabilität und des Zelldurchmessers während der zweiten 20 l Kultivierung von rCHO-Zellen.

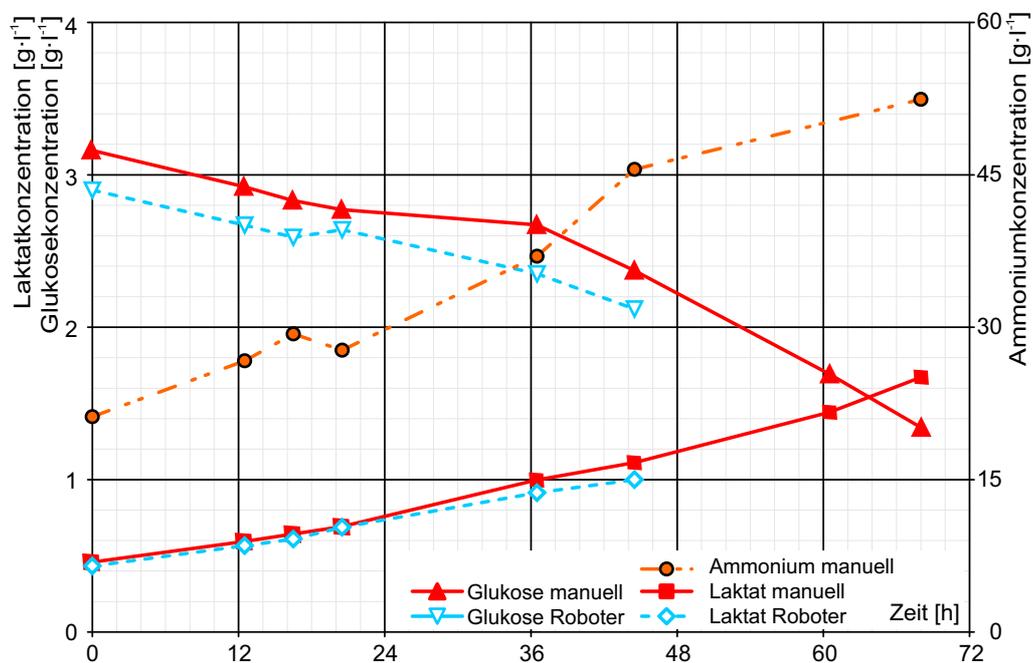


Abbildung 5.11: Verlauf der Glukose-, Laktat- und Ammoniumkonzentrationen (NH_4^+) während der zweiten 20 l Kultivierung von rCHO-Zellen.

