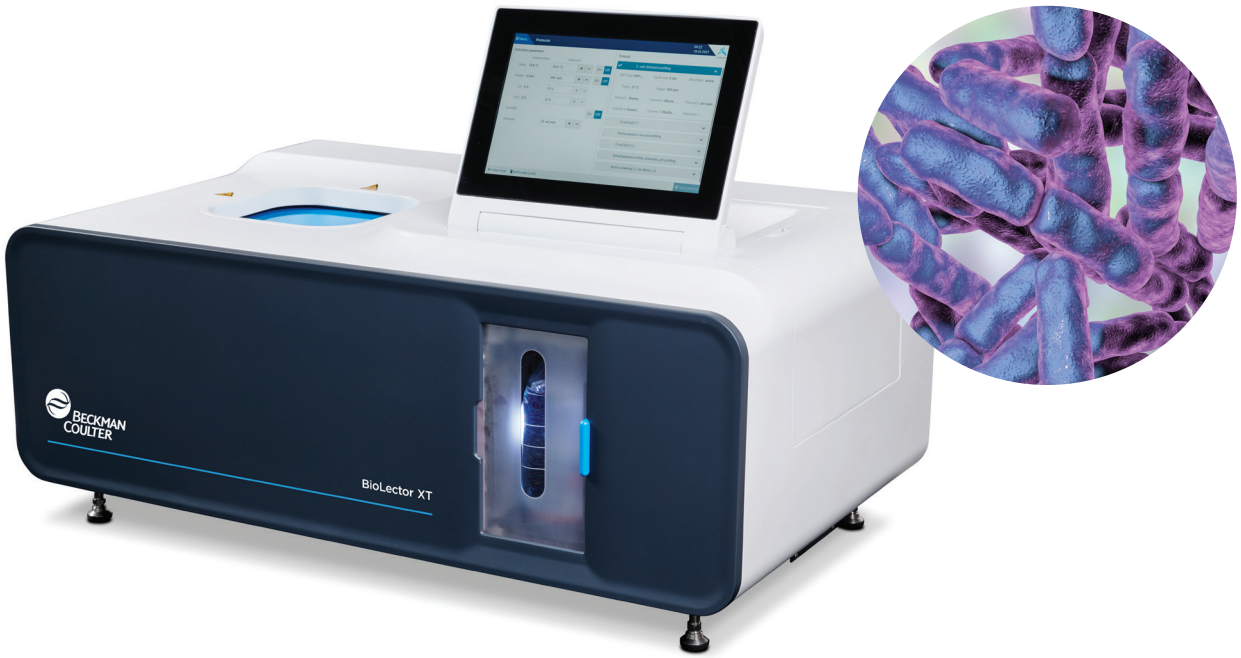
BECKMAN COULTER
Life Sciences

Anaerobe Kultivierung von probiotischen Bakterien im BioLector XT Mikrobioreaktor



Einleitung

Probiotika sind mit lebenden Mikroorganismen versetzte Lebensmittel, denen gesundheitsfördernde und biofunktionale Wirkungen auf den menschlichen Organismus zugeschrieben werden. Sie werden in der Regel genutzt, um die Zahl der erwünschten Bakterien im Darm zu erhöhen und die Darmflora zu regenerieren, beispielsweise nach einer Antibiotikabehandlung. Dies ist einer der Gründe, warum der Wert des Markts für Probiotika bzw. probiotische Nahrungsergänzungsmittel stark zugenommen hat.[1] Das Forschungsfeld, das sich mit dem menschlichen Darm-Mikrobiom und dessen gesundheitsförderndem Nutzen befasst, ist vor allem für die Nahrungsmittelindustrie von Bedeutung. Deshalb ist die wissenschaftliche Forschung zu anaeroben oder mikroaerophilen Kultivierungsverfahren, etwa der Kultivierung von Probiotika unter Mikrobiom-ähnlichen Bedingungen, unverzichtbar. Verschiedenste anaerobe Bakterien, unter anderem *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*, zählen zu den probiotischen Mikroorganismen. Unter diesen sind die *Bifidobacterium* spp. die am häufigsten genutzten und untersuchten Spezies probiotischer Bakterien. Sie sind als strikte Anaerobier zu klassifizieren, da sie nicht zur Sauerstoffatmung und zu Wachstum unter aeroben Kultivierungsbedingungen fähig sind,[2] und bilden einen wesentlichen Bestandteil der dominanten Mikrobiota im menschlichen Darm.[3]

Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der pH-Kontrolle, indem sie Milch- und Essigsäure freisetzen, die das Wachstum vieler potenziell pathogener Bakterien hemmen.[4] Im Verdauungstrakt von gestillten Säuglingen ist *Bifidobacterium* die vorherrschende Zellspezies und stellt mehr als 80 % der Mikroorganismen im Darm.[1, 5] Es gibt mehr als 200 bekannte Arten von *Lactobacillus*, der größten Gattung innerhalb der Milchsäurebakterien, die von der US-Lebensmittelbehörde FDA allgemein als sicher anerkannt sind (Einstufung GRAS). *Lactobacillus* spp. werden aufgrund ihres Gesundheitspotenzials intensiv als Fermentations-Starterkulturen für Milchprodukte oder Probiotika genutzt und untersucht.[6]

In dieser Application Note stellen wir anaerobe Kultivierungen unter Verwendung des BioLector XT Mikrobioreaktors in Kombination mit dem Begasungsdeckel vor. Der BioLector XT Mikrobioreaktor ist ein Benchtop-Gerät für das Hochdurchsatz-Screening von mikrobiellen Kultivierungen und ermöglicht die Online-Messung wichtiger Kultivierungsparameter wie Biomasse, pH-Wert, Sauerstoffsättigung der flüssigen Phase (DO) und Fluoreszenzintensität verschiedener fluoreszierender Moleküle oder Proteine. Damit der hohe Durchsatz erreicht werden kann, werden die Kultivierungen in Mikrotiterplatten im SBS/SLAS-Normformat mit je 48 Wells durchgeführt, sodass die gleichzeitige Kultivierung von bis zu 48 Batches auf einem einzigen BioLector XT Mikrobioreaktor-System möglich ist. Des Weiteren zeigen wir, wie einfach sich mit dem Begasungsdeckel des BioLector XT Mikrobioreaktors (siehe Abb. 1) anaerobe Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen der probiotischen Bakterien *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* und *Bifidobacterium bifidum* durchführen lassen. Der Hauptvorteil des BioLector XT Mikrobioreaktor-Begasungsdeckels besteht darin, dass Zufütterung und pH-Kontrolle nun gleichzeitig stattfinden können, während die Mikrotiterplatte (MTP) direkt mit Stickstoff (100 % N_2) in einstellbaren Flussraten von 5 - 50 mL/min begast wird.

