

Solutiheyden mittaaminen bioreaktoreissa

TkK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
Maaliskuu 2024
Mariel Turkia

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

MARIEL TURKIA: Solutiheyden mittaaminen bioreaktoreissa

Tekniikan kandidaatti tutkielma, sivumäärä 18 s., 0 liites.

Biotekniikka

Maaliskuu 2024

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Bioprosessin optimointia varten solutiheyden seuraaminen on kriittistä. Solutiheyttä mittaamalla saadaan tietoa solukasvatuksesta, jolloin voidaan arvioida miten bioreaktorin olosuhteita kannattaa säädellä tuotannon kannalta ihanteelliseksi. Biotuotanto ja sen kannattavuuden optimointi on tuonut painetta uusien solutiheys mittausten kehittämiseen. Nykyään menetelmissä painotetaan varsinkin reaaliaikaisuutta. Tutkielman tavoitteena on käsitellä erilaisia nykyaikaisia solutiheyden mittausten menetelmiä sekä niiden ominaisuuksia.

Solutiheyden mittausten menetelmät perustuvat eri tekniikoihin kuten optiseen mittaukseen, virtausytometriin, kapasitanssi- tai ultraäänimittauksiin. Optiset mittaustekniikat, kuten turbidimetria, nefelometria, keskitetty sädereflektanssimittaus, valokerroskuvaus ja Raman-spektroskopia, käyttävät valoa arvioimaan solutiheyttä. Virtausytometriassa voidaan käyttää myös valoa solukasvatusten arviointiin, mutta myös fluoresenssisignaaleita sekä solujen kykyä toimia sähköisinä eristeinä. Kapasitanssimittaustekniikat perustuvat sähkökentän muutoksiin ja ultraäänitekniikat äänen takaisinheijastukseen. Mittaustekniikoiden lisäksi tutkielmassa käydään läpi erilaisia lähestymistapoja solutiheyden mittaamiseen kuten in-, on-, at- ja offline-mittaukset, kajoava ja kajoamaton mittaus sekä reaaliaikaisuus.

Yleisesti menetelmien soveltuvuus riippuu solutyypistä, bioreaktorin vaatimista olosuhteista sekä kasvatuksen koosta, joten siksi monenlaisia mittaustekniikoita on markkinoilla. Tutkielma pyrkii antamaan kattavan kuvan eri solutiheyden mittausten menetelmistä, niiden ominaisuuksista ja soveltuvuudesta erilaisiin bioprosesseihin.

Asiasanat: solutiheys, biotuotanto, mittaustekniikka, bioreaktori

Sisällys

1	Johdanto.....	2
2	Lähestymistavat.....	2
2.1	<i>In-, on-, at- ja offline-mittaus.....</i>	2
2.2	<i>Reaaliaikainen mittaus.....</i>	4
2.3	<i>Kajoava ja kajoamaton mittaus.....</i>	4
3	Mittaustekniikat	5
3.1	<i>Optiset mittaustekniikat.....</i>	5
3.1.1	<i>Turbidimetria.....</i>	5
3.1.2	<i>Nefelometria.....</i>	6
3.1.3	<i>Keskitetty sädereflektanssimittaus</i>	7
3.1.4	<i>Valokerroskuvaus</i>	8
3.1.5	<i>Raman-spektroskopia.....</i>	10
3.2	<i>Virtaussytometria.....</i>	10
3.3	<i>Kapasitanssimittaustekniikat</i>	12
3.4	<i>Ultraäänimittaustekniikat.....</i>	14
4	Yhteenveto	15

1 Johdanto

Biotuotannossa hyödynnetään biologisia systeemejä, kuten soluja ja entsyymejä tuottamaan biomolekyylejä, joita käytetään muun muassa elintarvike-, energia-, materiaali- ja lääketieteellisyydessä (Y.-H. P. Zhang ja muut 2017). Jotta biotuotannosta saadaan mahdollisimman tehokasta ja kannattavaa, bioprosessia optimoidaan säätämällä bioreaktorin olosuhteita solukasvatukselle optimaaliseksi. Tuotantotehokkuus on riippuvainen solutiheydestä (Kleman ja Strohl 1992), joka tekee siitä kriittisen parametrin arvioidessa bioprosessia. Lisäksi solutiheyttä seuraamalla voidaan havaita solukasvatuksessa tapahtuvia muutoksia sekä arvioida vaadittavia jatkotoimia kasvatuksen tasaiseen ylläpitoon.

Fermentointia on hyödynnetty jo tuhansia vuosia muun muassa elintarvikkeiden tekoon. Kuitenkin vasta 1900-luvun alkupuolella Chaim Weizmann toi fermentoinnin teollisuusmittakaavaan valmistamalla asetonia bioreaktoreissa. (O'Mara ja muut 2018.) Nykyään bioprosessien seuranta ja hallintaa pyritään jatkuvasti kehittämään reaaliaikaiseksi ja automaattiseksi. Vuonna 2004 Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (*engl.* Food and Drug Administration, FDA) julkaisi ohjeet prosessianalyysitekniikan käytöstä biofarmaseuttisessa tuotannossa. FDA:n ohjeet painottavat bioprosessin kriittisten piirteiden reaaliaikaista tarkkailua ja kontrollointia (Moore ja muut 2019), mikä on osaltaan tuonut painetta kehittää uusia reaaliaikaisia antureita ja mittaustekniikoita bioreaktoreihin. Tämä tutkielma käsittelee solutiheyden erilaisia mittaustekniikoita sekä niiden erilaisia ominaisuuksia ja vaatimuksia. Tutkielmassa käsitellään myös kaupallisia esimerkkejä sekä menetelmien haasteita.

2 Lähestymistavat

2.1 In-, on-, at- ja offline-mittaus

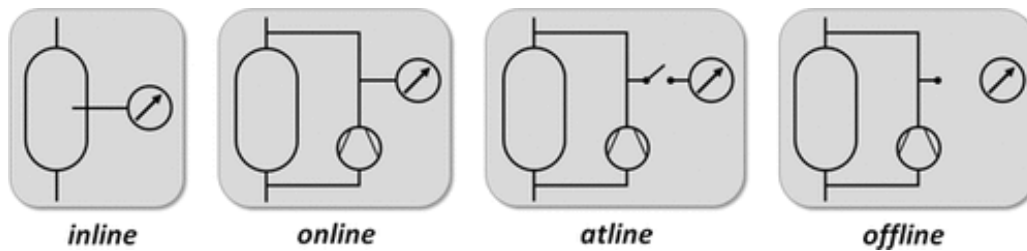
In-, on-, at- ja offline termit kuvaavat tapoja, miten mittaus voidaan sijoittaa prosessiin (**kuva 1**). Solutiheyttä voidaan mitata jokaisella näillä eri tavalla riippuen kuitenkin mittaustekniikasta.