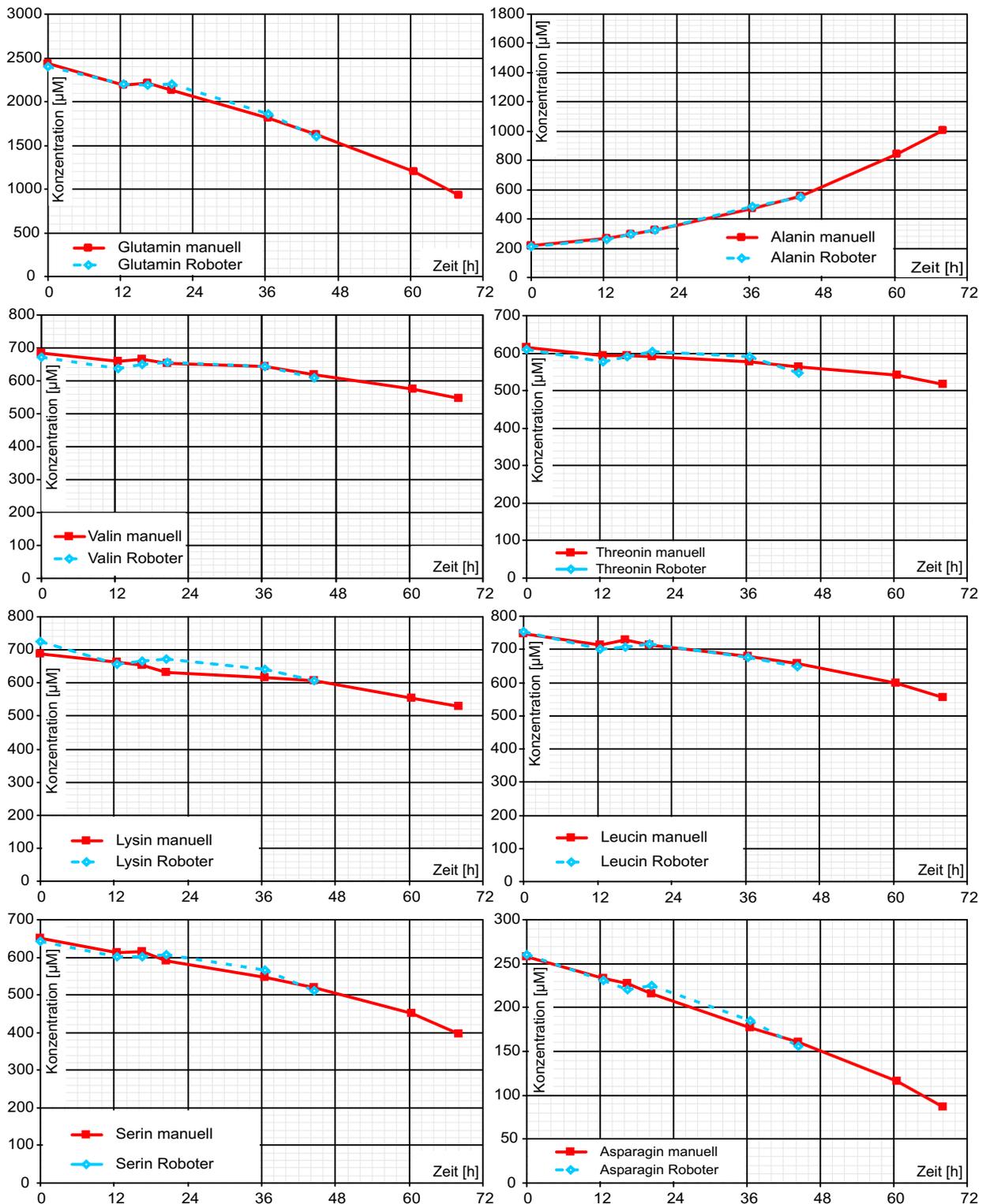


Abbildung 5.12: Verlauf der Aminosäurekonzentrationen während der zweiten 20 l Kultivierung von rCHO-Zellen. Dargestellt sind Glutamin, Alanin, Valin, Threonin, Lysin, Leucin, Serin und Asparagin.

5.4 Zusammenfassung

Es wurden drei automatische Kultivierungen durchgeführt. Der Einsatz des autonomen Systems erfolgte während unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Für alle Proben konnte der automatische Ablauf komplett durchlaufen werden. Bei einigen Proben konnte der Ablauf allerdings nicht beim ersten Versuch komplett durchlaufen werden und ein Neustart war notwendig. Zum Teil wurde das steuernde Laborprogramm nach einer erfolgreichen Probenbearbeitung gestoppt und nach Erweiterung durch eine Verbesserung des Systems erneut gestartet. Die maximale Anzahl von hintereinander autonom abgelaufenen Probenbearbeitungen ohne Benutzereingriff wurde während der zweiten Kultivierung mit sieben Durchläufen erreicht. Das entspricht zwei vollständigen Tagen. Für die letzte Kultivierung konnte auf Grund eines nicht spontan reparablen Schadens der mobilen Plattform das automatische Probenmanagement nur über sechs Probenentnahmen durchgeführt werden. Diese Proben wurden ohne Unterbrechung des Laborprogramms in einem durchgängigen Lauf ausgeführt.

Für die meisten Fälle wurden dreimal täglich Proben entnommen; morgens, mittags und abends. Die unterschiedlichen Lichtverhältnisse während des Tagesablaufs bereiteten dem System keine Probleme. Während der Hybridom Kultivierung wurde eine Probenbearbeitung während der Nacht durchgeführt. Die Beleuchtung ausschließlich mit künstlichem Licht hatte keine negative Auswirkung auf den Betrieb des Systems.

Es konnte gezeigt werden, dass für die Medien und Zellkulturbestandteile keine systematischen Unterschiede zwischen einer manuellen und einer roboterisierten automatischen Probenbearbeitung auftreten. Beeinflussungen der Probe durch zum Beispiel Verdünnungseffekte können ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der Zellen in der entnommenen und bearbeiteten Probe gleich bleibt, die Probe somit keinen negativen Einflüssen ausgesetzt ist. Durch den Umbau der Pipettierstation, bei dem ein 1 ml Volumen fassendes Reservoir über der Nadel eingebaut wurde, konnten die systematisch geringeren Zelldichten der automatischen Probenbearbeitung positiv beeinflusst werden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Abbildung 5.13, Seite 104, alle drei Kultivierungen im selben Achsenmaßstab dargestellt. Der trotzdem noch bei vielen Proben erkennbare Effekt einer geringeren Zelldichte der automatisch bearbeiteten Proben sollte noch näher untersucht werden. Weitere Kultivierungen und Proben würden die statistische Sicherheit erhöhen. Dadurch könnte eine sicherere Aussage getroffen werden, ob sich tatsächlich systematisch geringere Zelldichten für die automatische Probenbearbeitung ergeben. Speziell im Bereich höherer Zelldichten könnte auch geklärt werden, ob es sich um eine absolute Abweichung handelt, die mit steigender Zellzahl prozentual abnimmt. Es könnte sich aber auch um eine tatsächliche prozentuale systematische Abweichung handeln, deren Ursache dann in weiteren Experimenten geklärt werden müsste.

