

Kulturen beim Wachsen zusehen

David Frank, Konrad Herzog

Informationen über den Verlauf einer mikrobiellen Fermentation liefert die Zelldichte als analytischer Parameter. Die Messung ist nun auch bei Schüttelkolben automatisiert und nichtinvasiv möglich.

● Schüttelkolben sind der meistgenutzte Bioreaktor für Fermentationen, um Biomoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren im Labormaßstab zu produzieren oder Fermentationsprozesse zu entwickeln oder zu optimieren. Voraussetzung für eine erfolgreiche Entwicklungsarbeit ist die präzise Überwachung jedes Experiments. Als analytische Messgröße eignet sich die Zelldichte, die den Verlauf des Bioprozesses direkt wiedergibt.

Zelldichtemessung in geschüttelten Systemen

● Schüttelkolben als Bioreaktorsystem sind nutzerfreundlich und gut zu parallelisieren, allerdings sind sie bisher nur schwer zugänglich für prozessanalytische Techniken. Ursache dafür ist einerseits ihre geschlossene Geometrie und andererseits der Schüttelvorgang an sich, denn die Analyse einer permanent rotierenden Flüssigkeit erfordert besondere Messtechniken. Infolgedessen sind bisher Proben manuell zu entnehmen und offline zu analysieren, um die Zelldichte zu bestimmen. Dies ist ein zeitintensiver, fehleranfälliger Vorgang, der zudem den Prozess beeinflusst.

Das Gerät cell growth quantifier (cgq) misst automatisiert und nichtinvasiv die Zelldichte in Schüttelkolben in Echtzeit. Das System besteht aus drei Komponenten (Abbildung 1A). Direkt am Kolben befindet sich die Mess-

plattform, die über eine Basisstation Messdaten an einen Computer mit Analysesoftware sendet. Die Messplattform erweitert den üblichen Aufbau auf dem Schütteltablett um ein Sensorboard, das unter dem Kolben in die Halteklammer eingespannt wird. Zur Abschirmung der Messung von äußeren Störquellen verschließt ein lichtundurchlässiger Mantel den Aufbau. So lässt sich der cgq in jede vorhandene Laborinfrastruktur integrieren.

Die Zelldichte im Schüttelkolben misst das System über das Sensorboard mit einem nichtinvasiven optischen Verfahren (Abbildung 1C). Eine LED strahlt Licht in die Kulturbrühe ein, das dort abhängig von der Konzentration der Zellen gestreut wird. Einen Teil des gestreuten Lichts wandelt eine Photodiode mit hoher Auflösung in elektrischen Strom um. Dieses Signal digitalisiert das Sensorboard und verarbeitet es weiter, um es abschließend als Streuintensität zum Messcomputer zu übertragen.

Jede cgq-Basisstation überwacht bis zu 64 Kolben parallel.

Kulturmedien evaluieren und richtig einstellen

● Ein typisches Einsatzgebiet von Schüttelkolbenfermentationen ist die Evaluierung und Optimierung von Kulturmedien. *E. coli* wachsen im Labor häufig in LB-Medium aus Hefeextrakt, Peptidmischung und