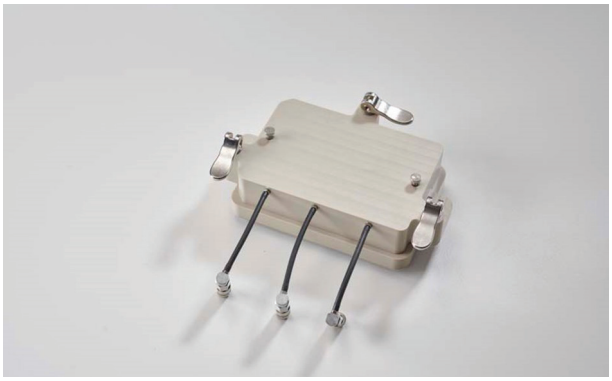


Abbildung 1: BioLector XT Mikrobioreaktor-Begasungsdeckel für Mikrofluidik-MTP

Methoden

Anaerobe Kultivierung von *Lactobacillus*-Stämmen

Alle Kultivierungen von *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus casei* DSM 20011 und *Lactobacillus plantarum* DSM 20174) wurden in MRS-Bouillon (Fa. Carl Roth, Deutschland) bei 37 °C Umgebungstemperatur und unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die MRS-Bouillon wurde mit 0,5 g/L Cystein-HCl angereichert, das als Reduktionsmittel für das Oxidations-Reduktions-Potenzial fungiert, indem es den verbleibenden molekularen O_2 im Medium reduziert. Alle Vorkulturen erfolgten in einem 250-mL-Erlenmeyerkolben. Hierfür wurden 20 mL angesetzte MRS-Bouillon mit 1 mL Kryokultur inokuliert und dann mindestens 24 Stunden unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Die Hauptkultur wurde dann auf OD_{start} = 1 in MRS-Bouillon angeimpft. Die anschließenden Kultivierungen im BioLector XT Mikrobioreaktor erfolgten in einer Gen2-Mikrofluidik Round Well Plate für pH-regulierte Batch- und Fed-Batch-Kulturen. Die Kultivierungen wurden bei 37 °C, 600 min^{-1} und aktivierter Feuchtigkeitsregulierung durchgeführt.

Das Startvolumen der Kultivierungswells wurde auf 2000 µL gesetzt, das Maximalvolumen auf 2400 µL. Die Online-Messung der Biomasse (Gain 3) und von pH (LG1) und Gelöstsauerstoff (RF) wurde vom BioLector XT Mikrobioreaktor ausgeführt. Eine ausführliche Aufstellung der Fed-Batch-Kultivierungsbedingungen für *L. casei* ist Tabelle 1 zu entnehmen.

	Inhalt	Mikrofluidik-Einstellungen
Reservoir A (Substrat)	500 g/L Glukose	• Pumpvolumen: 0,16 µL • Füllvolumen: 1900 µL • Zufütterungsbeginn: • > 7,5 h oder > 10 h • Konstante Zufütterung: 4 µL/h
Reservoir B (pH-Kontrolle)	3 M NaOH	• Pumpvolumen: 0,30 µL • Füllvolumen: 1900 µL • Beginn pH-Kontrolle: > 0,5 h • PI-Einstellungen: MITTEL
Kultivierungswells	*L. casei* in MRS-Bouillon	• Startvolumen: 2000 µL • Max. Volumen: 2400 µL • pH-Kontrolle: pH 6,0

Tabelle 1: Fed-Batch-Kultivierungsbedingungen für *L. casei*

Anaerobe Kultivierung von *B. bifidum* im BioLector XT Mikrobioreaktor

Alle Kultivierungen von *Bifidobacterium bifidum* (Fa. SinoPlaSan AG, Deutschland) erfolgten in MRS-Bouillon (Fa. Carl Roth, Deutschland) bei 37 °C und unter anaeroben Bedingungen. Die MRS-Bouillon wurde mit 0,5 g/L Cystein-HCl angereichert, das als Reduktionsmittel für das Oxidations-Reduktions-Potenzial fungiert, indem es den verbleibenden molekularen O_2 im Medium reduziert. Die Vorkultivierungen erfolgten in einem 250-mL-Erlenmeyerkolben. Hierfür wurden 20 mL MRS-Bouillon mit dem Inhalt eines Vials inokuliert und dann mindestens 24 Stunden bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Die Hauptkultur wurde auf OD_{start} = 1,0 in MRS-Bouillon eingestellt.

Für die Hauptkultur in den BioLector XT Mikrobioreaktoren wurden pH-regulierte Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen bei 37 °C, 600 min^{-1}, aktivierter Feuchtigkeitsregulierung und Online-Messung von Biomasse (Gain 3), pH (LG1) und DO (RF) durchgeführt. Eine ausführliche Aufstellung der Fed-Batch-Kultivierungsbedingungen für *B. bifidum* ist Tabelle 2 zu entnehmen.

	Inhalt	Mikrofluidik-Einstellungen
Reservoir A (Substrat)	500 g/L Glukose	• Pumpvolumen: 0,16 µL • Füllvolumen: 1900 µL • Zufütterungsbeginn: > 5 h • Konstante Zufütterung: 4 µL/h
Reservoir B (pH-Kontrolle)	3 M NaOH	• Pumpvolumen: 0,30 µL • Füllvolumen: 1900 µL • Beginn pH-Kontrolle: > 0,5 h • PI-Einstellungen: MITTEL
Kultivierungswells	*B. bifidum* in MRS-Bouillon	• Startvolumen: 2000 µL • Max. Volumen: 2400 µL • pH-Kontrolle: pH 6,0

Tabelle 2: Fed-Batch-Kultivierungsbedingungen für *B. bifidum*

Layouteinstellungen in der Gen2-Mikrofluidik Round Well Plate

Alle Fed-Batch-Kultivierungen erfolgten in der Gen2-Mikrofluidik Round Well Plate (Abb. 2).

