

## Populationsheterogenität

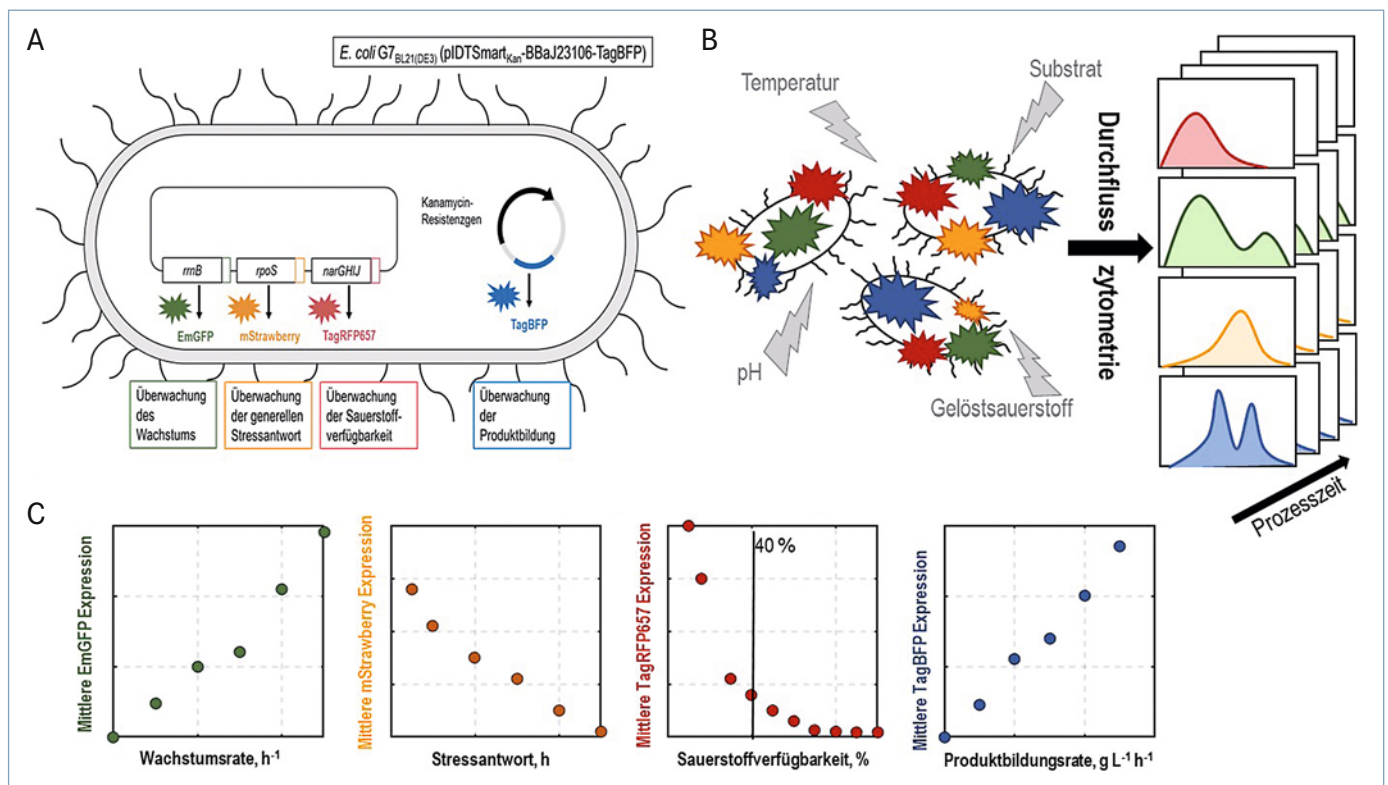
# Versteckte Vielfalt: Diversität von Zellen im industriellen Bioprozess

PRASIKA ARULRAJAH UND ANNA-LENA HEINS  
TU MÜNCHEN, TUM SCHOOL OF ENGINEERING AND DESIGN,  
LEHRSTUHL FÜR BIOVERFAHRENSTECHNIK, GARCHING