Inline-mittauksessa mitattavaa näytettä ei poisteta prosessista. Inline-anturit voivat mahdollistaa reaaliaikaisen tiedon keräyksen. (Food and Drug Administration 2004.) Kun inline-anturit ovat itse prosessin eli bioreaktorin sisällä, niiden täytyy kestää sterilointiesikäsitely sekä bioreaktorin olosuhteet (Paasikallio 2010).

Online-mittauksessa näyte ohjataan prosessista pois mitattavaksi. Mittauksen jälkeen näyte voidaan palauttaa prosessiin. (Food and Drug Administration 2004.) Online-mittaus on yhdistetty prosessiin siten että anturi on yhteydessä bioreaktoriin. Toisin kuten inline-mittauksessa, online-mittausanturi ei ole kuitenkaan suoraan esimerkiksi bioreaktorin sisällä, jonka vuoksi mittaus voi olla hitaampaa sekä prosessin kontrollointi mittaustulosten avulla voi olla heikompaa. Koska anturi ei ole bioreaktorin sisällä, online-antureiden ei välttämättä tarvitse kestää sterilointia. (Paasikallio 2010.) Vaikka mittaus saattaa olla hitaampaa kuin inline-antureilla, online-antureilla on myös mahdollista kerätä reaaliaikaista tietoa prosessista.

Atline-mittauksessa näyte otetaan prosessista erilleen, mutta näytteen analysointi tapahtuu prosessin läheisyydessä (Food and Drug Administration 2004). Koska näyte otetaan erilleen bioreaktorista, steriilit olosuhteet on varmistettava näytteenotossa sekä analysoinnissa. Atline-mittaus voidaan toteuttaa manuaalisesta tai käyttämällä automaattisia näytteenotto- ja analysointilaitteita. Kuitenkin mittaustulokset voivat tulla liian hitaasti reaaliaikaiseen kontrollointiin. (Hamilton 2024a.)

Offline-mittauksessa näyte otetaan erilleen prosessista, ja sen analysointi tapahtuu erillään, minkä vuoksi näytteenotto ja analysointi vaativat steriilit olosuhteet. Offline-mittaus toteutetaan manuaalisesti, minkä takia mittaustulokset tulevat in-, on- ja atline-mittaustapoja hitaammin. Hitauden vuoksi reaaliaikainen kontrollointi ei ole mahdollista, ja näytteenotto on yleensä harvempaa. (Hamilton 2024a.) Lisäksi näytteen kontaminaatoriski on suurempi kuin in- tai online-mittauksessa, koska näyte otetaan erilleen bioreaktorista.



Kuva 1. In-, on-, at- ja offline-mittaustavat (Minnich ja muut 2016).

2.2 Reaaliaikainen mittaus

Jos mittaustulokset saapuvat niin nopeasti, että tuloksien perusteella pystytään tekemään jatkotoimia, on kyseessä reaaliaikainen mittaus. Minnich ja muut (2016) suosittelevat, että reaaliaikainen-termiä käytettäisiin vain, jos siihen liittyvät kolme kriteeriä täyttyvät. Ensimmäisen kriteerin mukaan koko mittausprosessin kuuluisi olla kyllin nopea verrattuna mitattavien komponenttien muutoksiin. Toisen kriteerin mukaan analyysituloksien kuuluisi saapua niin nopeasti, että ne edustavat odotettuja fysikaaliskemiallisia muutoksia. Kolmannen kriteerin mukaan mittaustuloksien kuuluisi saapua tarpeeksi nopeasti, jotta tuloksien perusteella ehditään tehdä ajankohtaisia jatkotoimia prosessiin.

Reaaliaikaisten mittaustulosten avulla prosessin eri parametreihin voidaan vaikuttaa ajankohtaisesti, minkä ansiosta prosessin hallinta on tasaisempaa sekä nopeampaa. Esimerkiksi jos solutiheys laskee yllättäen, reaaliaikaisten antureiden avulla muutoksen pystyy havaitsemaan ja tarvittavat jatkotoimet solutiheyden tasaamiseksi on mahdollista toteuttaa. Reaaliaikainen mittaus vaatii kuitenkin in-, on- tai atline-mittausanturin, joka ei välttämättä sovellu prosessin olosuhteisiin tai vaatimuksiin, kuten sterilointiin.

2.3 Kajoava ja kajoamaton mittaus

Kajoavassa mittauksessa mittausanturi on kosketuksissa prosessiin. Kun solutiheyttä mitataan kajoavasti, mittausanturi asetetaan bioreaktorin sisälle niin että se on kosketuksissa solukasvatukseen. Kajoavan mittauksen vastakohta on kajoamaton mittaus, jossa mittausanturi ei ole kosketuksissa prosessiin eli ei ole bioreaktorin sisällä. (Callis ja muut 1987; Minnich ja muut 2016.)

Minnich ja muiden (2016) mukaan mittauksen lajittelu kajoavaan tai kajoamattomaan mittaukseen ei kuitenkaan välttämättä kerro oleellisesti mittauksesta ja sen vaatimuksista. Jos bioreaktorin solutiheyden mittaus toteutetaan esimerkiksi optisella anturilla läpinäkyvän ikkunan läpi tai sama optinen anturi laitetaan bioreaktorin sisälle, tutkimusryhmän (Minnich ja muut 2016) mukaan mittauslähestymistapa ei vaikuta itse mittaukseen oleellisesti vaan lähinnä sterilointiesikäsittelyn tarpeeseen.