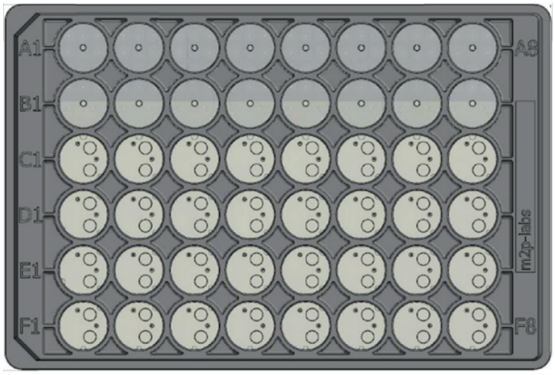


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gen2-Mikrofluidik Round Well Plate

Reihe A enthielt 1900 µL Glukose-Zufütterlösung und Reihe B war mit 1900 µL pH-Stellmittel gefüllt. In der BioLection Software wurden die Pumpvolumina auf 0,30 µL für wässrige Lösungen (3 M NaOH) und 0,16 µL für die viskosere Zufütterlösung (500 g/L Glukose) eingestellt. Bei allen Fed-Batch-Experimenten war die Zufütterung zeitgesteuert und das Zufütterungsprofil auf eine konstante Zufütterung mit 4 µL/h eingestellt. Die pH-Kontrolle war auf pH 6,0 gesetzt. Die anaeroben Bedingungen in allen Kultivierungswells wurden durch Verwendung des BioLector XT Mikrobioreaktor-Begasungsdeckels erreicht, der auf die MTP gesetzt wurde, nachdem diese präpariert und mit einer gasdurchlässigen sterilen Silikonfolie (M2P-F-GPRSMF32-1) versiegelt worden war.

Ergebnisse

Fed-Batch-Kultivierung von *Lactobacillus casei* im BioLector XT Mikrobioreaktor

In Abbildung 3 ist der Kultivierungsvorgang von *Lactobacillus casei* in MRS-Bouillon dargestellt. Im oberen Diagramm sind die Online-Signale von Biomasse und Gelöstsauerstoff sowie das Volumen der zugegebenen Zufütterlösung (500 g/L Glukose) zu sehen. Im unteren Diagramm sind die Online-Werte von pH und die zugehörigen NaOH-Volumina gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen.

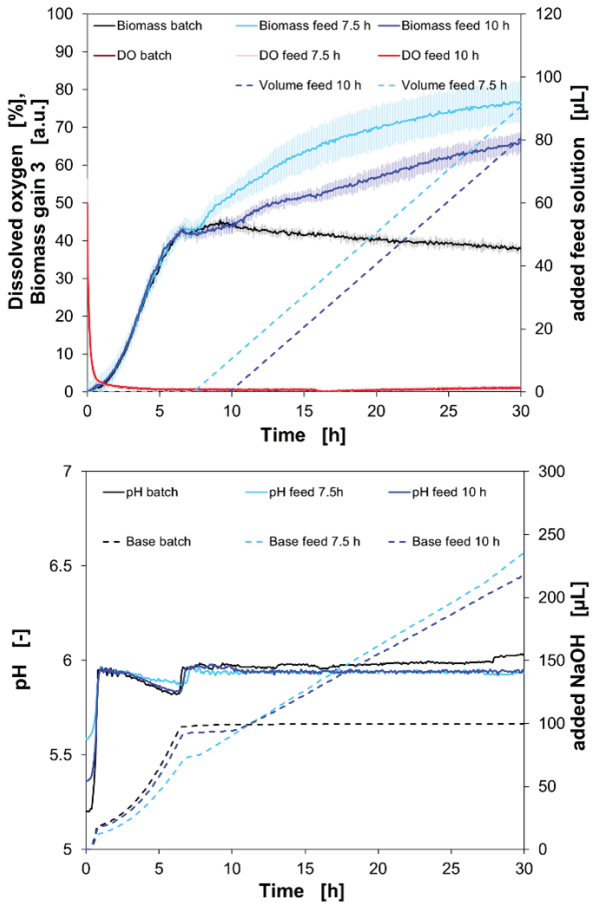


Abbildung 3: Kultivierung von *L. casei* mit dem Begasungsdeckel im BioLector XT Mikrobioreaktor