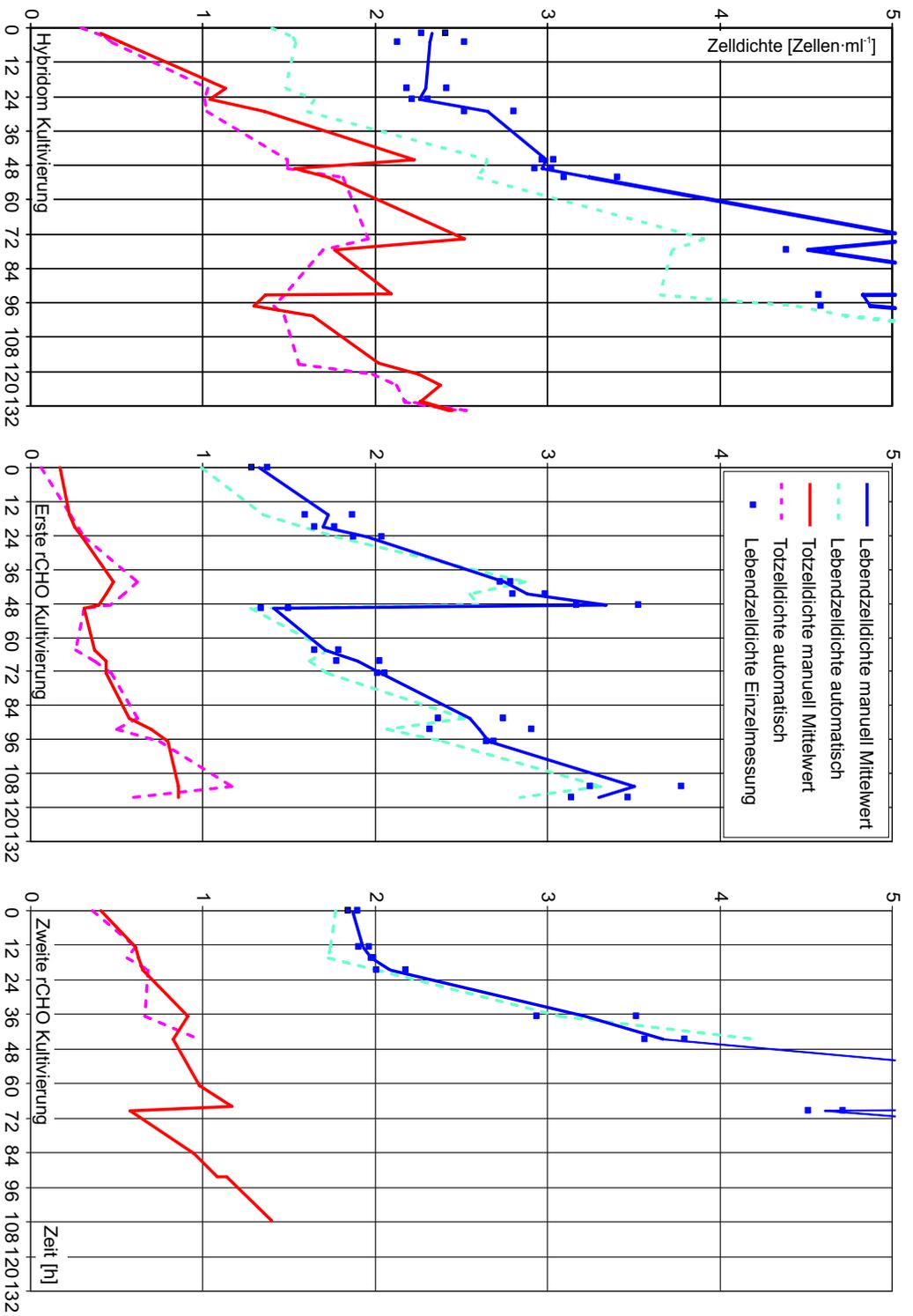


Abbildung 5.13: Vergleich der Kultivierungen. Die drei Kultivierungen sind zur besseren Vergleichbarkeit mit dem gleichen Achsenmaßstab dargestellt. Die Hybridom Kultivierung konnte aus diesem Grund nur zum Teil dargestellt werden. Es ist deutlich erkennbar, dass die Abweichungen der Hybridom Kultivierung, die ohne Reservoir über der Nadel der Pipettierstation durchgeführt wurde, große systematische Abweichungen der Lebendzellichte zwischen automatischer und manueller Probenbearbeitung aufweist.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Ein autonomer Serviceroboter wurde in einem biotechnologischen Zellkulturtechnikum für die automatische Bearbeitung von Reaktorproben eingesetzt. Der Serviceroboter besteht aus einer mobilen Plattform auf der sich ein Industrie-Roboterarm befindet. Beide Systeme können unabhängig voneinander angesteuert werden. Es existieren sogenannte Roboterhilfen, die die Durchführung der Probenbearbeitung ermöglichen. Alle Komponenten wurden separat programmiert und validiert. Das Zusammenspiel im Gesamtsystem wurde durch das Gerätesteuersystem koordiniert.