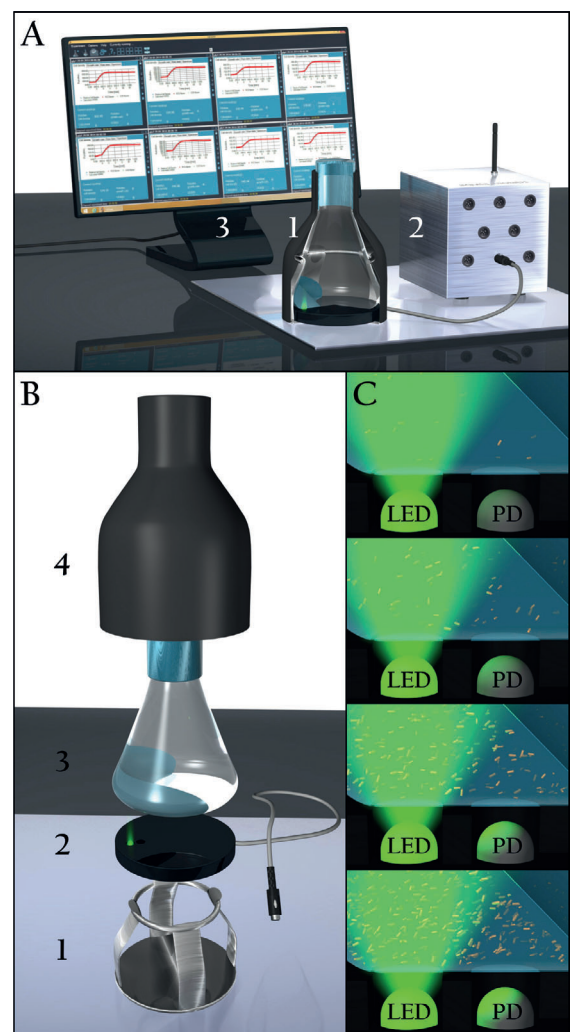


Abb. 1. Aufbau und Messprinzip des Zelldichte-Messsystems cgq: A: 1 – Messplattform, 2 – Basisstation, 3 – Software. B: Explosionszeichnung der Messplattform mit 1 – Kolbenklammer, 2 – Sensorboard, 3 – Kulturkolben, 4 – Mantel. C: Messprinzip, mit steigender Zelldichte (von oben nach unten) steigt bei konstantem, durch die LED eingestrahلتem Licht der Anteil des durch die Zellen auf die Photodiode (PD) zurückgestreuten Lichtes.

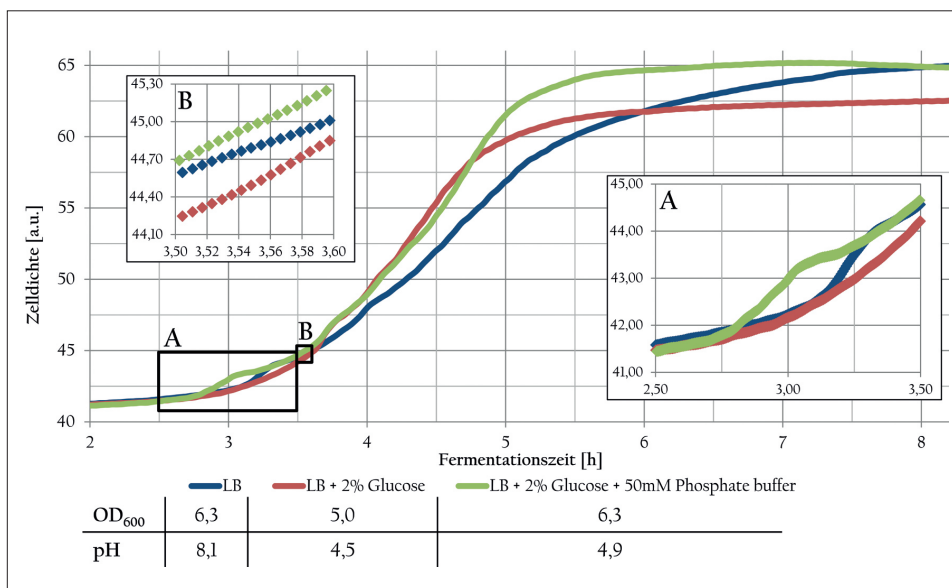


Abb. 2. Optimierung eines Kulturmediums: *E.-coli*-BL21-(DE3)-Kultur auf LB-basierten Medien (25 mL Medium in 250 mL Kolben, geschüttelt bei 200 rpm, 37 °C und überwacht mit einer Messperiode von ca. 20 Sekunden).

Ausschnitt A: Wachstumsverlangsamung bei zwei der Kulturen, Ausschnitt B: Abstände der Messungen: 20 Sekunden. a.u. = arbitrary units.

Kochsalz, das als Komplexmedium kostengünstiger ist als die meisten Minimalmedien. Allerdings wachsen die Mikroben in diesem Medium nicht optimal, da der kultivierte Organismus seinen Metabolismus im Laufe der Fermentation an verschiedene Kohlenstoffquellen anpassen muss, was das Wachstum verzögert.