Hier wurden drei verschiedene Prozesskonfigurationen angewendet: eine Batch-Kultivierung und zwei Fed-Batch-Kultivierungen, davon eine mit Zufütterungsbeginn nach 7,5 Stunden und die andere mit Zufütterungsbeginn nach 10 Stunden. Bei einer kontinuierlichen Flussrate von 30 mL/min N_2 nahm der DO gleichmäßig ab. Nach 45 Minuten lag der DO unter 5 % und sank noch weiter. Nach 4,5 Stunden hatte der DO einen Wert unter 0,5 % erreicht und fiel weiter Richtung 0 % ab. Mit Beginn der stationären Phase der Kultur nach rund 6,7 Stunden stoppt das exponentielle Wachstum; das Biomassesignal betrug zu diesem Zeitpunkt bei allen drei Kulturverfahren 42 a. u. Die Batch-Kultur wuchs weiter langsam auf ein Maximum von 44 a. u. nach 9,5 Stunden an und nahm dann gleichmäßig auf ein Biomassesignal von 38 a. u. am Ende der Kultivierung ab. Der Anstieg des Biomassesignals korreliert mit der Zugabe der Zufütterlösung. Sobald die Zufütterung von Nährlösung beginnt, ist eine Zunahme des Biomassesignals zu erkennen. Das finale Biomassesignal betrug beim Fed-Batch-Prozess mit Zufütterungsbeginn nach 7,5 Stunden 76,3 a. u. und beim Fed-Batch-Prozess mit Zufütterungsbeginn nach 10 Stunden 65,5 a. u. nach jeweils 30 Stunden. Die Werte des supplementierten NaOH korrelieren mit dem Wachstum. Die Zugabe von 3 M NaOH wurde mit Beginn der stationären Phase gestoppt, da aufgrund von ausbleibendem Wachstum keine weitere bakterielle Säureproduktion stattfand. Im Fall der konstanten Zugabe der Zufütterlösung lief die Säureproduktion weiter, sodass die Base weiterhin benötigt wurde, um den pH-Wert auf dem Zielwert von 6,0 zu halten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieser Versuch zeigt, dass der BioLector XT Mikrobioreaktor aufgrund seines Begasungsdeckels und der erfolgreichen Anwendung von pH-Kontrolle und gleichzeitiger Zufütterung von Nährlösung bei direkter anaerober Begasung ein geeignetes Gerät für anaerobe Kultivierungsvorgänge ist.

Technische und biologische Validierung der anaeroben Bedingungen im BioLector XT Mikrobioreaktor

Die Aufrechterhaltung anaerober Bedingungen über die gesamte Kultivierungsdauer ist eine wichtige Voraussetzung für die Anzucht sauerstoffempfindlicher Organismen. Im folgenden Versuch wurde ein externer Sauerstoffsensor (FTM Pst6 Sensor/Fibox 4 trace, Fa. PreSens Precision Sensing GmbH, Deutschland) am Gasauslass des BioLector XT Mikrobioreaktors installiert, um die technische Funktion des BioLector XT Mikrobioreaktor-Begasungsdeckels zu validieren und die Dichtigkeit des Deckels und somit die anaerobe Atmosphäre nachzuweisen.

In Abbildung 4 sind die Versuchsdaten einer Batch-Kultivierung von *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) dargestellt. Das obere Diagramm zeigt das Online-Biomassesignal (Gain 3); im unteren Diagramm sind das Online-Signal des Gelöstsauerstoffs in der Kulturbrühe und die Sauerstoffkonzentration im BioLector XT Mikrobioreaktor-Gasauslass, das Online-pH-Signal sowie das zur pH-Kontrolle zugegebene NaOH-Volumen dargestellt.