Das roboterisierte Probenmanagement konnte in mehreren Kultivierungen erfolgreich eingesetzt werden und arbeitete über 48 h ohne Benutzereingriff. Der autonome Serviceroboter war in der Lage die an ihn gestellten Aufgaben fehlerfrei auszuführen. Dies beinhaltet einfache Pick- und Placebewegungen wie auch durch den Kraft/Momentensensor gesteuerte Aufgaben. Auch die Roboterhilfen, die dem autonomen Serviceroboter die Durchführung seiner Aufgaben ermöglichen, arbeiteten zufriedenstellend.

Für die Probenentnahme wurde ein System entwickelt, bei dem die Probe über ein Schlauchsystem in ein Gefäß abgefüllt wird. Für das Abfüllen muss die Nadel des Probenauslaufs durch das Septum des Probenentnahmegefäßes gestochen werden. Dieses wird mit einem X-Z-Positionierer durchgeführt. Die Steuerung des Probenstroms wird mit drei pneumatischen Ventilen realisiert. Es wurden drei verschiedene Systeme für die Positionierung eingesetzt. Zum einen der ELVAMAT als Prototyp sowie der Linear-Roboter und der Linear-Schlitten. Alle Geräte eignen sich für den Einsatz. Welchem der beiden mit Sensoren ausgestatteten Systemen der Vorzug gegeben werden sollte hängt von den örtlichen Gegebenheiten und Installationen in den jeweiligen Laboratorien ab.

Mit der Pipettierstation wurden der Probe die zellhaligen und zellfreien Aliquots entnommen. Eine Zellschädigung durch das System kann ausgeschlossen werden. Auf Grund von zeitlichen Effekten kommt es zur Sedimentation der Zellen im System. Daher sollte bei einem erneuten Einsatz eine Systemvariante gewählt werden, bei der die entnommene Probe sofort über einen zusätzlichen Anschluss in ein bereitstehendes Gefäß überführt wird.

Die weiteren Roboterhilfen, CEDEX, Barcodescanner, Zentrifuge und MFCS konnten in das Gesamtsystem eingebunden und vom Laborprogramm angesteuert werden. Die ermittelten kultivierungsrelevanten Daten werden mit den Prozessdaten zusammengeführt und zur Langzeitarchivierung extern gespeichert. Die systemrelevanten Daten werden in einer Protokolldatei abgelegt. Weiterhin werden sämtliche ausgeführte Aktionen und ihre Resultate in dieser Datei abgelegt.

Die gesetzte Aufgabenstellung wurde erreicht und erfolgreich die Basis für einen Einsatz des Systems außerhalb des Entwicklungsbereichs geschaffen. Die Erweiterung des Einsatzbereichs des autonomen Roboters durch zusätzliche Aufgaben innerhalb der Laufzeit dieser Arbeit wäre wünschenswert gewesen, hätte aber den Rahmen der Arbeit überstiegen. Allerdings gibt es dabei eine Vielzahl von denkbaren Aufgaben, die von den jeweiligen Gegebenheiten und Notwendigkeiten der Produktionsanlage abhängen. Die automatisierten Aufgaben beschränken sich deshalb auf ein grundlegendes Beispielszenario, das die Handlungen enthält, die in den Laboratorien generell durchgeführt werden.

Als weiterführende Aufgabe könnte ein Multikomponenten-Analysengerät für zum Beispiel Glukose, Laktat und Glutamin in das Probenmanagement eingebunden werden. Eine weitere wichtige Aufgabe, die es zu realisieren gilt ist die Messung des pH-Werts einer Probe. Weitere Tätigkeiten, die vom autonomen Roboter durchgeführt werden könnten sind zum Beispiel visuelle Inspektionen von Anlagenkomponenten mit der am Handgelenk des Roboters befestigten Kamera.

Mit diesen erweiterten Möglichkeiten für das Probenmanagement und die Automatisierung in der Produktionsanlage im Allgemeinen bleibt es abzuwarten welche Automatisierungskonzepte sich durchsetzen und den Arbeitsalltag bereichern werden.

Anhang A

Definitionen und Begriffe

ASCII-Kodierung	Darstellung von Befehlen oder Parametern als Ziffern und Zeichen, die den Zeichen einer Tastatur entsprechen und „normal“ lesbar sind
Batch	1. Satzweiserbetrieb eines Bioreaktors, das heißt der Bioreaktor wird mit Medium befüllt und angeimpft, sind die Zellen ausreichend gewachsen, wird abgeerntet 2. (MFCS) Lauf eines Bioreaktors für den die Daten aufgezeichnet werden
bipolar	Ansteuerung, bei der die gegenüberliegenden Spulen aktiv sind und ein entgegengesetztes Magnetfeld aufweisen.
CEDEX	Gerät zum automatischen Bestimmen der Zelldichte auf Basis der Trypanblau-Färbemethode
Digital Control Unit (DCU)	Kontrollstation, die die Steuerung und Regelung von Bioreaktoren der Firma B. Braun ermöglicht.
Fed-Batch	Batchbetrieb eines Reaktors, bei dem nur ein Teil des Reaktorvolumens mit Medium gefüllt und inokuliert wird. Parallel zum Zellwachstum wird Medium zugegeben bis das maximal Volumen erreicht ist.
Fermentation Interface System (FIS)	Interfaceplatine, die den Anschluss analog vorliegender Signale an das MFCS erlaubt
Flagellat	Geißeltierchen, einzelliger begeißelter Eukaryot
Good Manufacturing Procedures	Vorschriften und Verfahren die einen 100 %ig überprüfbar und reproduzierbaren Ablauf eines Herstellungsprozesses erlauben.