Abbildung 2 zeigt drei Schritte einer exemplarischen Optimierung eines Kulturmediums für *E. coli*. Dargestellt sind für jeden Schritt die Ergebnisse der kontinuierlichen Zelldichtemessung mit dem cgq sowie die Schlusswerte für pH und Offline-Zelldichte (als OD₆₀₀, also Absorbanz bei 600 nm) nach einer Fermentationsdauer von 8,3 Stunden. Anfangspunkt der Optimierung ist die Kultivierung in LB-Medium (blau).

Im ersten Optimierungsschritt wurde dieses Medium mit Glucose angereichert als zusätzliche und durch den Mikroorganismus bevorzugt metabolisierte Kohlenstoffquelle. Das Resultat (rot) ist ein anfangs deutlich schnelleres Wachstum, das jedoch vorzeitig endet, so dass nach acht Stunden nur etwa 80% der Zellmasse entstanden sind. Ursache dafür ist die Ansäue-

rung des Kulturmediums im Prozessverlauf durch Essigsäure, die *E. coli* bei Wachstum auf Glucose und zu wenig Sauerstoff im Medium bildet.

In einem weiteren Optimierungsschritt wurde dem glucosehaltigen LB-Medium zur pH-Stabilisierung Phosphatpuffer zugegeben. Dies resultiert (grün) in ebenfalls beschleunigtem Wachstum gegenüber dem ursprünglichen LB-Medium, wobei durch die pH-Pufferung das Medium später und schwächer ansäuert als ohne Phosphatpuffer.

Obwohl die Optimierung zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist, erhöhen beide Schritte – die Zugabe der Glucose und des Puffers – die Effizienz des Prozesses, und die Fermentation ist zwei Stunden früher beendet.

Überwachung vom Start bis zum Ende

● Die Zelldichtemessung liefert selbst bei Messabständen von 20 Sekunden noch hochaufgelöste Zelldichtewerte mit minimalem Rauschen (Abbildung 2B). Damit lässt sich eine Fermentation in Echtzeit überwachen. Mit einem

OD₆₀₀-äquivalenten Messbereich von <0,2 bis >>60 lässt sich zudem das Wachstum einer Schüttelkolbenkultur erstmals vom Anwachsen bis zum Absterben vollständig automatisch beobachten.

Basierend auf der hohen zeitlichen und zell-dichtebezogenen Auflösung des cgq sind metabolische Veränderungen des kultivierten Organismus bereits zu Beginn der Fermentation bei geringen Zelldichten zu erkennen. Der Diagrammausschnitt A in Abbildung 2 zeigt bei zwei der Kulturen (blau und grün) eine kurzzeitige Wachstumsverlangsamung, die auf eine Stoffwechselumstellung hindeutet. Dies ist typisch für das Wachstum auf Komplexmedien.

Der Nutzer kann anhand der Daten rechtzeitig in die Kultivierung eingreifen, fehlerhafte Prozesse frühzeitig abbrechen und das Wissen über seinen Bioprozess verbessern.

Ausblick

● Durch die Datendichte und Datenqualität der automatisierten Zelldichtemessungen können Nutzer komplexe Wachstumsmodelle über die Zelldichte als einzige Messgröße evaluieren, um prozessbegleitend beispielsweise Substrat- und Sauerstofflimitationen, toxische Effekte und Inhibitionen sowie Stoffwechselumstellungen quantitativ zu beobachten. Die Daten bilden eine Voraussetzung, um Prozesse in Schüttelkolben automatisch zu führen. Dies ist der erste Schritt, um einen Bioprozesses auf Rührkesselreaktoren zu skalieren, und damit vom Labor- zum Produktionsprozess.

David Frank, Jahrgang 1987, und Konrad Herzog, Jahrgang 1988, studierten an der RWTH Aachen Molekulare und Angewandte Biotechnologie. Gemeinsam mit Jens Bayer und Daniel Grünes gründeten sie im Jahr 2014 die aquila biolabs, die das cgq-System entwickelt und vertreibt.
info@aquila-biolabs.de