

Single-cell mass balancing

Mikroskalige Massenbilanzierung in mikrofluidischen Umgebungen

KATHARINA SMALUCH¹, CHRISTIAN DUSNY¹, DIETRICH KOHLHEYER²,
ALEXANDER GRÜNBERGER³

¹ DEPARTMENT SOLARE MATERIALIEN (SOMA), HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR
UMWELTFORSCHUNG – UFZ, LEIPZIG

² IBG-1: BIOTECHNOLOGY, FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH

³ TECHNISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄT BIELEFELD

Implementing key biochemical engineering principles based on the kinetics and stoichiometry of growth unlocks the full potential of microfluidic single-cell analysis. We introduce a unique integrative approach, using non-invasive advanced microfluidic cultivation and analysis technologies to integrate physiologic single-cell data. Our groundwork enables microscale material balancing beyond population-based average values and advances modern bioprocess modeling [1].

DOI: 10.1007/s12268-023-1978-8
© Die Autorinnen und Autoren 2023

Die Nutzung mikrobieller Zellen als Katalysatoren zur Herstellung von Produkten des täglichen Lebens reicht mehrere Jahrtausende zurück. Lebensmittel, Biokraftstoffe, medizinische Erzeugnisse bis hin zu biotechnologisch relevanten Fein- und Bulk-Chemikalien sind dabei einige der wichtigsten Produktkategorien. Die biokatalytische Leistungsfähigkeit einer Zelle ist im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren abhängig von physikalischen, chemischen und biochemischen Vorgängen inner- und außerhalb der Zelle [2]. Der messbare Output eines bioka-

talytischen Prozesses wird durch die kumulative Aktivität der in Population vorhandenen Einzelzellen ausgewiesen. Die individuelle Zelleistung und die daraus abgeleitete katalytische Effizienz und Produktivität wird jedoch durch Populationsanalysen maskiert. Der Beitrag und die Bedeutung von potenziell produktivitätsbestimmender katalytischer Heterogenität lässt sich nur durch mikrobielle Einzelzellanalysen erschließen [3].

Die Modellsoftware Berkeley Madonna ist in der Lage, grafisch akkurate Prognosen mit unseren experimentell erhobenen kineti-

schen und stöchiometrischen Datensätze zu generieren. Zahlreiche mikroskalige Parameter nicht linear verlaufener Populationsdynamiken können mithilfe komplexer mathematischer Modelle berechnet werden.

Der Fokus der Modellierung liegt darauf, den größtmöglichen Ertrag zu generieren, der mithilfe aller gewonnenen Parameter (Abb. 2) der Population prognostiziert werden kann. Dabei sind die Komponenten jeder einzelnen Zelle auf die bestmögliche Nutzung der verfügbaren Energie und des Kohlenstoffs angewiesen, um Ausbeutekoeffizienten zu maximieren. Die Massenbilanzierung umfasst die Quantifizierung sämtlicher extrazellulärer Stoffflüsse: Substrate, Metabolite, Biomasse und eventuelle Nebenprodukte (Abb. 1). Dies ermöglicht die Beurteilung der Effizienz des mikrobiellen Stoffwechsels, die Identifizierung von Engpässen oder metabolischen Limitationen, Optimierung mikrobieller Prozesse sowie produktivitätsbestimmender katalytischer Heterogenitäten einzelner Organismen innerhalb der Population.

Dabei ist die Zusammensetzung der Organismen (Axenische oder Mischkulturen) inklusive ihrer Stärken, Schwächen und grundlegenden Bedürfnisse zu berücksichtigen. Jede Spezies konkurriert schlussendlich miteinander um Ressourcen, die zur Selbsterhaltung, Reproduktion und Produktbildung genutzt werden. Mit der Überwachung und Justierung von Modellparametern sowie dem Inkludieren eines Modell-Resümees kann der Verlauf des nächsten Experiments vorhergesagt und zur Systemanpassungen genutzt werden.

Die Gleichungen unseres Modells setzen sich aus zellulär-physiologischen Deskriptoren zusammen: der Kinetik des Zellwachstums μ , der Substrataffinität K_s , der Produktbildung P , sowie den daraus ableitbaren stöchiometrischen Daten (Abb. 1). Diese bilden die Basis zur Erstellung von Massenbilanzen und den daraus zu ermittelnden biokatalytischen Effizienzen [3]. Das Prinzip der Bilanzierung ist dabei eine tragende Säule der modernen Biotechnologie und Bioverfahrenstechnik. Dessen Anwendung in