Halbschritt	Betriebsart der unipolaren Ansteuerung, bei der im Wechsel eine beziehungsweise zwei benachbarte Spulen aktiv sind. Nach Aktivierung einer Spule wird im nächsten Schritt die in Drehrichtung nächste Spule ebenfalls aktiviert. Im nächsten Schritt wird die vorhergehende Spule deaktiviert.
Imaging	Bildverarbeitung und Bilderkennung mit Computersoftware
Inokulum	Zellmasse, die verwendet wird um eine Kultivierung zu starten
IP(Internet Protocol)	Das IP ist ein wichtiger Bestandteil in einem TCP/IP-basierenden Netzwerk. Es dient der Vermittlung, oder auch Routing, von Datenpaketen im Netzwerk. Dazu haben alle Stationen und Endgeräte eine eigene, einzigartige Adresse im Netzwerk. Sie dient nicht nur zur Identifizierung, sondern auch zum Erkennen eines Teilnetzes, in dem eine Station zu finden ist. Der Header eines IP-Datenpaketes enthält folgende Einträge: IP-Version, Paketlänge, Lebenszeit, Prüfsumme, Senderadresse und Empfängeradresse. Die IP-Adresse ist 32 Bit lang (nach IPv4). Sie ist in 4 Byte zerlegt und wird durch Punkte voneinander getrennt. Jedes Byte kann einen Wert von 0 bis 255 annehmen (xxx.xxx.xxx.xxx). Die IP-Adressen werden in 5 Klassen eingeteilt. In jeder Klasse haben die Netz-ID und die Host-ID unterschiedliche Gewichtungen. ¹
Klient	Ein Programm, das Anfragen/Befehle an einen Server schickt (in den hier beschriebenen Programmen wird danach auf eine Antwort gewartet)
Kommandozeilenversion/-betrieb	Ein Programm, das ohne eine Fensteroberfläche, die über die Maus bedient werden kann, läuft. Die Bedienung erfolgt über eingaben in einem Terminalfenster
Laborprogramm	Programm mit dem die Aktionen der einzelnen Geräte und Abläufe im Labor koordiniert und gesteuert werden. Läuft unter dem Betriebssystem QNX.
Laborsteuerprogramm	siehe Laborprogramm
LAN	Local Area Network
Memory Resident Datapool (MRD)	Daten die den Modulen des MFCS im Speicher aktuell vorliegen
MFCS-Rechner	Computer, auf dem das Multi Fermenter Control System installiert ist

¹Aus: <http://www.e-online.de/cgi-bin/index.cgi?dir=komm> (Kommunikationstechnik)

MFCSwin	Multi Fermenter Control System, für das Betriebssystem Windows; dient zur Datenaufzeichnung und Steuerung von Bioreaktoren
Nadelvolumen	Totvolumen in der Nadel der Pipettierstation
online (Daten)	Daten die jeder Zeit sofort und aktuell ermittelbar sind, wird zum Beispiel durch Sonden oder Elektroden erreicht
offline (Daten)	Daten die nur zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt werden
Optical Character Recognition (OCR)	optische Zeichen- beziehungsweise Buchstabenerkennung, papierende Text-Vorlagen, die mit einem Scanner in den Computer eingelesen wurden, werden in editierbare Text-Dokumente umgewandelt
Original Equipment Manufacturer (OEM)	Hersteller, die für ihre Produkte Original-Einzelteile von anderen Herstellern in Absprache mit diesen verwenden, und die fertigen Produkte unter eigenem Namen auf den Markt bringen
Parität	Möglichkeit der Fehlerprüfung von Daten, bei der ermittelt wird, ob die Daten eine gerade oder ungerade Zahl darstellen. Diese Information wird in dem sogenannten Paritäts- oder Prüfbit gespeichert ²
QNX	ein Betriebssystem
QNXTransfer	Modul das die Übertragung von Daten vom DCS zum MFSCwin erlaubt
Reagenzvolumen	Totvolumen der Pipettierstation zwischen den angeschlossenen Vorratsflaschen und dem Verteilerventil
Robot Control Library	Software-Bibliothek der Programmiersprache C zur Echtzeit-Ansteuerung und graphischen Simulation von Industrie-Roboterarmen
Repeated Batch	Mehrfacher aufeinanderfolgender Batchbetrieb eines Bioreaktors, ein Teil der Zellmasse bleibt im Reaktor und bildet das Inokulum für die nächste Kultivierung
Reduced Instruction Set Coding (statt Coding auch Computer) (RISC)	Computer beziehungsweise Prozessor mit reduziertem Befehlsatz, dadurch werden kürzere Zykluszeiten pro Instruktion erreicht
Server	Ein Programm, das auf Anfragen/Befehle von einen Klienten wartet (in den hier beschriebenen Programmen wird nach Bearbeitung des Befehls eine Antwort gesendet)