Mit einer zeitlichen Verzögerung von 2,86 Stunden begann das exponentielle Wachstum. Das finale Biomassesignal lag bei 155,865 a. u. (OD_{600} = 9,01 ±0,07) nach 7,96 Stunden, als die stationäre Phase begann. Während des Wachstums von *L. plantarum* fand Milchsäureproduktion statt. Die Zunahme der Säurebildung korrelierte mit dem NaOH-Volumen, das zur Aufrechterhaltung von pH 6,0 zugegeben wurde. Bei einer kontinuierlichen Flussrate von 30 mL/min N_2 nahm der DO gleichmäßig ab. Nach 39 Minuten lag der DO unter 5 % und sank noch weiter. Nach 4 Stunden war der DO weiter auf unter 0,5 % gefallen und sank weiter Richtung 0 % ab. Der externe Sensor zeigte nach einer Kultivierungsdauer von 16 Stunden eine finale Sauerstoffkonzentration von 0,029 % an.

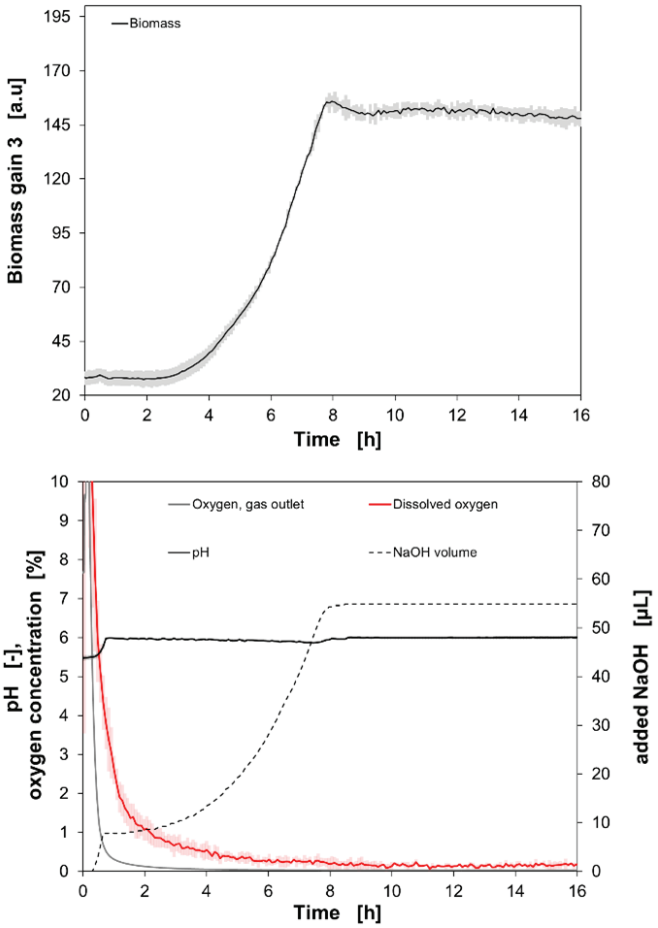


Abbildung 4: Kultivierung von *L. plantarum* mit dem Begasungsdeckel im BioLector XT Mikrobioreaktor, biologisches Duplikat

Mit diesem Kultivierungsbeispiel wurde die technische Funktion validiert. Da *Lactobacillus* spp. auch unter aeroben Bedingungen wachsen und sogar Sauerstoff metabolisieren können, reicht dies nicht als Nachweis für die biologische Validierung der anaeroben Kultivierung im BioLector XT Mikrobioreaktor aus. Daher wurde das streng anaerobe *Bifidobacterium bifidum* kultiviert. Die erfolgreiche Kultivierung dieses Stamms dient zur biologischen Validierung für anaerobe Kultivierungen im BioLector XT Mikrobioreaktor. In Abbildung 5 sind die Versuchsdaten einer Batch- wie auch einer Fed-Batch-Kultivierung von *B. bifidum* dargestellt. Im oberen Diagramm sind die Online-Signale der Biomasse und das zugegebene Zufütterungsvolumen gegen die Kultivierungsdauer aufgetragen. Im unteren Diagramm sind die Online-(Optoden-)Signale von pH und DO sowie das zugegebene Volumen von 3 M NaOH und das Sauerstoffsignal des externen Gassensors im Gasauslass des Mikrobioreaktors dargestellt.