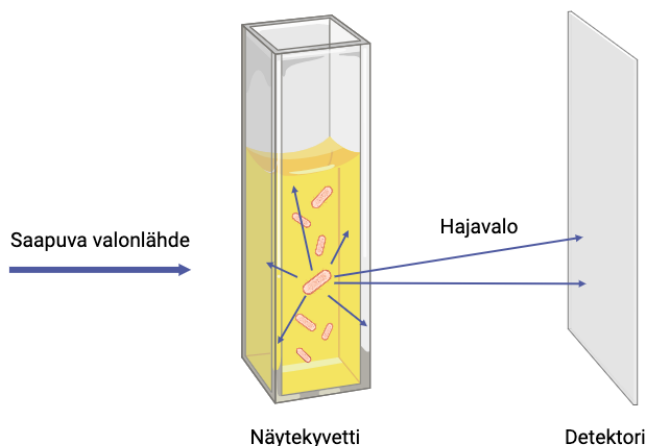
3 Mittaustekniikat

3.1 Optiset mittaustekniikat

Optiset solutiheyden mittaustekniikat perustuvat valon mittaamiseen. Solut muuttavat valon kulkua; muun muassa valo voi sirota solujen pinnasta. Valon kulun muutosten perusteella voidaan arvioida solutiheyttä. Seuraavissa kappaleissa käsitellään erilaisia optisia solutiheysmittaustekniikoita, kuten turbidimetriä, nefelometriä, keskitetty sädereflektanssimittausta, valokerroskuvantaa sekä Raman-spektroskopiaa.

3.1.1 Turbidimetria

Turbidimetria on sameuden mittaamista, ja sitä voidaan hyödyntää näytteen solutiheyden selvittämisessä (**kuva 2**). Näytteen sameus määritetään spektrofotometrisesti mittaamalla spektrofotometrin valotielle jäävän valon määrää. Von Weymarnin ja muiden (2002) mukaan mittaus perustuu enemmän valon sirontaan solujen pinnasta kuin valon absorptioon. Turbidimetrian yksikkönä voidaan käyttää yksikköä nimeltä optinen tiheys eli OD (*engl.* Optical density). Kokonaissolutiheys voidaan mitata 600 nanometrin aallonpituudella ja silloin voidaan käyttää OD₆₀₀:aa yksikkönä. (von Weymarn ja muut 2002.) Optiset tiheysanturit eivät pysty erottelemaan eläviä ja kuolleita soluja toisistaan eikä kasvatusliuoksen muita partikkeleita soluista (Marose 1999).



Kuva 2. Turbidimetrian perusperiaate

On olemassa optisen tiheyden online-antureita, jotka mittaavat solutiheyttä näkyvän valon tai lähi-infrapun aallonpituuksilla. Nämä anturit mahdollistavat solutiheyden online-mittaukset ilman ajoittaista kalibrointia. (Marose 1999.) Esimerkiksi Hamilton valmistaa reaaliaikaisia Dencytee Arc inline-antureita, jotka perustuvat turbidimetriaan ja mittaavat kokonaissolutiheyttä lähi-infrapun aallonpituuksilla (Hamilton 2024b).

Turbidimetriaan perustuvien antureiden käyttöskaala eri solutyypin, -muotojen ja -konsentraatioiden kanssa voi tuottaa ongelmia. Valon sironta ja absorptio ovat epälineaarisesti riippuvaisia solutiheydestä, mikä vaikeuttaa oikeiden kalibrointi- ja regressioanalyysimenetelmän valintaa. Lisäksi antureiden antamien tuloksien toistettavuutta sekä antureiden kestävyyttä hankaloittaa biomassan ja proteiinien kerääntyminen antureiden päihin. Prosessiin sisään sijoitettujen antureiden antamat tulokset ovat myös alttiita kuplille. (Marose 1999.)

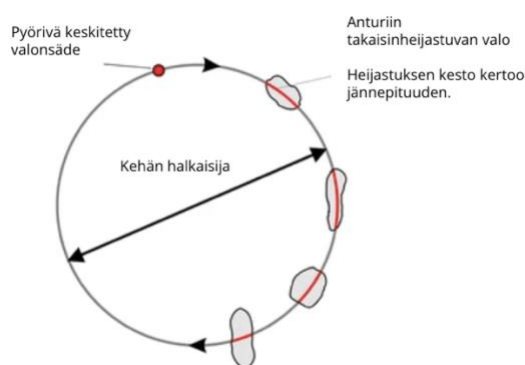
3.1.2 Nefelometria

Nefelometriassa mitataan liuenneiden partikkeleiden aiheuttamaa valon hajontaa. Toisin kuin turbidimetriassa, nefelometriassa mitataan valotieltä pois sironneen valon määrää. Nefelometrinen sameusaste kuvaa solutiheyttä, koska valon hajonnan määrä on suoraan verrannollinen solutiheyteen (Thoré ja muut 2021). Menetelmä esiteltiin jo vuosikymmeniä sitten, mutta Thoré ja muut (2021) arvioivat sen kehittyneen tehokkaaksi solukasvatusten mittaustekniikaksi vasta viime aikoina.

Nefelometriaa käytetään erityisesti leväkasvatusten seurannassa, koska mittaustekniikka on riippumaton solujen pigmentoinnista (Calmes ja muut 2020). Mikrolevien biomassan seurantaan on käytetty myös turbidimetriä sekä fluoresenssiin perustuvaa fluorometriä, mutta solujen pigmenttipitoisuus vaihteluiden vuoksi menetelmät ovat lopulta monimutkaisempia kuin nefelometria (Thoré ja muut 2021). Tutkimusryhmät (Calmes ja muut 2020; Thoré ja muut 2021) ovat osoittaneet nykyaikaisten nefelometriaan perustuvien kajoamattomien reaaliaikaisten antureiden sopivan leväkasvatusten solutiheyksien mittaukseen.

3.1.3 Keskitetty sädereflektanssimittaus

Keskitetty sädereflektanssimittaus (*engl.* Focused beam reflectance measurement, FBRM) on patentoitu optinen mittaustekniikka, joka perustuu näytteestä takaisinheijastuvan detektointiin (**kuva 3**). Mittausmenetelmässä laserdiodilla tuotettu valonsäde keskitetään tiettyyn polttopisteeseen linssien avulla ja mittaussysteemi pyörittää polttopistettä ympyränmuotoista kehää pitkin suurella nopeudella. Kun valonsäde kohtaa partikkelin, partikkelista anturiin takaisinheijastuva valo kerätään mittaussysteemiin ja valofotodetektorin avulla valoenergia muutetaan sähköiseksi signaaleiksi. Reflektiosignaalin kestosta määritetään partikkelien jännepituudet, jotka korreloivat partikkelien koon kanssa ja detektoitujen jännepituuksien taajuus kertoo partikkelien määrän fokustasossa. (Tadayyon ja Rohani 1998.)