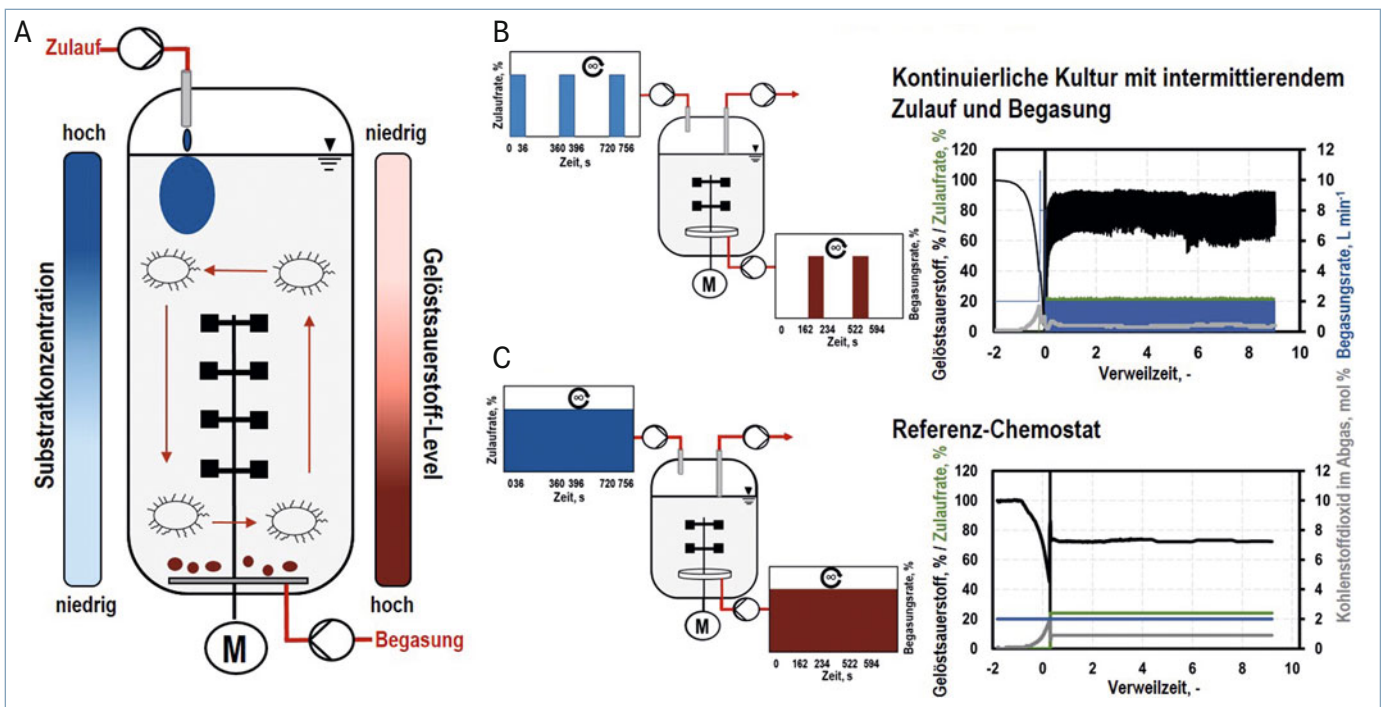
**Population heterogeneity poses a major challenge in industrial scale bioprocesses, affecting process performance but also leading to more robust phenotypes. To investigate this phenomenon, multiple fluorescent reporter strains are cultivated under simulated industrial scale conditions in multi-compartment bioreactors. This approach significantly raises the quantitative understanding of population heterogeneity which is needed before its benefits can help to develop high-yielding, more robust bioprocesses.**

DOI: 10.1007/s12268-023-1922-y  
© Die Autorinnen 2023

Die mikrobielle Herstellung von Bioprodukten gewinnt als nachhaltige Alternative zu chemischen Produktionsverfahren zunehmend an Bedeutung. Das Hochskalieren von Bioprozessen ist jedoch häufig mit unerwarteten Produktivitätseinbußen verbunden [1]. In großvolumigen industriellen Bioreaktoren bilden sich aufgrund nicht idealer Durchmischung Konzentrationsgradienten aus [2]. Zellen, die durch großvolumige Bioreaktoren transportiert werden, sind diesen variierenden Mikroumgebungen ausgesetzt und aktivieren abhängig von ihrer lokalen Umgebung unterschiedliche Stoffwechselffade. Als Konsequenz kann aus einer isogenen Kultur eine heterogene Zellpopulation im Bioreaktor entstehen. Dieses Phänomen wird als Popula-