²<http://ourworld.compuserve.com/homepages/aoebbeke/>

Spektrometrie	Spektroskopische Verfahren mit dem Schwerpunkt auf der Messung der Extinktion beziehungsweise Absorption
Spektroskopie	Untersuchung der energieabhängigen Wechselwirkung zwischen Probe und Strahlung. Üblich sind neben sichtbarem Licht auch IR- (Infrarot-) und UV- (Ultraviolett-) Strahlung. Die Energie der Strahlung variiert hierbei mit der ihrer Wellenlänge. Bei der Emissions-Spektroskopie sendet die Probe selber Strahlung aus. Absorptions-Spektrometer messen wieviel Licht von einer Probe durchgelassen wird, die Extinktion zeigt dabei oft eine einfache Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Probe
Spritzenvolumen	Volumen der in die Pipettierstation eingebauten Spritze
Stoffmengenkonzentration	Gehaltsangabe, definiert als Stoffmenge der Komponente geteilt durch das Volumen der Mischung, abgekürzt mit c
Superspinner	Begaste Spinnerflasche, die Begasung erfolgt über einen Rührer, auf den die Begasungsmembran aufgespannt ist
TCP (Transmission Control Protocol)	Das TCP hat die Aufgabe alle empfangene Datenpakete dem Sender zu bestätigen. Gleichzeitig muß jedes gesendete Datenpaket solange wiederholt gesendet werden, bis der Empfang bestätigt wurde. Die Programme und Protokolle oberhalb der Transportschicht können sich also fest auf die Übertragungsgarantie von TCP verlassen. Der Verwaltungsoverhead, der dabei entsteht bremst die Performance der Datenübertragung allerdings in erheblichen Maße aus. Jedes Datenpaket, das TCP verschickt, wird ein Header vorangestellt, der die folgenden Daten enthält: Sender-Port, Empfänger-Port, Paket-Reihenfolge(Nummer), Prüfsummen und Quittierungsnummer ³
TCP/IP	TCP/IP ist eine Protokoll-Kombination, die die Schichten Transport und Vermittlung aus dem OSI-Schichtenmodell erfolgreich verbindet. Das Aufkommen des Internets hat zu einem ungeahnten Erfolg für TCP/IP verholfen. Es ist damit weltweit der Netzwerkstandard im LAN(Local Area Network) und im WAN(Wide Area Network).
teachen	Programmierung einer Roboterbewegung durch genaue feste Vorgabe der durchzuführenden Bewegung
unipolar	Ansteuerung, bei der jeweils nur ein Magnetpol in den Spulen erzeugt wird
Verbindungsvolumen	Totvolumen der Pipettierstation zwischen Spritze und MVP

³Aus: <http://www.e-online.de/cgi-bin/index.cgi?dir=komm> (Kommunikationstechnik)

Viabilität	Kenngröße einer Zellkultur, Verhältnis von lebenden Zellen zu Gesamtzellzahl in Prozent
Vollschritt	Ansteuerung, bei der jeweils die gegenüberliegenden beziehungsweise nebeneinanderliegenden Magneten ein entgegengesetztes Magnetfeld führen.
WAN	Wide Area Network

Anhang B

Abkürzungen

Einheiten

°	Grad
°C	Grad Celsius
g	Gramm
l	Liter
μ	mikro (10^{-6})
m	Meter oder milli (10^{-3})

Sonstiges

Abk.	Abkürzung
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
bzw.	beziehungsweise
CHO	Chinese hamster ovary
d.h.	das heißt
DCS	Device Control System
DCU	Digital Control Unit
FIS	Fermentation Interface System
GUI	Graphical User Interface, Oberfläche zur Bedienung eines Programms

GMP	Good Manufacturing Procedures
GND	Ground, Masse einer elektrischen Verdrahtung
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography
LDH	Laktatdehydrogenase
MRD	Memory Resident Datapool
NH ₄ ⁺	Ammonium
HSA	humanes Serumalbumin
Nr.	Nummer, Nummerierung
OCR	Optical Character Recognition
OEM	Original Equipment Manufacturer
RCCL	Robot Control C-Library
RISC	Reduced Instruction Set Coding/Computer
RxD	Receive Data, Verdrahtung auf der die Daten auf einer RS 232 Schnittstelle an ein Gerät gesendet werden
SD	Standardabweichung = mittlere quadratische Abweichung = mittlerer Fehler = empirische Streuung
TxD	Transmit Data, Verdrahtung auf der die Daten auf einer RS 232 Schnittstelle von einem Gerät gesendet werden