Kuva 3. FBRM:n mittausmenetelmän peruseriaate. Kuva muokattu lähteestä (Höpfner ja muut 2010).

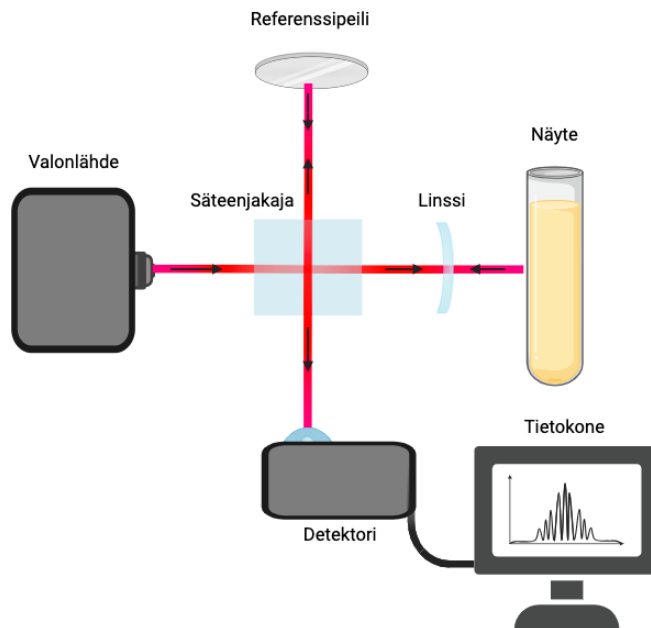
FBRM mittausmenetelmää on käytetty seuraamaan solujen kasvua sekä niiden morfologisia muutoksia (Pearson ja muut 2004, 2008). Tutkimusryhmä (Pearson ja muut

2004) käytti onnistuneesti FBRM mittaustekniikkaan *Streptomyces natalensis* kasvun offline-mittaukseen ja kertoo alustavien FBRM inline-mittaustuloksen olevan lupaavia.

3.1.4 Valokerroskuvaus

Valokerroskuvaus on interferometrinen kuvantamistekniikka, jonka avulla saadaan poikkileikkauskuvia biologisista näytteistä (Schmitt 1999). Valokerroskuvaus kehitettiin alun perin silmän kuvantamiseen, mutta nykyään tekniikka on laajasti käytössä biologisissa, lääketieteellisissä sekä materiaalitutkimuksissa (Boppart 2005).

Valokerroskuvaus perustuu näytteestä takaisinheijastuvan valon optiseen etäisyysmittaukseen (**kuva 4**). Koska valon nopeus on suuri, heijastuvan valon viivettä ei voida mitata suoraan, vaan täytyy käyttää interferometrisiä keinoja. Yksi keino on käyttää Michelsonin interferometriä, jossa valon säde jaetaan kahteen: referenssivalonsäteeseen ja näytteeseen ohjattavaan valonsäteeseen. Referenssivalonsäde ohjataan kulkemaan tunnetun matkan, jonka lopuksi se interferoituu näytteeseen ohjatun valonsäteen takaisinheijastuvien säteiden kanssa. Interferoivat valonsäteet voimistavat tai heikentävät toisiaan riippuen niiden vaihe-erosta ja niiden summa muodostaa interferenssikuvion. Interferenssikuvio muuttuu sen perusteella kuinka pitkän matkan näytteestä takaisinheijastuvat valonsäteet kulkevat, koska kuljettu matka vaikuttaa valonsäteiden vaihe-eroon. Interferenssisignaalit havaitaan, kaistanpäästösuodatetaan elektronisesti, demoduloidaan, digitalisoidaan ja tallennetaan tietokoneeseen. (Boppart 2005.)



Kuva 4. Valokerroskuvauksen peruseriaate

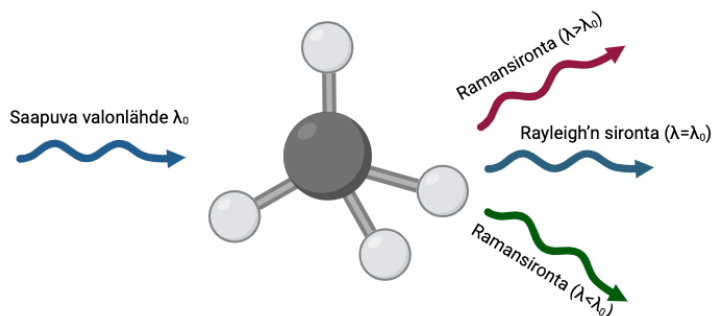
OCTiCell on ChromoLogic LLC:n valmistama kaupallinen esimerkki kajoamattomasta reaaliaikaisesta inline-solukasvatusmittausanturista, joka perustuu valokerroskuvantaan. Mittaussysteemi ei vaadi käyttäjävuorovaikutusta, joten mittaus voi olla jatkuvaa sekä mahdollista etänä. Anturi pystyy seurata bioreaktorin solukasvatusta ikkunan tai läpinäkyvän seinän läpi ilman että itse anturi on bioreaktorissa. Koska solukasvatus ei pysy paikallaan bioreaktorissa, OCTiCellissa on kiinteä kuvantamissäde, joka kuvaa solukasvatusta, kun se liikkuu säteen ohitse. Kuvantamisdatan perusteella voidaan muodostaa etäisyys-aikakuva, jonka avulla voidaan määrittää solutiheys, solujen koko sekä solujen elossaolo. Mittausanturi laskee solukonsentraation sen perusteella, kuinka monta solua havaitaan sekunnissa. (Brehove ja muut 2023.)

Brehoven ja muiden (2023) testasivat OCTiCell mittausanturia kiinankääpiöhamsterin munasarjasolujen (*engl.* Chinese hamster ovary cell line, CHO) ja UT7-erytropoietiini erytroleukeemisten solujen kanssa ja saatujen yksittäisten kohteiden koko- ja intensiteettitulokset vaihtelivat. Tutkimusryhmä uskoo vaihtelun johtuvan siitä, että objektit ohittavat kuvantamissäteen keskuksen eri etäisyyksillä, jonka takia objektit valaistuvat epätasaisesti toisiinsa verrattuna sekä itse objektissa. Tutkimusryhmän mukaan tämä voi viitata siihen, että mittaus herkkyys riippuu mitattavan objektin koosta. Kuitenkin solukonsentraation tarkka mittaus on mahdollista tutkimusryhmän mukaan, koska anturi kalibroidaan jokaisen kasvatuksen alussa ja solujen suhteellinen

lisääntyminen johtaa signaalin suhteelliseen kasvuun. Kuitenkin jos solujen koko vaihtelee kasvatuksen aikana, signaalin kasvu ei ole enää suhteessa solukonsentraatioon. (Brehove ja muut 2023.)