**▲ Abb. 1:** Visualisieren von Populationsheterogenitäten im Bioprozess. **A**, Schematische Darstellung des Mehrfach-Reporterstamms *Escherichia coli* G7<sub>BL21(DE3)</sub>-pIDTSmart<sub>Kan</sub>-BBaJ23106-TagBFP für die Überwachung des Wachstums (grün), der generellen Stressantwort (gelb), der Sauerstoffverfügbarkeit (rot) und der Produktbildung von Einzelzellen (blau). **B**, exemplarische, mittels Durchflusszytometrie erfasste Fluoreszenzverteilungen der Reporterproteine nach Einwirkung extrinsischer Einflüsse im Bioprozess. **C**, Zusätzlich sind die erwarteten Korrelationen zwischen den Reporterproteinen und den jeweiligen Prozessparametern illustriert.



▲ **Abb. 2:** Abbilden industrieller Kultivierungsbedingungen im Labormaßstab. **A,** Schematische Darstellung eines industriellen Bioreaktors mit Substrat- und Sauerstoffgradient. **B,** Darstellung von Prozessdaten während der experimentellen Simulation industrieller Prozessbedingungen im Labormaßstab mit intermittierendem Zulauf und Begasung in kontinuierlicher Kultur. **C,** Vergleich zum Referenz-Chemostat mit konstantem Zulauf und Begasung.

tionsheterogenität bezeichnet [3] und ist mechanistisch kaum verstanden.

### Bioprozesse auf Populations- und Einzelzellebene

Regulär werden Zellen in Bioprozessen als gemittelte Einheitszellen betrachtet und der Prozessverlauf durch Messen von Biomasse- und Metabolit-Konzentrationen auf Populationsebene verfolgt. Um Populationsheterogenität in Bioprozessen sichtbar zu machen, ist allerdings auch die Untersuchung der Charakteristika von Einzelzellen nötig.

Um *in vivo* einen Einblick in die Populationsheterogenität im Bioprozess zu bekommen, werden oft zelluläre Reportersysteme eingesetzt (**Abb. 1A**, [4]). Multiple Reportersysteme tragen mehrere Fluoreszenzproteine chromosomal oder auf einem Plasmid integriert, sodass sie mit ausgewählten Zeleigenschaften abgelesen und so deren Expression als Fluoreszenzverteilung mittels Durchflusszytometrie analysiert werden kann (**Abb. 1B**). Die jeweilige Fluoreszenzintensität dient dabei als Maß für die Aktivität der zellulären Eigenschaft [4]. Dies ermöglicht eine mehrdimensionale Einzelzellanalyse. Einerseits können so Verteilungen zellulärer Eigenschaften miteinander korreliert und andererseits prozesszeitabhängige Popu-

lationsverteilungsveränderungen quantifiziert werden (**Abb. 1C**).

### Industrielle Kultivierungsbedingungen im Labormaßstab abbilden

Da industrielle Bioreaktoren selten der Forschung zur Verfügung stehen, wurden verschiedene experimentelle Aufbauten entwickelt, um industrielle Bioprozesse mit Mischinsuffizienzen im Labormaßstab abzubilden. Multikompartiment-Bioreaktoren bestehen aus einem homogen durchmischten Rührkesselreaktor, gekoppelt an Gradientenzonen im Bypass, wodurch nur ein Teil der Zellpopulation den Limitierungen ausgesetzt ist [5]. Zur Untersuchung von Populationsheterogenität unter kontrollierten Reaktionsbedingungen sind allerdings kontinuierlich betriebene Rührkesselreaktoren besser geeignet, bei denen die Prozessvariablen zeitweilig aussetzend (intermittierend) kontrolliert werden [4, 6]. So erfahren alle Zellen im Bioreaktor die gleichen dynamischen Umweltbedingungen.

