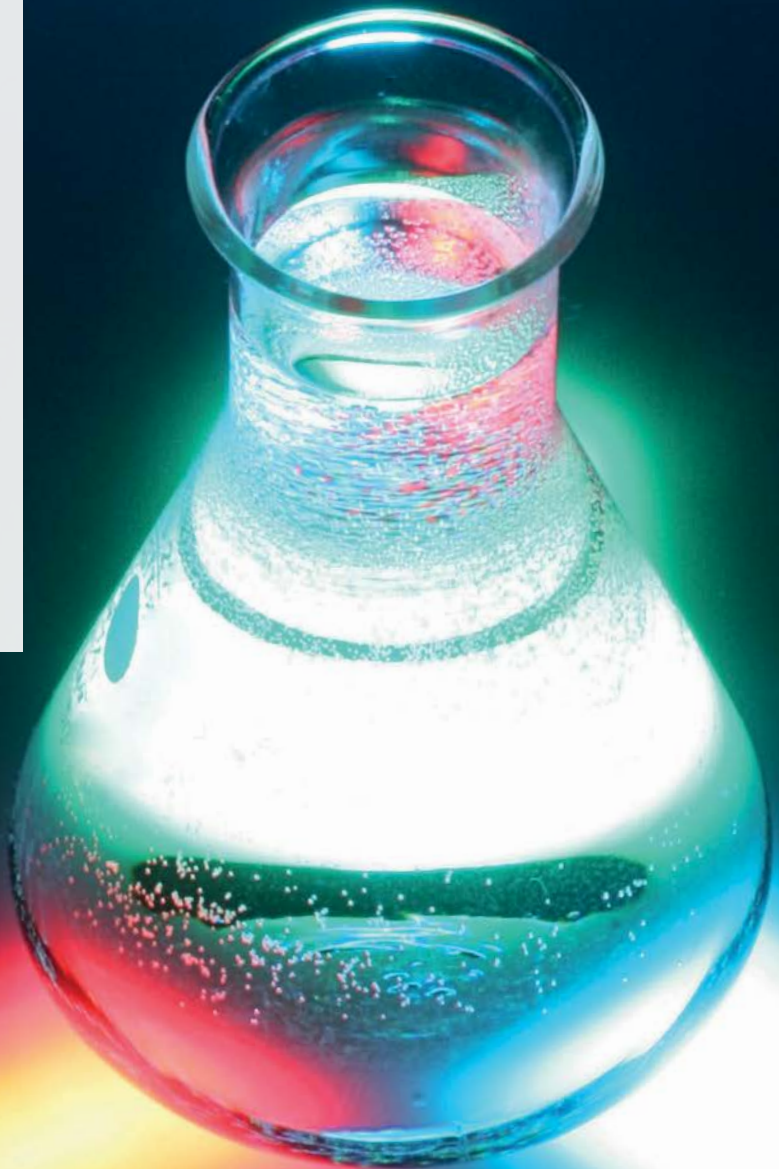


# Biomasse in Schüttelkolbenkultur

Prototyp zur inline Bestimmung von pH,  $pO_2$  und Biomasse

J. Schmidt-Hager, C. Ude, T. Scheper, S. Beutel, M. Findeis und G. T. John

In diesem Artikel wird ein neues System zur Biomasse-Messung in Schüttelkolben, basierend auf Streulichtdetektion, vorgestellt. Die optosensorischen Komponenten für Biomasse-Überwachung wurden dabei mit bereits etablierter SFR Shake Flask Reader Technologie kombiniert, mit der optische Sauerstoff- und pH-Sensoren im Inneren der Schüttelkolben ausgelesen werden können. Dieses neue analytische System kann also eingesetzt werden um Biomasse,  $pO_2$  und pH gleichzeitig und in Echtzeit zu überwachen, wobei kontaktfrei durch den Boden des Schüttelkolbens gemessen wird. Eine erste Anwendung des SFR vario genannten Prototypen mit *Escherichia coli* K12 und *Kluyveromyces marxianus* Kulturen erbrachte reproduzierbare Biomasse-Daten, mit einem relativen Fehler, der dem von offline Messungen der optischen Dichte entspricht.