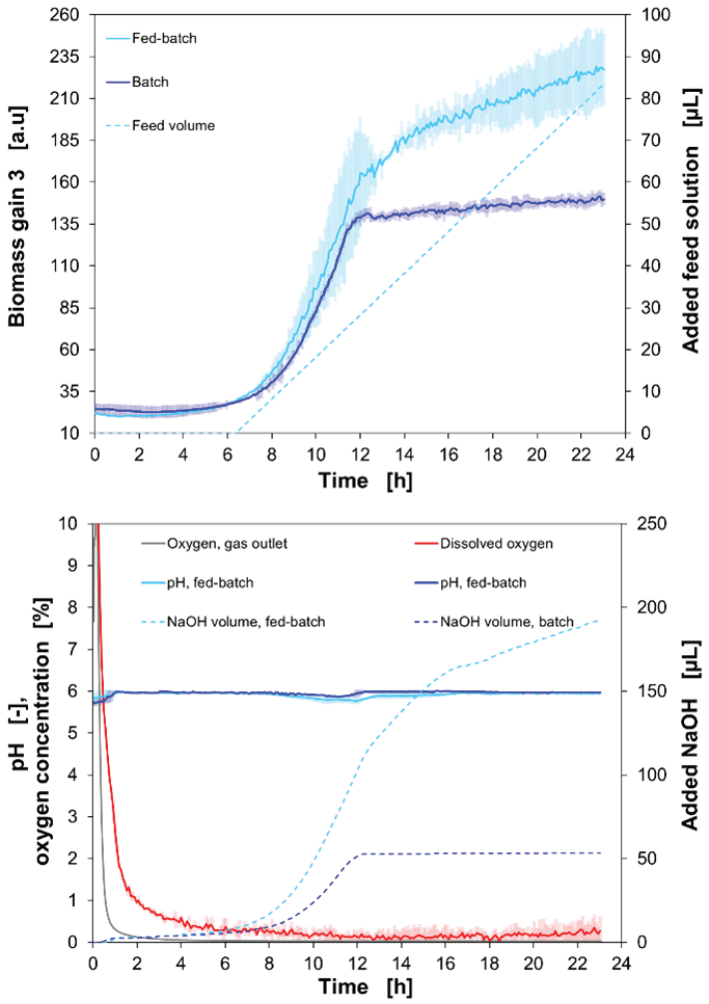


Abbildung 5: Kultivierung von *B. bifidum* mit dem Begasungsdeckel im BioLector XT Mikrobioreaktor, biologisches Duplikat

Nach einer zeitlichen Verzögerung von 2,4 Stunden begann das exponentielle Wachstum und bei der Batch-Kultur erreichte das Biomassesignal einen Endwert von 147,57 a. u. (OD_{600} = 8,3 ±0,57). Im Gegensatz zur Batch-Kultur ist bei der Fed-Batch-Kultur eine verlängerte exponentielle Wachstumsphase erkennbar. Dieses Phänomen wird durch die größere Glukosemenge im Medium verursacht, da die Zufütterung bereits nach 6 Stunden begonnen wurde. Nach 23 Stunden Kultivierungszeit wurde ein maximaler Biomassewert von 227,3 a. u. (OD_{600} = 15,93 ± 0,69) erreicht. Während des Wachstums von *B. bifidum* fand Milchsäureproduktion statt, die mit dem Wachstum korreliert, wie an der Kurve der Zugabe von NaOH zur Aufrechterhaltung eines pH-Werts von 6,0 zu erkennen ist. Insgesamt wurden 193,56 µL 3 M NaOH in die Kulturbrühe gepumpt. Bei einer kontinuierlichen Flussrate von 30 mL/min N_2 nahm der DO gleichmäßig ab. Die extern gemessenen Sauerstoffdaten für die ersten 16 Stunden der Kultivierung von *L. plantarum* (siehe oben) und *B. bifidum* wurden gleichzeitig im gleichen Experiment bestimmt, MTP, Begasungsdeckel und externer Gassensor waren also in beiden Fällen identisch. Es ist zu sehen, dass das DO-Signal nach 18 Stunden leicht abnimmt, was dadurch zu erklären sein könnte, dass der technisch bedingte Signaldrift der Sauerstoff-Optoden < 0,5 % O_2 pro Tag bei 0 % Sauerstoff beträgt. Die Daten des externen Sauerstoffsensors zeigen nach 23 Stunden einen Wert von 0,029 % Sauerstoff im Gasauslass des BioLector XT Mikrobioreaktors an, was bestätigt, dass die anaeroben Kultivierungsbedingungen über die gesamte Kultivierungsdauer aufrechterhalten wurden.