### Reaktion von *Escherichia coli* auf Mischinsuffizienzen

Wir kultivierten den *Escherichia coli*-Vierfach-Reporterstamm G7<sub>BL21(DE3)</sub> (**Abb. 1A**, [7] mit Plasmid pIDTsmart<sub>kan</sub>-BBaJ23106-

TagBFP), der als Modellprodukt das blau fluoreszierende Protein TagBFP produziert, mit intermittierender Zulaufzugabe sowie intermittierender Begasung bei einer Durchflussrate von 0,2 h<sup>-1</sup> im 1,5-Liter-Rührkesselreaktor. Dieser Stamm ermöglicht das Verfolgen zentraler Charakteristika wie Wachstum, generelle Stressantwort, Sauerstoffverfügbarkeit sowie Produktbildung auf Einzelzellebene im Bioprozess.

Nach einer anfänglichen Prozessphase zum Generieren von Biomasse (Satzphase), gaben wir ein Gradientenprofil mit 6-Minuten-Zyklen vor. Hierzu schalteten wir für 36 Sekunden den Zulauf ein, pausierten anschließend 126 Sekunden, begasteten 72 Sekunden und pausierten danach 126 Sekunden bis zum Start eines neuen Zyklus. Dies bildet den Weg von Einzelzellen ab – vom oberen Teil eines industriellen Bioreaktors, wo Substrat zugegeben wird, aber wenig Sauerstoff verfügbar ist, in den unteren Teil, in dem begastet wird und das zugegebene Medium nahezu verbraucht ist (**Abb. 2A, B**). Um den Einfluss dieser fluktuierenden Umweltbedingungen auf die Verteilungen zellulärer Eigenschaften zu bewerten, führten wir zusätzlich kontinuierliche Kultivierungen (Chemostat) mit konstanter Begasung und Zulauf durch (**Abb. 2C**). Im Vergleich zum Chemostat, in dem der Gehalt an Gelöst-

sauerstoff und der Kohlenstoffdioxidanteil im Abgas konstant bleiben, sind im intermittierenden Prozess periodische Schwankungen beider Prozessgrößen als Antwort auf die Zugabepprofile sichtbar (**Abb. 2B, C**).

Auf Einzelzellebene (**Abb. 3A**) traten im Chemostaten nach der Satzphase unimodale, symmetrische, in Breite und Intensität gleichbleibende Verteilungen für das Wachstum auf. Mit intermittierendem Zulauf und Begasung werden hingegen nach 4,5 mittleren hydraulischen Verweilzeiten zwei Populationen sichtbar. Dabei nimmt der prozentuale Anteil der geringer fluoreszierenden Subpopulation im Prozessverlauf von fünf auf 23 Prozent am Prozessende zu. Auch die Fitness der Zellen (**Abb. 3B**), die sich mit dem geometrischen Mittelwert der Verteilungen für das Einzelzellwachstum beschreiben lässt, nimmt nach sieben Verweilzeiten in der intermittierenden Kultur deutlich ab, während die Fitness im Chemostaten konstant bleibt. Sobald die Produktbildung sich beträchtlich erhöht, beginnt die Populationsfitness abzunehmen (**Abb. 3A**). Anscheinend verringert die nach einer Anpassungsphase verstärkte Produktbildung die Populationsfitness, sodass anschließend 17 Prozent der Zellen eine Subpopulation bilden, die die Produktbildung nicht aufrechterhalten kann.

Bei Korrelation der Produktbildung mit dem Wachstum sowie der generellen Stressantwort weisen zwei Subpopulationen interessante Eigenschaften auf (**Abb. 3C**, rotes Viereck): Zum einen gibt es Zellen, die wachsen und produzieren können und zum anderen produzierende Zellen, die eine höhere generelle Stressantwort als andere aufweisen. Damit scheinen einige Zellen potenziell robuster zu sein als ein Großteil der Population. Diese Zellen sind für einen industriellen Bioprocess wünschenswert, und es ist interessant, welche Rolle ihnen im Gesamtgleichgewicht des Prozesses zukommt. Deshalb analysieren wir derzeit das Proteom, um die unterschiedlichen Phänotypen zu charakterisieren.