Schüttelkolben werden häufig in den ersten Schritten der Bioprozessentwicklung eingesetzt, da sich Ergebnisse mit geringem Aufwand erzielen, und viele Versuche parallel durchführen lassen. Jedoch ist es durch die kleinen Abmessungen der Schüttelkolben schwierig wichtige Kulturparameter zu überwachen und zu kontrollieren. Zum Beispiel ist das Monitoring des Zellwachstums bisher nur durch Probennahme und offline Analysen möglich, mit dem Nachteil, dass sich sowohl der Arbeitsaufwand als auch die Gefahr einer Kontaminierung erhöhen. Darüber hinaus liefern derartige offline Analysen nur Daten zu bestimmten Zeitpunkten der Kultur, wobei vielleicht gerade vollständige Wachstumsinformation entscheidend für ein besseres Prozess-Verständnis sein könnte. Die Biomasse-Messung im Gerät basiert auf der Detektion von Licht, das von Partikeln im Kulturmedium gestreut wird. Durch nicht lineare Kalibriermodelle kann eine Korrelation dieser Messwerte mit optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) ermittelt werden. Eine erste Evaluierung des neuen Gerätes wurde mit verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt.

## Material & Methoden

Das Sensormodul zur Biomasse-Messung besteht aus einer LED und einer Photodiode zur Bestimmung von Streulicht mit einem Streuwinkel von etwa 360°. Der von der LED ausgesandte Lichtstrahl dringt von unten durch die Wand des Schüttelkolbens und wird von Partikel (Zellen) im Medium gestreut; dieses Streulicht wird mit der Photodiode detektiert. Da die Flüssigkeit im Kolben während des Schüttelvorgangs eine Sichelform annimmt, wurde ein piezoelektrischer Beschleunigungssensor in das Gerät

integriert um den Messzyklus zu optimieren und den Zeitpunkt der Biomasse-Messung genau anpassen zu können. Die Leistung des neuen analytischen Systems wurde durch die Überwachung des Wachstums zweier Mikroorganismen – *E. coli* K12 und *K. marxianus* – demonstriert. *E. coli* wurde dabei in Minimalmedium mit Glucose und Lactose bei 37°C kultiviert, um eine Diauxie zu verfolgen, und *K. marxianus* in YM-Medium mit Glukose-Monohydrat bei 30°C. Für alle Kulturen wurden 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen und integrierten O<sub>2</sub> und pH Sensoren verwendet, mit einem Arbeitsvolumen von 100 ml und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm. Jede Kultur wurde vierfach unter denselben Bedingungen durchgeführt, wobei drei der Kulturen benutzt wurden um ein Kalibriermodell von Streulichtintensität als eine Funktion der OD<sub>600</sub> zu erstellen. Dazu entnahmen wir alle 60 min Proben um unter sterilen Bedingungen die OD<sub>600</sub> zu bestimmen. Die verbleibende Kultur wurde zur Validierung verwendet. Biomasse, pH und pO<sub>2</sub> wurden mit einem Messintervall von 15 s aufgezeichnet.

## Echtzeit Biomasse Überwachung

Bevor der Prototyp zur Echtzeitüberwachung der Biomasse eingesetzt werden konnte, musste eine gültige Korrelation zwischen Streulichtintensität und Biomassekonzentration abgeleitet werden, und zwar explizit für den überwachten Zelltyp unter den entsprechend vorherrschenden Bedingungen. Dafür wurde die offline, durch Probennahme, bestimmte OD<sub>600</sub> mit den entsprechenden online gemessenen Werten des Prototypen korreliert. Für *E. coli* K12 und *K. marxianus* kann diese Korrelation am Bestem mit einer vereinfachten Bleasdale-Nelder Funktion beschrieben werden:

$$y = (a + b \cdot x)^{-1/c}$$

wobei y für den OD<sub>600</sub> Wert und x für die gemessene Streulichtintensität steht, und a – c die entsprechend für die verwendete Zell-Line bestimmten und median-gefilterten Parameterwerte darstellen. Abbildungen 2 und 3 zeigen die Biomasse-Messungen, die mit