Literaturverzeichnis

- [Biophile Inc., 2003] Biophile Inc. (2003). *IVR: Vial Storage*. <http://www.biophileinc.com>.
- [Chapman, 2003] Chapman, T. (2003). Automation on the move. *Nature*, 421:661 – 666.
- [Datamonitor, 2003] Datamonitor (2003). *Summary of Emerging Biotechnology Players: From Innovation to Realization*. Report on Healthcare/Biotechnology, <http://www.datamonitor.com>.
- [GIMAT Umweltmesstechnik, 2004] GIMAT Umweltmesstechnik (2004). *Probenehmer*. <http://www.gimat.de/Deutsch/Produkte/Probenehmer/probenehmer.html>.
- [Hakemeyer, 2003] Hakemeyer, C. (2003). *Etablierung eines Fed-Batch Prozesses mit „metabolic shift“ in tierischen Zellkulturen*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- [Heidemann, 1995] Heidemann, R. (1995). *Bestimmung und Anwendung zellspezifischer Parameter für die Kultivierung tierischer Zellen in Bioreaktoren*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- [ISB, 2004] ISB (2004). Marktdaten. <http://www.i-s-b.org/business/marketdata.f.htm>.
- [Joeris et al., 2002] Joeris, K., Frerichs, J.-G., Konstantinov, K., and Scheper, T. (2002). In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures. *Cytotechnology*, 38 Nr. 1:129–134.
- [Korrat, 2003] Korrat, A. (2003). *Entwicklung, Programmierung und Test eines Probenahmeautomaten zum Einsatz am biotechnologischen Reaktor*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- [Lütkemeyer, 1993] Lütkemeyer, D. (1993). *Mikroporöse Membranionenaustauscher zur schnellen Reinigung von Proteinen aus tierischen Zellkulturen*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- [Plahl, 1998] Plahl, S. (1998). *Automatisierung im Labor: Planung einer Roboter-Arbeitszelle und Entwicklung einer vollautomatischen sterilisierbaren Probenentnahme*. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

- [Sandeep et al., 1993] Sandeep, P. K., Nadler, T. K., Wang, D. I. C., and Regnier, F. E. (1993). Automated process monitoring of monoclonal antibody production. *Anal. Chem.*, ISBN/ISSN 1520-6882, 270, Nr. 1, 65(23):3363 – 3367.
- [Schaefer et al., 1999] Schaefer, U., Boos, W., Takors, R., and Weuster-Botz, D. (1999). Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Analytical Biochemistry*, 270, Nr. 1:88–96.
- [Scherer, 2004] Scherer, T. (2004). *A Mobile Service Robot for Automization of Sample Taking and Sample Management in a Biotechnological Pilot Laboratory*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- [Stiens, 2001] Stiens, L. R. (2001). *Entwicklung eines Produktionsprozesses für den rekombinanten humanen TSH-Rezeptor*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- [TAP, 2003] TAP (2003). TAP–Homepage. <http://www.automationpartnership.com>.
- [Tebbe, 1997] Tebbe, H. R. (1997). *Zweistufige, kontinuierliche Zentrifugation zur Abtrennung von tierischen Zellen und Zelldebris aus Kultursuspensionen*. Dissertation, Universität Bielefeld.
- [Tennant, 1964] Tennant, J. R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, 2:685–694.
- [WTW GmbH, 2004] WTW GmbH (2004). *Katalog Probenahme*. http://www.wtw.com/media/Onlinekatalog2004_DE_web.pdf.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Übersichtsdiagramm Probenentnahmeablauf	4
2.1	Hierarchie des Laborsteuerungsprogramms	16
2.2	Der mobile autonome Roboter	18
2.3	Schematischer Aufbau der Probenentnahmestationen	20
2.4	Nadel der Probenentnahmestation	21
2.5	ELVAMAT	22
2.6	Linear-Roboter der Firma SigPositec	24
2.7	Linear-Schlitten der Firma Festo	25
2.8	Schema der Programmstrukturen für die Steuerung der Probenentnahme	26
2.9	Pipettierstation	29
2.10	Interfaceplatine des PSD/2	30
2.11	Vorder- und Rückseite des MVP	31
2.12	Verknüpfung der zum Modul der Pipettierstation gehörenden Einzelteile	33
2.13	Das automatische Zellzählgerät CEDEX	35
2.14	Schematisches Blockbild des CEDEX	36
2.15	Barcodescanner mit zwei markierten Gefäßen	39
2.16	Beispiel eines Barcodes	41
2.17	Datenübermittlung der Zentrifuge	42
2.18	Datenübertragung an das MFCS	44
2.19	Konfiguration der Variablen einer Process Unit	45
2.20	Konfiguration einer zyklischen Variable	46
2.21	Notwendige Einstellungen bei einem Batch Setup	46