### Künftiger Nutzen der Populationsheterogenität im Bioprocess

Um die anfangs erwähnte steigende Nutzung biotechnologischer Produktionspro-

zesse erfolgreich im industriellen Maßstab realisieren zu können, werden robuste Prozesse mit maximiertem Ertrag benötigt. Dazu ist es auch notwendig, Populationsheterogenität in Bioprocessen besser zu verstehen. Als erstes gilt es zu bestimmen, in welchen Phasen eines Bioprocesses Populationsheterogenität vorteilhaft ist und wann nicht. Dabei wird auch eine detaillierte Charakterisierung von auftretenden Subpopulationen mittels Omics-Methoden von großer Bedeutung sein. Dies wird potenziell auch einen Einblick geben, welche Populationsstrategien Zellen in industriellen Bioprocessen anwenden und so dazu beitragen, das mechanistische Gesamtverständnis von Populationsheterogenität zu erhöhen. Darauf aufbauend können zukünftig geeignete Prozessführungsstrategien zum Einsatz kommen, wie das Segregostat-Konzept [8], um Populationsheterogenität auf einem für eine bestimmte Prozessphase vorteilhaften Niveau zu halten. Der Segregostat erlaubt es, den Diversifizierungsgrad einer Population in einer kontinuierlichen Kultur, der mittels Online-Durchflusszytometrie fortlaufend analysiert wird, durch Rückkopplungssteuerung der Zulaufzugabe auf einem vorgegebenen Wert zu halten.

### Danksagung

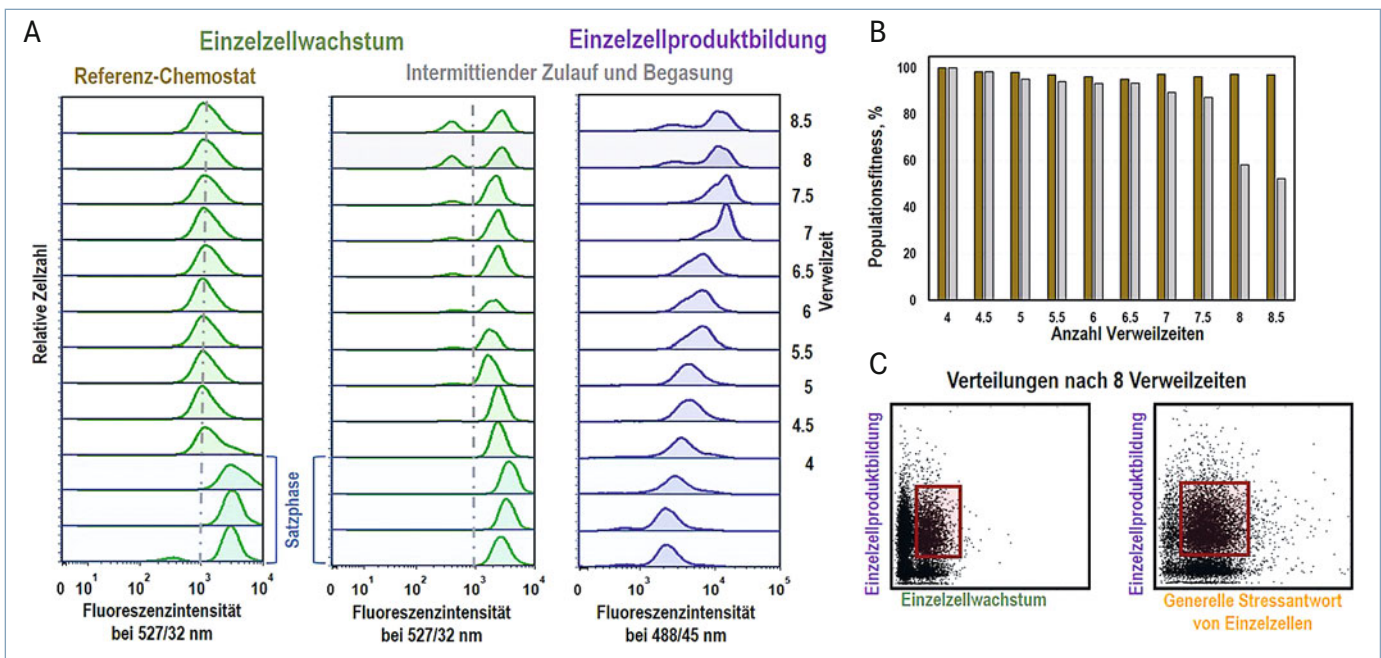
Besonderer Dank gilt Dirk Weuster-Botz (Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München) für die wissenschaftliche Unterstützung und die Möglichkeit, die hervorragende Infrastruktur seines Lehrstuhls nutzen zu können. Weiterer Dank gilt Julian Helfrich, der an Arbeiten im Labor beteiligt war. Die finanzielle Unterstützung von Prasika Arulrajah durch die Deutsche Forschungsgesellschaft (Projekt-Nummer HE8502/1-1) im Zuge des Schwerpunktprogramms InterZell (SPP2170) wird dankend anerkannt, genauso wie die Unterstützung der TUM Graduate School. ■