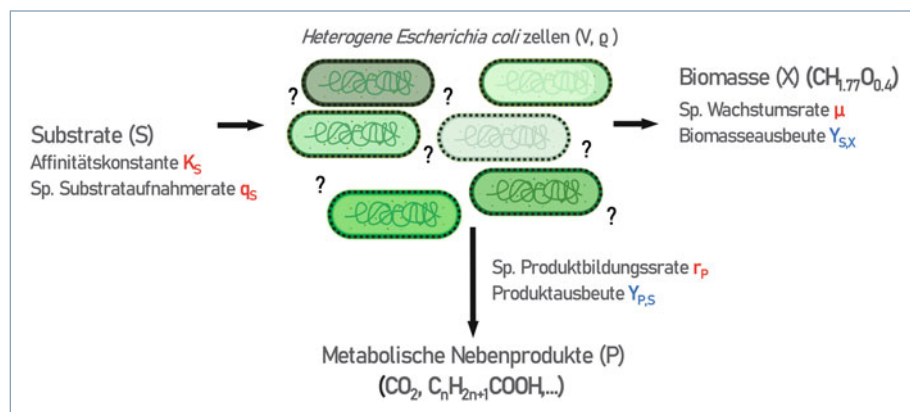


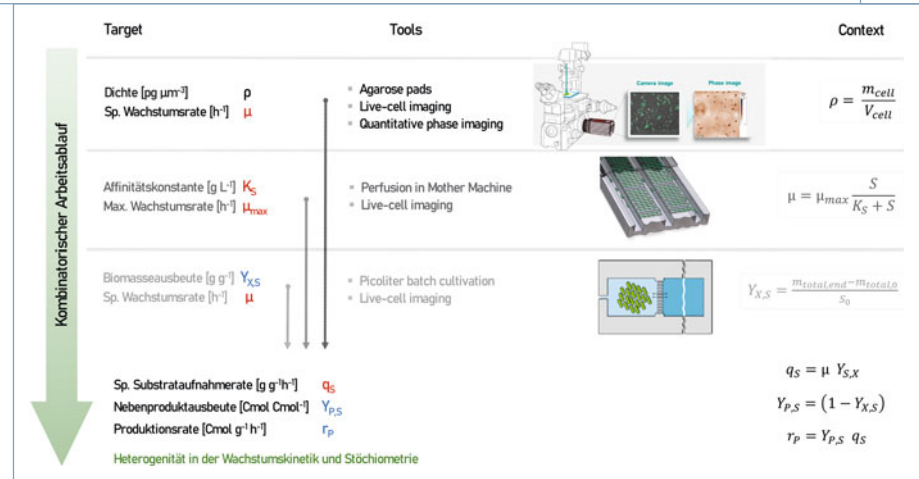
Abb. 1: Kinetiken (rot) und Koeffizienten (blau), die das Wachstum von *Escherichia coli*-MG1665-Zellen auf Substrat (C-Quelle: Glucose) und die daraus mögliche Stoffwechselprodukte (Metaboliten, Biomasse) beschreiben.

mikroskaligen Reaktionsumgebungen war aufgrund technologischer und konzeptioneller Hürden bis vor Kurzem kaum möglich.

Im Mittelpunkt unserer Studie steht die neuartige, nicht invasive und Marker-freie Technologie der quantitativen Phasenbildgebung (QPI), welche erstmalig Zugang zur optischen Zellmassen- und Trockensubstanzdichtendetektion einzelner mikrobieller Zellen im sup-pg-Bereich ermöglicht. Eine Wachstumsverfolgung mit solch präziser Auflösung ist die einzige Maßnahme zur genauen Analyse von μ , da die spez. Wachstumsrate als Massenzunahme in einem kontrollierten biologischen System über die Zeit definiert ist. Die Zelltrockenmasse und die daraus ableitbare Trockensubstanzdichte bildet die Grundlage zur Berechnung des Biomasseausbeutekoeffizienten (**Abb. 2**). Mikrofluidische Perfusionskultivierungen ermöglichen die Messungen von Substrataffinitäten, welche zwingend erforderlich sind, um die Effizienz der Umwandlung von Substrat in Biomasse und Produkte sowie deren Heterogenität auf Einzelzellebene zu ermitteln. Durch Zell- oder Biomassekonzentration lassen sich wichtige Leistungsdeskriptoren wie Aufnahme- und Syntheseraten (**Abb. 2**) bestimmen [4].

Neben dem Wachstum ist die spezifische Substrataufnahmerate q_s bei der Leistungsanalyse von zellulären Biokatalysatoren von größter Bedeutung. Bioprozesse werden häufig durch eine begrenzte Substratzufuhr gesteuert, um die Bildung von Bioprodukten zu verhindern oder das Wachstum zu begrenzen [5]. Darüber hinaus können die spezifischen Ausbeutekoeffizienten der Biomasse mit q_s und μ berechnet werden (**Abb. 2**). Die Analyse von Wachstum und Biomasseausbeute aus Pikoliter-Batch-Reaktoren diene somit zur Komplettierung der nötigen Parameter, um ein biologisch-dynamisches Modell mit präzisen Vorhersagen zu Ausbeutekoeffizienten der jeweiligen Systeme zu entwickeln (**Abb. 1**). Durch die geschickte Kombination dieser Daten lassen sich nun erstmals Massenbilanzen in mikroskaligen Reaktionsräumen aufstellen.