3.1.5 Raman-spektroskopia

Kun molekyyliin kohdistetaan valoa, molekyyli absorboi ja heijastaa sitä. Takaisinheijastuvan valon fotonien taajuus pysyy suurimmalla osalla samana, ja tätä kutsutaan Rayleigh'n sironnaksi. (Buckley ja Ryder 2017.) Kuitenkin pieni osuus fotoneista heijastuu molekyylistä eri taajuudella, suuremmalla tai pienemmälle, ja tätä kutsutaan Raman-sironnaksi (Lewis ja Edwards 2001) (**kuva 5**). Raman-sironneissa fotoneissa on tietoa molekyylin rakenteesta (Buckley ja Ryder 2017), ja tähän tietoon perustuu Raman-spektroskopia mittaamenetelmä. Bioreaktorin solutiheyttä voidaan seurata Raman-spektroskopialla, ja se voi olla kajoamaton reaaliaikainen in- tai online-mittaustapa. Tutkimusryhmät (Abu-Absi ja muut 2011; Mehdizadeh ja muut 2015) ovat käyttäneet Raman-spektroskopiaa seuraamaan elävien CHO-solujen konsentraatioita. Raman-spektroskopiaa on käytetty myös bakteerisolujen inline-seurannassa (Lee ja muut 2004). Haasteena Raman-spektroskopiassa on datan käsittely (Brehove ja muut 2023), mutta mittaustekniikkaa hyödyntävä sovellus on jo markkinoilla: Merckin ProCellics™ Raman Analyzer, joka on reaaliaikainen inline-analysointilaitteisto (Merck 2024).

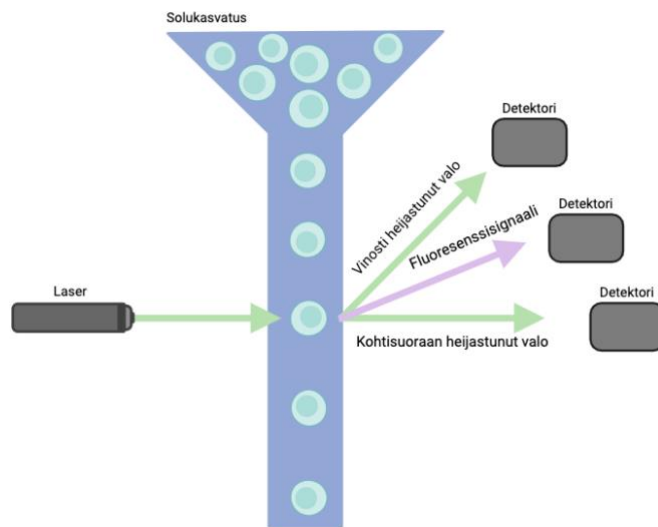


Kuva 5. Raman-sironta ilmiö

3.2 Virtaussytometria

Virtaussytometria on mittaustekniikka, jonka avulla voi analysoida yksittäisiä soluja tai muita partikkeleita. Menetelmässä lasereiden avulla tuotetaan valoa, joka heijastuu takaisin soluista detektorille (**kuva 6**). Takaisinheijastuksen lisäksi menetelmässä

hyödynnetään fluoresenssireagensseja, joiden avulla solu tai sen osat tuottavat fluoresenssisignaaleja, kun ne viritetään laservalolla. Fluoresoivien reagenssien avulla voidaan värjätä muun muassa amiineja, joiden avulla päätellään, onko solukalvo ehjä, eli onko solu elossa. Myös laservalon kulmaa muuttamalla saadaan erilaista tietoa soluista: kohtisuoralla laserilla voidaan analysoida solujen kokoa, ja suorakulmalla saadaan selville solun sisäisiä ominaisuuksia. Soluista tulevat valosignaalit muokataan elektronisiksi signaaleiksi, jotka analysoidaan tietokoneella. (McKinnon 2018.)



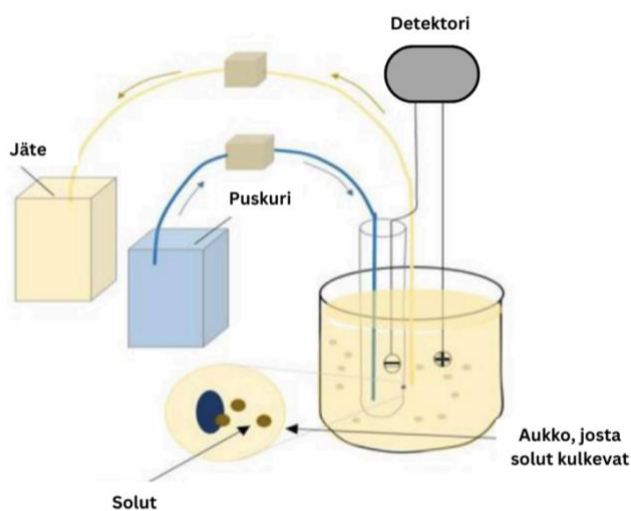
Kuva 6. Virtaussytometrian perusperiaate

Virtaussytometria on perinteisesti offline-mittausmenetelmä, mutta on kehitetty myös on- sekä atline-ratkaisuja. Esimerkki online-ratkaisusta on virtainjektiovirtasytometri, jossa mittaus voidaan automatisoida (Zhao ja muut 1999). Virtaussytometriä käytetään yleisesti silloin, kun halutaan selvittää solutiheyden lisäksi solu yksilöiden eroavaisuuksia populaation sisällä (Broger ja muut 2011).

Heinsin ja muiden (2022) mukaan moderneja reaaliaikaisia automatisoituja virtaussytometrialaitteistoja on harvoin käytetty bioprosesseissa, mutta niillä on tulevaisuuden potentiaalia. Virtaussytometria on aikaa vievä sekä kustannustehoton, kun laskettavien solujen määrä on suuri (Chen 2012).