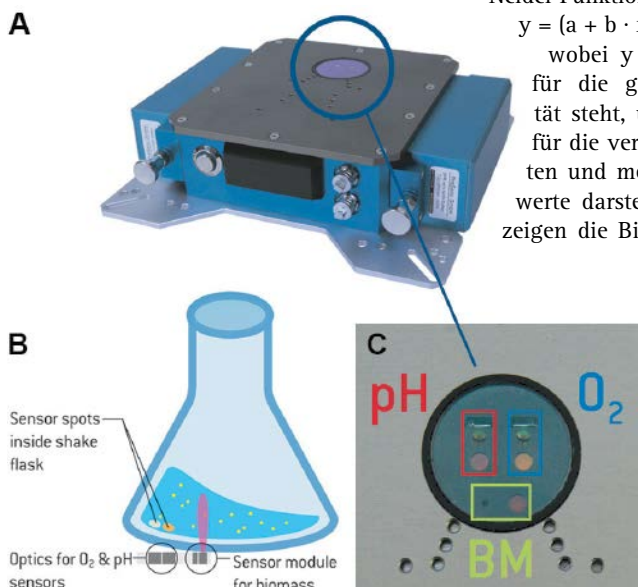


Abb. 1: Prototyp (A); schematische Darstellung des Messprinzips (B); SFR vario Optik für Biomass (BM), O<sub>2</sub> und pH Messung (C).

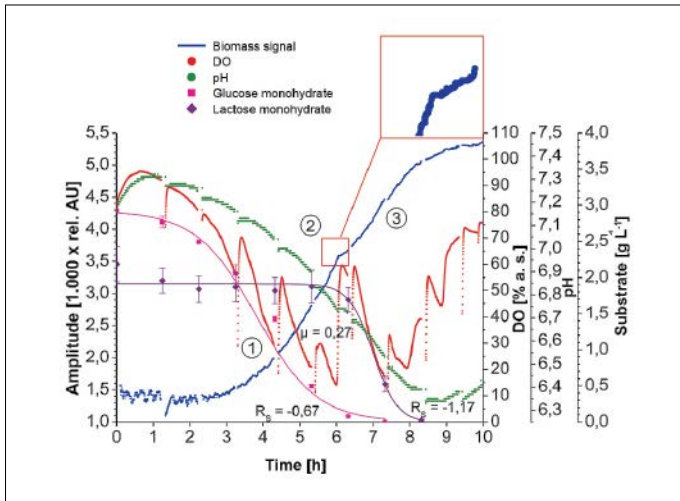


Abb. 2: Diauxie von *E. coli* K12 in Minimalmedium mit Glukose und Laktose: Online Biomasse (Median 45), gelöst Sauerstoff (DO), und pH Messungen aufgezeichnet mit dem Prototyp. Zusätzlich sind offline gemessene Substratkonzentrationen gezeigt. Vergrößerung: Deutliche Wachstumsänderung während des Substratwechsels von Glukose- zu Laktose.

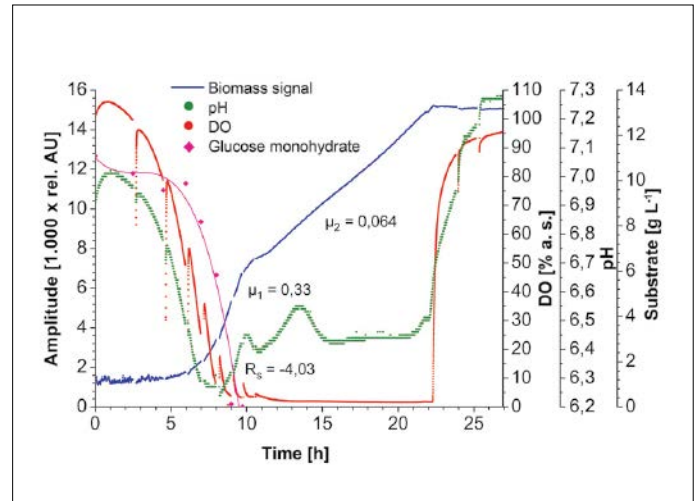


Abb. 3: Wachstumsphasen von *K. marxianus* in YM-Medium in Schüttelkolbenkultur: Online Biomasse (Median 45), gelöst Sauerstoff (DO), und pH Messungen aufgezeichnet mit dem Prototyp. Zusätzlich sind offline gemessene Substratkonzentrationen gezeigt. Die geringere Wachstumsrate während der zweiten Phase ist in den Biomasse-Messungen deutlich sichtbar.