### Literatur

- [1] Schmidt FR (2005) Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 425–435
- [2] Haringa C, Tang W, Deshmukh AT et al. (2016) Euler-Lagrange computational fluid dynamics for (bio)reactor scale down: An analysis of organism lifelines. *Eng Life Sci* 16: 652–663
- [3] Nikel PI, Silva-Rocha R, Benedetti I, de Lorenzo V (2014) The private life of environmental bacteria: pollutant biodegradation at the single cell level. *Environ Microbiol* 16: 628–642

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 3:** Segregierter Blick auf die Zellen. **A,** zeitliche Abfolge der Verteilungen für Einzelzellwachstum und Produktbildung von Einzelzellen. **B,** Populationsfitness im Vergleich zur Fitness zu Beginn der kontinuierlichen Phase zu verschiedenen mittleren hydraulischen Verweilzeiten jeweils für eine kontinuierliche Kultivierung mit intermittierendem Zulauf und Begasung im Vergleich zum Referenz-Chemostat. **C,** Streudiagramme zur Korrelation von Zellcharakteristika nach acht Verweilzeiten im intermittierenden Prozess mit potenziell robusteren Subpopulationen (rotes Viereck).

- [4] Heins AL, Weuster-Botz D (2018) Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. *Bioprocess Biosyst Eng* 41: 889–916
- [5] Takors R (2012) Scale-up of microbial processes: impacts, tools and open questions. *J Biotechnol* 160: 3–9
- [6] de Jonge LP, Buijs NAA, ten Pierick A et al. (2011) Scale-down of penicillin production in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol J* 6: 944–958
- [7] Heins AL, Reyelt J, Schmidt M et al. (2020) Development and characterization of *Escherichia coli* triple reporter strains for investigation of population heterogeneity in bioprocesses. *Microb Cell Fact* 19: 14
- [8] Sassi H, Nguyen TM, Telek S et al. (2019) Segregostat: a novel concept to control phenotypic diversification dynamics on the example of Gram-negative bacteria. *Microb Biotechnol* 12: 1064–1075

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

#### Korrespondenzadresse:

Dr. Anna-Lena Heins  
Technische Universität München  
TUM School of Engineering and Design  
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik  
Boltzmannstraße 15  
D-85748 Garching  
[anna-lena.heins@tum.de](mailto:anna-lena.heins@tum.de)

#### AUTORINNEN



##### Prasika Arulrajah

2017–2022 Studium Technische Biologie, Universität Stuttgart (Bachelor) und industrielle Biotechnologie, TU München (Master). Seit 2022 wissenschaftliche Mitarbeiterin mit dem Forschungsschwerpunkt „Populationsheterogenität“ am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TU München.



##### Anna-Lena Heins

2005–2010 Studium Biotechnologie, TU Braunschweig. 2011–2014 Promotion, TU Dänemark (DTU). 2014–2015 Postdoktorandin, DTU. 2015–2017 Spezialistin Statistik & Trending, Octapharma Produktionsgesellschaft. Seit 2017 Habilitandin und Gruppenleiterin „Populationsheterogenität“ am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, TU München.