Coulter-laskuri on alkuperäinen virtaussytometri, ja sitä hyödynnetään solutiheyden mittaamiseen (Bakke 2001). Laskurissa laimennettu solukasvatus ohjataan kapean putken läpi niin, että soluvirta koostuu yksittäisistä soluista (von Weymarn ja muut 2002) (**kuva**

7). Putken molemmilla puolilla on erimerkkiset elektrodit, joiden sähkökenttää solut muuttavat. Solut ovat eristeitä, ja niiden kulkiessa putkessa elektrodien ohitse ne muuttavat sähköisen reitin vastusta, jolloin muodostuu sähköinen pulssi. Pulssien määrä kertoo solujen kappalemäärästä, ja pulssien amplitudi kertoo solujen koosta. (Rhyner ja muut 2024). Coulter-laskurimenetelmässä ei voida erottaa eläviä soluja kuolleista, sekä pienien solujen erottaminen on haastavaa (von Weymarn ja muut 2002). Beckman Coulter myy esimerkiksi Multisizer 4e laitetta, joka pystyy yrityksen mukaan tunnistamaan ja laskemaan erilaisia solutyyppejä sekä muita biologisia partikkeleita (Beckman Coulter 2024).

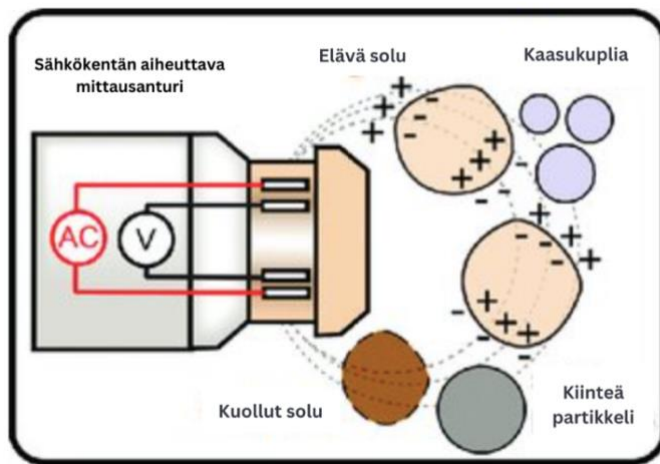


Kuva 7. Coulter-laskurin peruseriaate. Kuva muokattu lähteestä (Vembadi ja muut 2019).

3.3 Kapasitanssimittaustekniikat

Solutiheyden mittaamiseen voidaan hyödyntää kapasitanssimittaustekniikka, jota kutsutaan myös nimellä dielektrinen spektroskopia, radiotaajuusimpedanssi sekä permittivyyys (Bergin ja muut 2022). Mittausmenetelmässä solukasvatuksen vesiliukoisia ioneja liikutetaan sähkökentän avulla. Ionit liikkuvat myös solujen sisällä sähkökentän ansiosta, jolloin positiivisesti varautuneet ionit liikkuvat toiselle puolelle solua ja negatiiviset ionit liikkuvat toiselle puolelle. Ionien liikkeen solun sisällä pysäyttää solukalvo, jonka ansiosta solu polarisoituu: toinen puoli solusta on positiivisesti varautunut ja toinen puoli negatiivisesti varautunut (**kuva 8**). Polarisoituneet solut aiheuttavat muutoksia sähkökenttään, jotka voidaan havaita ja ilmoittaa kapasitanssi suureen avulla. Kapasitanssin yksikkö on faradi (F), mutta usein tulokset ilmoitetaan

pikofaradeissa (pF). Liuoksen kuolleilla soluilla tai muilla kiinteillä partikkeleilla ei ole ehjää solukalvoa, joten ne eivät polarisoidu ja vaikuta soluliuoksen kapasitanssiin merkittävästi. Kapasitanssia seuraamalla voidaan arvioida liuoksen solujen määrä, koska kun solujen määrä kasvaa polarisoituneiden partikkelien määrä kasvaa, jolloin liuoksen kapasitanssi kasvaa. (Carvell ja Dowd 2006.)



Kuva 8. Kapasitanssimittausanturin peruseriaate. Kuva muokattu lähteestä (Zitzmann ja muut 2017).

Kapasitanssimittaustekniikkaa on käytetty kaupallisten monoklonaalisten vasta-aineiden tuotannossa sekä tekniikan avulla on optimoitu virusvektorien tuotantoa (Carvell ja Dowd 2006; Negrete ja muut 2007). Zhang ja muiden (2015) mukaan kapasitanssimittaustekniikka on yksi luotettavimmista tekniikoista elävien solujen seurantaan, koska muiden menetelmien kanssa saattaa olla haasteita tunnistaa elävät solut kuolleista. Lisäksi tutkimusryhmän (A. Zhang ja muut 2015) mukaan kapasitanssimittausmenetelmällä solukasvatusta voidaan mitata reaaliajassa, joka mahdollistaa nopean, helpon sekä tehokkaan prosessin seurannan ja hallinnan. Mooren ja muiden (2019) mukaan kapasitanssin seuraaminen sopii korkean tiheyden omaavien prosessien seurantaan, koska kapasitanssin tulokset voidaan suoraan yhdistää monimutkaiseen ravinteiden syöttöön sekä organismin metaboliittien käyttöön. Tutkimusryhmä (Moore ja muut 2019) osoitti, että kapasitanssimittaustekniikka on myös skaalautuva mittausmenetelmä, joka antaa johdonmukaisia tuloksia niin testaus- kuin teollisuusmittakaavassa. Kuitenkin Bergin ja muiden (2022) mukaan tällä hetkellä yksi kapasitanssimittaustekniikan rajoitteista on pieneen mittakaavaan, 250 millilitran ja pienempien bioreaktoreihin, sopivien mittausanturien puuttuminen.

Bergin ja muiden (2022) mukaan on kaksi suurta kapasitanssimittausantureiden valmistajaa, Aber Instruments ja Hamilton, jotka molemmat valmistavat kerta- sekä monikäyttöisiä mittausantureita. Valmistajien anturit eroavat toisistaan niiden muodon ja elektrodien geometrian mukaan (Bergin ja muut 2022) (**kuva 9**).



Kuva 9. Kaupallisia esimerkkejä kapasitanssimittausantureista. a) Aber Instrumentsin FUTURA™ neof™ kertakäyttöinen anturi b) Hamiltonin Incyte-P SU kertakäyttöinen anturi c) Hamiltonin Incyte-P SU bioreaktoriin hitsattava kertakäyttöinen anturi. Kuva muokattu lähteestä (Bergin ja muut 2022).