3.1	Übersicht des Aktionsraumes des autonomen Roboters	48
3.2	Navigation des autonomen Roboters im Labor	49
3.3	Bildverarbeitung des autonomen Roboters	50
4.1	Lebend- und Totzelldichte, ELVAMAT, 20 l Kultivierung	57
4.2	Glukose- und Laktatkonzentrationen, ELVAMAT, 20 l Kultivierung	57
4.3	LDH-Aktivität, ELVAMAT, 20 l Kultivierung	58
4.4	Gesamtzelldichte, ELVAMAT, 100 l Kultivierung	60
4.5	Kohlenhydratgehalt, ELVAMAT, 100 l Kultivierung	60
4.6	Glukosekonzentration, ELVAMAT, 100 l Kultivierung	61
4.7	Verdünnung der Probe durch Kondensat, Linear-Roboter	62
4.8	Reproduzierbarkeit der Verdünnungsmessung, Linear-Roboter	63
4.9	Temperatur der Reaktorprobe, Linear-Roboter	63
4.10	Prozesswerte, 20 l Kultivierung, Linear-Roboter	64
4.11	Lebendzelldichte und Viabilität, 20 l Kultivierung, Linear-Roboter	65
4.12	Glukose- und Laktatkonzentration, 20 l Kultivierung, Linear-Roboter	65
4.13	LDH-Aktivität, 20 l Kultivierung, Linear-Roboter	66
4.14	Geschwindigkeit in den Kapillaren der Pipettierstation	71
4.15	LDH-Aktivität und Totanteil nach pipettieren	72
4.16	Totanteil mit Wartezeit nach Pipettieren	73
4.17	Zelldichten beim automatischen Pipettieren	74
4.18	Reservoir für das zellhaltige Aliquot	75
4.19	Zelldichten beim automatischen Pipettieren	76
4.20	Versuch zur Auflösung von Aggregaten, Lebendzellzahl	78
4.21	Versuch zur Auflösung von Aggregaten, Viabilität	79
4.22	Repeated Batch Kultivierung einer CHO-Zelllinie im 2 l Maßstab, Lebendzell- dichte	81
4.23	Repeated Batch Kultivierung einer CHO-Zelllinie im 2 l Maßstab, Viabilität	82
4.24	Beispiel eines Barcodes	84
4.25	Automatische Übertragung der Barcode- und CEDEX-Daten	85
4.26	Automatische Übertragung der Daten an das MFCS	86
5.1	Hybridom Kultivierung: Zelldichte, Viabilität	90

5.2	Hybridom Kultivierung: Viabilität, Zelldurchmesser	91
5.3	Hybridom Kultivierung: Glukose, Laktat, Ammonium	91
5.4	Hybridom Kultivierung: Aminosäuren	92
5.5	Erste CHO Kultivierung: Zelldichte, Viabilität	95
5.6	Erste CHO Kultivierung: Viabilität, Zelldurchmesser	96
5.7	Erste CHO Kultivierung: Glukose, Laktat, Ammonium	96
5.8	Erste CHO Kultivierung: Aminosäuren	97
5.9	Zweite CHO Kultivierung: Zelldichte, Viabilität	100
5.10	Zweite CHO Kultivierung: Viabilität, Zelldurchmesser	101
5.11	Zweite CHO Kultivierung: Glukose, Laktat, Ammonium	101
5.12	Zweite CHO Kultivierung: Aminosäuren	102
5.13	Vergleich der Kultivierungen	104

Tabellenverzeichnis

2.1	Parameter der Pipettierstation	28
2.2	Anschlüsse für die Kommunikation des PSD/2	30
2.3	Anschlüsse für die Spannungsversorgung des PSD/2	32
3.1	Protokolldatei einer Probenentnahme	52
4.1	Probenmengen je Ventilöffnungszeit, 20 l Reaktor bei 200 mbar Überdruck .	56
4.2	Schlauchlängen und Durchmesser der Probenentnahmestation am 20 l Reaktor	56
4.3	Probenmengen je Ventilöffnungszeit, 100 l Reaktor ohne Überdruck	59
4.4	Schlauchlängen und Durchmesser der Probenentnahmestation am 100 l Reaktor	59
4.5	Pipettiergenauigkeit: Spritzenvergleich	69
4.6	Pipettiergenauigkeit: Vergleich automatisch/manuell	70
4.7	Pipettiergenauigkeit: Spritzen/Geschwindigkeitsvergleich	70
5.1	Standard-Kultivierungsparameter	87

Lebenslauf

Iris Poggendorf

03.08.70 Geburt in Hamburg

Schulzeit

1977–1981 Besuch der Grundschule in Hamburg

1981–1990 Besuch des Gymnasiums in Hamburg

Berufliche Ausbildung

1990 - 1994 Berufliche Ausbildung zur Kommunikationselektronikerin,
Fachrichtung Funktechnik, bei der Deutschen Lufthansa

Berufliche Tätigkeiten und Praktika

1994 - 1996 Arbeit als Industrieelektronikerin bei der Noell AG, Niederlassung Hamburg

1996 Hauptpraktikum im naturwissenschaftlich-umwelttechnischen Labor und Büro Dr. R. Wienberg, Hamburg

1997 Praktikum bei der Beiersdorf AG, Abteilung Industrial Engineering, Niederlassung Hamburg

Studium

Januar 1994 Beginn des Studiums der Umwelttechnik an der FH Hamburg

1998-1999 Diplomarbeit *Adaptive Regelung der spezifischen Wachstumsrate während einer Hochzelldichtekultivierung*

Promotion

1999 - 2004 Promotion am Lehrstuhl Zellkulturtechnik der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld bei Prof. Dr.-Ing. J. Lehmann.