dem Prototyp in Kulturen beider Mikroorganismen durchgeführt wurden. Zusätzlich sind in die Graphen online aufgezeichnete Sauerstoff- und pH-Werte, sowie die offline gemessenen Substratkonzentrationen eingetragen. Da das Messintervall für Biomassemessung auf 15 Sekunden festgelegt war, konnte eine große Menge an Daten aufgezeichnet werden, die einen sehr guten Echtzeit-Überblick über die Entwicklung des Zellwachstums lieferten. Zu Beginn der Kultivierung beider Mikroorganismen wurde etwas Messrauschen festgestellt. Dies ist auf die geringe Zelldichte zu Beginn und Reflexion des Lichtstrahls an der Grenzschicht der Flüssigkeitsoberfläche zurückzuführen. Mit wachsender Zelldichte und damit verbundener Eintrübung des Kulturmediums allerdings stabilisierten sich die Werte und begannen zu steigen. Ein Medianfilter wurde angewendet um den Graphen zu glätten. Unterbrechungen in Sauerstoff- und pH-Messungen wurden durch das Stoppen der Schüttelbewegung für die Probenahmen verursacht, die in dieser Studie notwendig waren um das neue System zu validieren. Die Messwerte in Abbildung 2 zeigen deutlich das zweiphasige Wachstum von *E. coli*. Nachdem Glukose im Medium komplett verbraucht war, fand eine Stoffwechsellumstellung von Glucose- zu Laktose-Verbrauch statt. Während dieser Umstellung gab es kein Wachstum, was sich auch in einem kleinen Plateau in den Biomasse-Messwerten abzeichnete. Darüber hinaus konnte eine genaue Übereinstimmung des stagnierenden Wachstums mit rapide ansteigendem Sauerstoffgehalt, sowie einem Plateau in den pH Messwerten beobachtet werden.

Auch die verschiedenen Wachstumsphasen von *K. marxianus* ließen sich mittels der online Biomasse-Messungen analysieren. In der ersten Phase wurde Glukose unter aeroben Bedingungen verstoffwechselt. Sobald Glukose im Medium fast aufgebraucht war, schaltete der Zellmetabolismus auf den Verbrauch von Produkten des vorangegangenen Glukoseverbrauchs um, der nun unter hohem Sauerstoffbedarf ablief. In dieser Phase zeigte *K. marxianus* eine merklich geringere Wachstumsrate als zuvor, was deutlich in den Biomasse-Messungen zu erkennen war. Durch Sauerstofflimitierung war das Wachstum in dieser Phase linear. Der Prototyp versetzt den Anwender in die Lage, die Biomasse-Entwicklung von eukaryotischen und prokaryotischen Kulturen in Schüttelkolben genau zu verfolgen, und Messergebnisse zu erhalten, die in dieser Form noch nicht aufgezeichnet wurden. Mit den Daten, die der Prototyp lieferte, konnten alle relevanten Informationen über Kulturbedingungen und Wachstum ganz ohne offline Analysen erfasst werden.

### Zusammenfassung

Die Funktionsfähigkeit und das Potential dieses neuen Sensorsystems in der Echtzeitüberwachung konnte an verschiedenen Zelltypen gezeigt werden. Dabei konnte eine hohe Genauigkeit mit einer Fehlerrate von ca. 10% und damit vergleichbar mit der von üblicherweise verwendeten offline Techniken erzielt werden. Fortlaufende Untersuchungen mit weiteren Zelltypen und unterschiedlichen Kulturbedingun-

gen zeigen deutlich, dass online Messungen von Sauerstoff, pH und Biomasse in Schüttelkolben in einem weiten Anwendungsbereich eingesetzt werden können. Individuelle Kalibriermodelle, hergeleitet für unterschiedliche Zelltypen und Kulturbedingungen, liefern präzise Vorhersagen über die Biomassekonzentration in einer Kultur. Durch den Einsatz dieses Sensorsystems zur kontaktfreien Messung durch den Kolbenboden ist es möglich, Informationen in Echtzeit mit nur geringem Arbeitsaufwand zu erhalten.

### KONTAKT |

J. Schmidt-Hager  
C. Ude  
T. Scheper  
S. Beutel  
Institut für Technische Chemie  
Leibniz Universität Hannover  
Deutschland

M. Findeis  
G. T. John  
Presens Precision Sensing  
Regensburg, Deutschland



Weitere Beiträge zum Thema:  
<http://bit.ly/Bioprosesstechnik>