3.4 Ultraäänimittaustekniikat

Ultraääntä eli ääntä, jonka taajuus on korkeampi kuin ihmisen kuuloalueen, voidaan hyödyntää solutiheyden määrittämisessä. Menetelmä perustuu ääniaaltojen takaisinheijastumiseen soluista. Akbari ja muut (2022) kehittivät solutiheyttä ja solujen elinkykyä mittaavan kajoamattoman reaaliaikaisen anturin, joka perustuu ultraäänipulssidoppleriin. Tutkimusryhmän anturi lähettää korkeataajuisia, 15 MHz, ultraäänipulsseja bioreaktorin lävitse, jotka takaisinheijastuvat soluista. Takaisinheijastuvat ääniaallon detektoidaan ja analysoidaan käyttäen monimuuttuja-analyysia. (Akbari ja muut 2022.)

Akbari ja muut (2022) käyttivät anturia CHO-solujen mittaamiseen, mutta ultraäänimittaustekniikkaa on käytetty myös punasolujen sekä hiivasolujen tiheyden

mittaamisessa (Chen 2012; Elvira ja muut 2016). Ultraäänisolutiheysmittaustekniikat mahdollistavat reaaliaikaisen tiedon saannin solukasvatuksesta, mutta menetelmät vaativat monimuuttuja-analyysia, joka saattaa vaikeuttaa niiden käyttöönottoa.

4 Yhteenveto

Soluliheyden seuranta on bioprosessin optimoinnin kannalta tärkeää, ja siksi useita erilaisia mittausten menetelmiä on kehitetty. Mittausmenetelmät eroavat toisistaan niiden hyötyjen, haittojen, vaatimusten sekä käyttötarkoitusten perusteella. Osa tekniikoista pystyy mittaamaan soluliheyttä esimerkiksi kajoamattomasti, kun taas toiset tekniikat eivät. Tutkielman edellisissä kappaleissa käsiteltiin osa soluliheyden erilaisista olemassa olevista mittaustekniikoista. Taulukossa 1 vertaillaan tutkielmassa esiteltyjä markkinoilla olevia soluliheysmittausjärjestelmiä.

Taulukko 1. Soluliheyden eri kaupallisia tuotteita ja niiden ominaisuuksia.

Tuote	Mittaustekniikka	Mittaustapa	Reaaliaikainen	Kokosoluliheyden mittaaminen	Elävien solujen tunnistaminen
Hamiltonin Dencytee Arc	Turbidimetria	Inline	Kyllä	Kyllä	Ei
ChromoLogic LLC:n OCTiCell	Valokerroskuvaus	Inline	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Merckin ProCellics™ Raman Analyzer	Raman-spektroskopia	Inline	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Beckman Coulterin Multisizer 4e	Virtausytometriä	Offline	Ei	Kyllä	Kyllä
Hamiltonin Incyte-P SU	Kapasitanssimittaus	Inline	Kyllä	Ei	Kyllä

Vaikka monista menetelmistä on jo kaupallisia sovelluksia, niitä kehitetään jatkuvasti lisää. Tällä hetkellä yksi tärkeimmistä soluliheysmittausanturin kriteereistä ja useiden menetelmien kehityskohteista on reaaliaikaisuus, sillä reaaliaikaisella tiedonkeruulla voidaan hallita bioprosessia ajankohtaisesti. Soluliheyden lisäksi antureita kehitetään mittaamaan muitakin solukasvatuksen ominaisuuksia kuten solujen elinvoimaisuutta ja rakenteita. Tulevaisuudessa markkinoilla on luultavasti erilaisiin mittausten menetelmiin perustuvia antureita, koska jokaisessa menetelmässä on sen omat hyödyt, mutta anturit ovat luultavasti kaikki reaaliaikaisia, sekä ne pystyvät mittaamaan soluliheyden lisäksi muita ominaisuuksia.

- Abu-Absi, N. R., Kenty, B. M., Cuellar, M. E., Borys, M. C., Sakhamuri, S., Strachan, D. J., Hausladen, M. C. & Li, Z. J. (2011) Real time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe. *Biotechnol Bioeng* **108**:1215–1221.
- Akbari, S., Anderson, P., Zang, H., Ganjian, A., Balke, R., Kwon, T. & Pollard, D. (2022) Non-invasive real-time monitoring of cell concentration and viability using Doppler ultrasound. *SLAS Technol* **27**:368–375.
- Bakke, A. C. (2001) The principles of flow cytometry. *Lab Med* **32**:207–211.
- Beckman Coulter (2024) Multisizer 4e Coulter counter. <<https://www.beckman.com/cell-counters-and-analyzers/multisizer-4e>>. (Luettu 30.1.2024).
- Bergin, A., Carvell, J. & Butler, M. (2022) Applications of bio-capacitance to cell culture manufacturing. *Biotechnol Adv* **61**:108048.
- Boppart, S. A. (2005) Tomography | optical coherence tomography. Kirjassa: Guenther, R. D. (toim.), *Encyclopedia of Modern Optics*, s. 193–205. Elsevier.
- Brehove, M., Rogers, C., Menon, R., Minor, P., Allington, J., Lam, A., Vielmetter, J. & Menon, N. (2023) Cell monitoring with optical coherence tomography. *Cytotherapy* **25**:120–124.
- Broger, T., Odermatt, R. P., Huber, P. & Sonnleitner, B. (2011) Real-time on-line flow cytometry for bioprocess monitoring. *J Biotechnol* **154**:240–247.
- Buckley, K. & Ryder, A. G. (2017) Applications of Raman spectroscopy in biopharmaceutical manufacturing: a short review. *Appl Spectrosc* **71**:1085–1116.
- Callis, J. B., Illman, D. L. & Kowalski, B. R. (1987) Process analytical chemistry. *Anal Chem* **59**:624A–637A.
- Calmes, B., Strittmatter, M., Jacquemin, B., Perrineau, M.-M., Rousseau, C., Badis, Y., Cock, J. M., Destombe, C., Valero, M. & Gachon, C. M. M. (2020) Parallelisable non-invasive biomass, fitness and growth measurement of macroalgae and other protists with nephelometry. *Algal Res* **46**:101762.
- Carvell, J. P. & Dowd, J. E. (2006) On-line measurements and control of viable cell density in cell culture manufacturing processes using radio-frequency impedance. *Cytotechnology* **50**:35–48.
- Chen, S.-H. (2012) Estimation of cell concentration using high-frequency ultrasonic backscattering. *J Med Biol Eng* **32**:157.
- Elvira, L., Vera, P., Cañadas, F. J., Shukla, S. K. & Montero, F. (2016) Concentration measurement of yeast suspensions using high frequency ultrasound backscattering. *Ultrasonics* **64**:151–161.
- Food and Drug Administration (2004) Guidance for industry, PAT-A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/pat-framework-innovative-pharmaceutical-development-manufacturing-and-quality-assurance>>. (Luettu 17.11.2023).
- Hamilton (2024a) Bioprocess monitoring and control (off-line, at-line, on-line, in-line / in-situ). <<https://www.hamiltoncompany.com/process-analytics/process-analytical-technology/bioprocess-monitoring-and-control#overview>>. (Luettu 30.1.2024).
- Hamilton (2024b) Dencytee arc. <<https://www.hamiltoncompany.com/process-analytics/sensors/cell-density-sensors/total-cell-density/dencytee-arc>>. (Luettu 30.1.2024).
- Heins, A., Hoang, M. D. & Weuster-Botz, D. (2022) Advances in automated real-time