Um unser Konzept zu validieren, fokussierte sich unsere Studie auf ein gut untersuchtes biologisches System mit großer Bedeutung für biotechnologische Anwendungen. Die Analyse von *Escherichia coli*-MG1665 Zellen als Biokatalysatoren, die ausschließlich mit Glucose als C-Quelle kultiviert wurden, lieferte erstmals eine geschlossene, mikroskalige Massenbilanzierung, die als Grundlage für ein auf Einzelzell-



▲ **Abb. 2:** Kombierter Workflow zur Erfassung der erforderlichen mikroskaligen Parameter der Einzelzellanalyse. Die linke Spalte gibt die Zielparameter an, während die mittlere Spalte mikrofluidischen Kultivierungsmethoden und die entsprechende Analytik beschreibt. Die mathematischen Ausdrücke der rechten Spalte korrespondieren mit den einzelnen Arbeitsschritten und den gewonnenen Parametern.

daten basierendem Bioprozessmodell diene. Erkenntnisse aus klassischen Populationsansätzen mit Durchschnittswerten können nun mit diesem Novum ergänzt werden und eröffnen neue Anwendungen zur Systembeschreibung für ein umfassendes Spektrum an Produkten und Organismen (**Abb. 1**). Mit kontinuierlichem Balancing, konkret preformulierten und anschließend implementierten Postparametern ist dieses Modell in der Lage, ein reales Populationsverhalten vorherzusagen und Produkteffizienzen von noch nie zuvor erreichter Genauigkeit zu liefern.

Final ist zu unterstreichen, dass die Studie kontinuierlich weiterentwickelt wird. Sowohl das axenische *E.coli*-Basismodell sowie diverse Ko-Kultursysteme wurden analog untersucht und mit massenspektroskopischen Messergebnissen, wie durch Schirmer 2020 [6] gezeigt, ergänzt. Diese wurden ins Modell implementiert, um Modellvoraussagen und reale Messdaten zur Ausbeutekoeffizienz vorherzusagen und noch weiter zu präzisieren. Die Effizienz und Kinetik der Produktbildung sind die wichtigsten Leistungsparameter in Bioprozessen. Die stetige Maximierung der spezifischen Produktbildungsrate r_p eines Biokatalysators ist das zentrale Ziel im Bereich der biotechnologischen Verfahrenstechnik.

Literatur

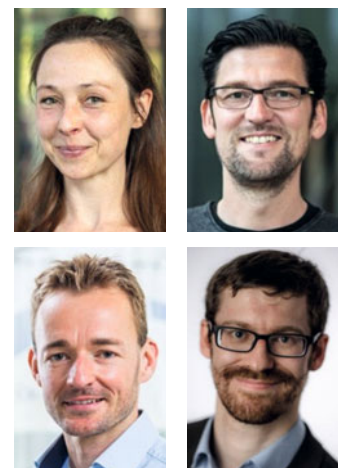
- [1] Smaluch K, Wollenhaupt B, Steinhoff H et al. (2023) Assessing the growth kinetics and stoichiometry of *Escherichia coli* at the single-cell level. *Eng Life Sci* 23: e2100157
- [2] Lee S, Mattanovich D, Villaverde A (2012) Systems metabolic engineering, industrial biotechnology and microbial cell factories. *Microb Cell Fact* 11: 156
- [3] Dusny C, Grünberger A (2020) Microfluidic single-cell analysis in biotechnology: from monitoring towards understanding. *Curr Opin Biotechnol* 63: 26–33
- [4] Dusny C (2022) Microfluidic Single-Cell Analytics. In: Bahnemann J, Grünberger A (Hrsg.) *Microfluidics in*

Biotechnology. Springer International Publishing, Basel, 159–189

[5] Ackermann M (2015) A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 13: 497–508

[6] Schirmer M, Wink K, Ohla S et al. (2020) Conversion Efficiencies of a Few Living Microbial Cells Detected at a High Throughput by Droplet-Based ESI-MS. *Anal Chem* 92: 10700–10708

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>.



Katharina Smaluch, Christian Dusny, Dietrich Kohlheyer und Alexander Grünberger (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. Christian Dusny
Department Solare Materialien (SOMA)
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ,
Leipzig
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
christian.dusny@ufz.de