Wir ziehen das Fazit, dass eine erfolgreich durchgeführte Kultivierung eines anaeroben Organismus im BioLector XT Mikrobioreaktor gezeigt wurde. Bei Einsatz der Mikrofluidik-Chiptechnologie von Beckman Coulter Life Sciences in Kombination mit der direkten Stickstoffbegasung über den Begasungsdeckel stellen gleichzeitige pH-Kontrolle, Zufütterung von Nährlösungen und Direkt-Stickstoffbegasung bei Kultivierungen im Kleinmaßstab keine Schwierigkeit mehr dar.

Schlussfolgerungen

Wir haben die technische und biologische Validierung der Kultivierung von probiotischen Mikroorganismen wie *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium bifidum* im BioLector XT Mikrobioreaktor in Kombination mit dem zugehörigen Begasungsdeckel gezeigt. Die Mikrofluidik-Chiptechnologie von Beckman Coulter Life Sciences in Kombination mit der direkten Stickstoffbegasung über den Begasungsdeckel ermöglicht die gleichzeitige pH-Kontrolle, Zufütterung von Nährlösungen und Direkt-Stickstoffbegasung bei Kultivierungssystemen im Kleinmaßstab. Das System ist für die Kultivierung von anaeroben Bakterien geeignet.

Quellen

1. Ku S, Park MS, Ji GE, You HJ. Review on *Bifidobacterium bifidum* BGN4: Functionality and nutraceutical applications as a probiotic microorganism. Int J Mol Sci. 2016;17(9):1544. https://doi.org/10.3390/ijms17091544
2. Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* Species, Journal of Dairy Science, 1992, 75(12): 3296-3306. https://doi.org/10.3168/jds.S0022 0302(92)78105-3
3. Sakurai T, Yamada A, Hashikura N, Odamaki T, Xiao JZ. Degradation of food-derived opioid peptides by bifidobacteria. Benef Microbes. 2018; 9(4):675-682. https://doi.org/10.3920/BM2017.0165
4. Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T, Tashiro Y, Effects of Fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. Bifidobacteria Microflora. 1986, 5(1), 37-50. https://doi.org/10.12938/bifidus1982.5.1_37doi: 10.12938/bifidus1982.5.1_37
5. Kato K, Odamaki T, Mitsuyama E, Sugahara H, Xiao JZ, Osawa R. Age-related changes in the composition of gut *Bifidobacterium* species. Curr Microbiol. 2017;74(8):987-995. https://doi.org/10.1007/s00284-017-1272-4
6. Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C and Ross RP (2018) The *Lactobacillus casei* group: History and health related applications. Front. Microbiol. 9:2107. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107

© 2021 Beckman Coulter, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Beckman Coulter, das stilisierte Logo und die hier genannten Beckman Coulter Produkt- und Dienstleistungsmarken sind Marken oder eingetragene Marken von Beckman Coulter, Inc. in den USA oder anderen Ländern. Alle übrigen Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

Die Kontaktdaten der Beckman Coulter Niederlassungen weltweit finden Sie unter „Contact Us“ .auf **beckman.com**.

21.04.1423.PCC