flow cytometry for monitoring of bioreactor processes. *Eng Life Sci* **22**:260–278.

Höpfner, T., Bluma, A., Rudolph, G., Lindner, P. & Scheper, T. (2010) A review of non-invasive optical-based image analysis systems for continuous bioprocess monitoring. *Bioprocess Biosyst Eng* **33**:247–256.

Kleman, G. L. & Strohl, W. R. (1992) High cell density and high-productivity microbial fermentation. *Curr Opin Biotechnol* **3**:93–98.

Lee, H. L. T., Boccazzi, P., Gorret, N., Ram, R. J. & Sinskey, A. J. (2004) In situ bioprocess monitoring of *Escherichia coli* bioreactions using Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc* **35**:131–137.

Lewis, I. R. & Edwards, H. G. M. (2001) Handbook of Raman spectroscopy: From the research laboratory to the process line, s. 1-5. Marcel Dekker, New York

Marose, S. (1999) Optical sensor systems for bioprocess monitoring. *Trends Biotechnol* **17**:30–34.

McKinnon, K. M. (2018) Flow cytometry: an overview. *Curr Protoc Immunol* **120**.

Mehdizadeh, H., Lauri, D., Karry, K. M., Moshgbar, M., Procopio-Melino, R. & Drapeau, D. (2015) Generic Raman-based calibration models enabling real-time monitoring of cell culture bioreactors. *Biotechnol Prog* **31**:1004–1013.

Merck (2024) BioContinuum™ platform for next generation bioprocessing. <https://www.merckmillipore.com/FI/en/20210416_153721?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F>. (Luettu 30.1.2024).

Minnich, C., Hardy, S. & Krämer, S. (2016) Stopping the babylonian confusion: an updated nomenclature for process analyzers in PAT applications. *Chem Ing Tech* **88**:694–697.

Moore, B., Sanford, R. & Zhang, A. (2019) Case study: The characterization and implementation of dielectric spectroscopy (biocapacitance) for process control in a commercial GMP CHO manufacturing process. *Biotechnol Prog* **35**:e2782.

Negrete, A., Esteban, G. & Kotin, R. M. (2007) Process optimization of large-scale production of recombinant adeno-associated vectors using dielectric spectroscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**:761–772.

O'Mara, P., Farrell, A., Bones, J. & Twomey, K. (2018) Staying alive! Sensors used for monitoring cell health in bioreactors. *Talanta* **176**:130–139.

Paasikallio, T. (2010) Bioreaktorikasvatusten monitorointi ja näytteenottolaitteen kehitys. Metropolia Ammattikorkeakoulu. Insinööriyö.

Pearson, A. P., Glennon, B. & Kieran, P. M. (2004) Monitoring of cell growth using the focused beam reflectance method. *J Chem Technol Biotechnol* **79**:1142–1147.

Pearson, A. P., Glennon, B. & Kieran, P. M. (2008) Comparison of morphological characteristics of *Streptomyces natalensis* by image analysis and focused beam reflectance measurement. *Biotechnol Prog* **19**:1342–1347.

Rhyner, M., Prestigiacomo, G., Kumar, K. & Lee, L. (2024) Cellular analysis using the Coulter principle. Beckman Coulter. <<https://www.beckman.com/resources/reading-material/application-notes/cellular-analysis-using-the-coulter-principle>>. (Luettu 30.1.2024).

Schmitt, J. M. (1999) Optical coherence tomography (OCT): A review. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* **5**:1205–1215.

Tadayyon, A. & Rohani, S. (1998) Determination of particle size distribution by Par-Tec® 100: Modeling and Experimental Results. *Part Part Syst Charact* **15**:127–135.

Thoré, E. S. J., Schoeters, F., Spit, J. & Van Miert, S. (2021) Real-time monitoring of microalgal biomass in pilot-scale photobioreactors using nephelometry. *Processes* **9**:1530.

Vembadi, A., Menachery, A. & Qasaimeh, M. A. (2019) Cell cytometry: review and

perspective on biotechnological advances. *Front Bioeng Biotechnol* **7**:147.

von Weymarn, N., Eerikäinen, T., Suominen, I., Ojamo, H., Leisola, M. & Aittomäki, E. (2002) Bioprosessitekniikka. WSOY, Helsinki.

Zhang, A., Tsang, V. L., Moore, B., Shen, V., Huang, Y., Kshirsagar, R. & Ryll, T. (2015) Advanced process monitoring and feedback control to enhance cell culture process production and robustness. *Biotechnol Bioeng* **112**:2495–2504.

Zhang, Y.-H. P., Sun, J. & Ma, Y. (2017) Biomanufacturing: history and perspective. *J Ind Microbiol Biotechnol* **44**:773–784.

Zhao, R., Natarajan, A. & Srienc, F. (1999) A flow injection flow cytometry system for on-line monitoring of bioreactors. *Biotechnol Bioeng* **62**:609–617.

Zitzmann, J., Sprick, G., Weidner, T., Schreiber, C. & Czermak, P. (2017) Process optimization for recombinant protein expression in insect cells. Kirjassa: Gowder, S. J. T. (toim.), *New Insights into Cell Culture Technology*. InTech.