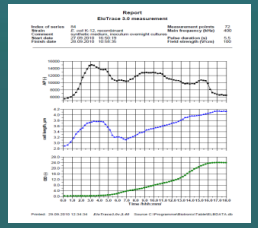
EloSystems
Products for Biotechnology

Neues Mess-System „µCheck“ zur kontinuierlichen Echtzeit-Erfassung der Größe und Konzentration von Bakterienzellen

Ein smartes Tool zur vielseitigen Charakterisierung bakterieller Bioprozesse – Anwendungsbereiche, Potenziale und Grenzen

Alexander Angersbach, Dr.
EloSystems GbR

Berlin, 19.04.2023

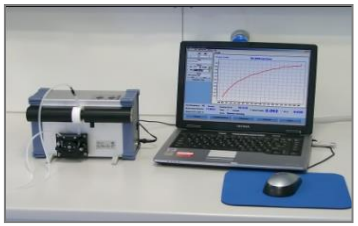


Products of EloSystems, Berlin

Multiparametric monitoring and control of bacterial bioprocess

EloCheck

On-line Photometer for continuous recording of growth of cell suspension cultures



EloFerm

Single- and multi-channel fermentation units with biomass control

EloTrace

INNOVATIONSPREIS BERLIN/BRANDENBURG 2005 PREISTRÄGER

Automated electro-optical analysis of bacterial cells

Wichtige Referenzen von EloSystems

Schwerpunkt: Parallele Mehrkanal-Kultivierung im Labormaßstab

Leibniz-Institut für Agrartechnik und Bioökonomie e.V. (ATB)
(Biomasse, Milchsäure, Laborfermenter) x 10 units

Nestlé Research Center, Lausanne (probiotic *L. rhamnosus* GG) x 4 units

Pasteur Institut de Lille, France (pathogene Organismen, Vakzine) x 4 units

Biocodex, France (bacterial pharmaceuticals / anaerobic) x 4 units

Medizinische Hochschule Hannover (pathogene Streptokokken) x 4 units

Neues Mess-System „µCheck“ zur kontinuierlichen Echtzeit-Erfassung der Größe und Konzentration von Bakterienzellen

Die Bezeichnung **µ** steht für **µm**, ein Maß für die Größe, Länge der Bakterienzellen.

Das **µCheck**-System ist für das Online-Monitoring von

- Zellgröße, -Länge
- Zellkonzentration
- Biomasse (OD)

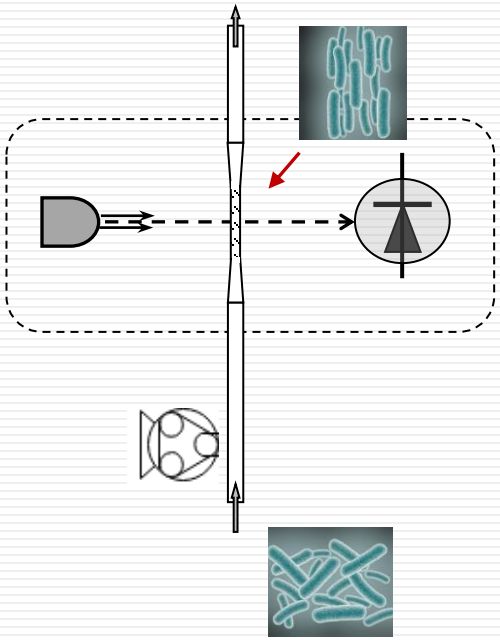
während des Wachstums von Bakterien in Suspensionskultur konzipiert.

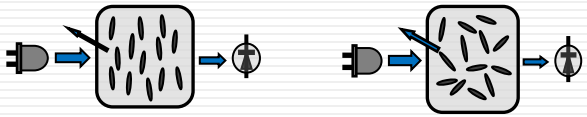
Die kontinuierliche Analyse mit **µCheck** kann für alle Arten von Kultivierungsmethoden (anaerob, aerob, Batch, Fed-Batch) verwendet werden.

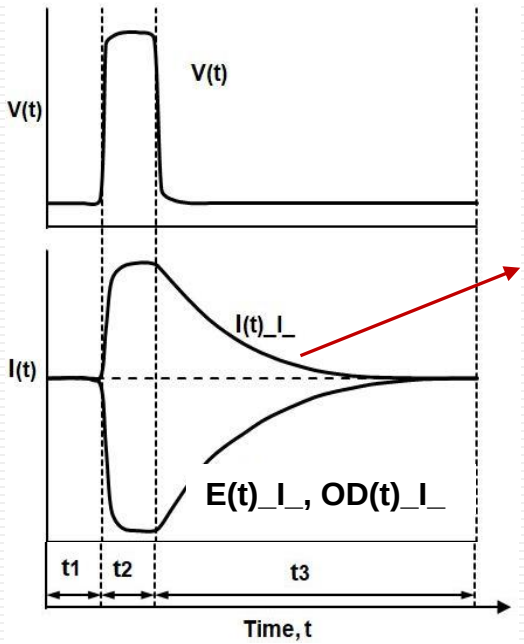
- Messung direkt im Wachstumsmedium ohne Verdünnung oder Zugabe von Reagenzien
- Erfassungsbereich für die Länge von Zellen, Zellketten: 0,8 - 40 µm
- Arbeitsbereich für die OD einer Zellsuspension: 0,2 - 40,0.

Für OD-Bereiche > 40 wird die Version **µCheck-D** empfohlen.

Hydrodynamisch-optische Methode zur Charakterisierung der Größe von formanisotropen Partikeln in Suspensionen.







Partikelgröße

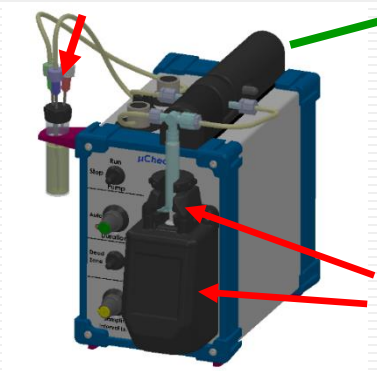
Die Methode basiert auf der optischen Messung der Desorientierung der hydrodynamisch vororientierter Zellen. Die Desorientierung, auch Relaxation genannt, wird durch die Brownsche Bewegung der Zellen in der Trägerflüssigkeit verursacht. Kleinere Partikel orientieren sich schneller, größere langsamer. Die charakteristischen Relaxationszeiten sind proportional zur Partikelgröße und -länge. Die Methode eignet sich besonders für die Analyse und Charakterisierung von Bakterienzellen und -ketten. Weitere Vorteile sind die Messung sowohl hochkonzentrierter als auch stark verdünnter Suspensionen.

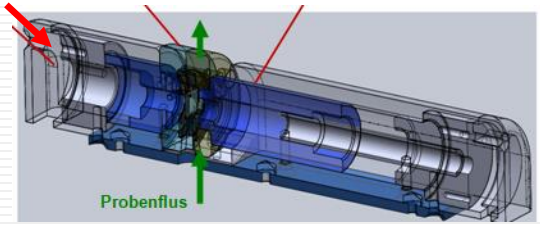
µCheck: Realisierung des Verfahrens

Photodiode

Durchflusszelle

Flexible bypass loop





620 nm (LED)

Optische Messstrecke

Flow-Generator (Spritzenpumpe)

µCheck, Basiseinheit

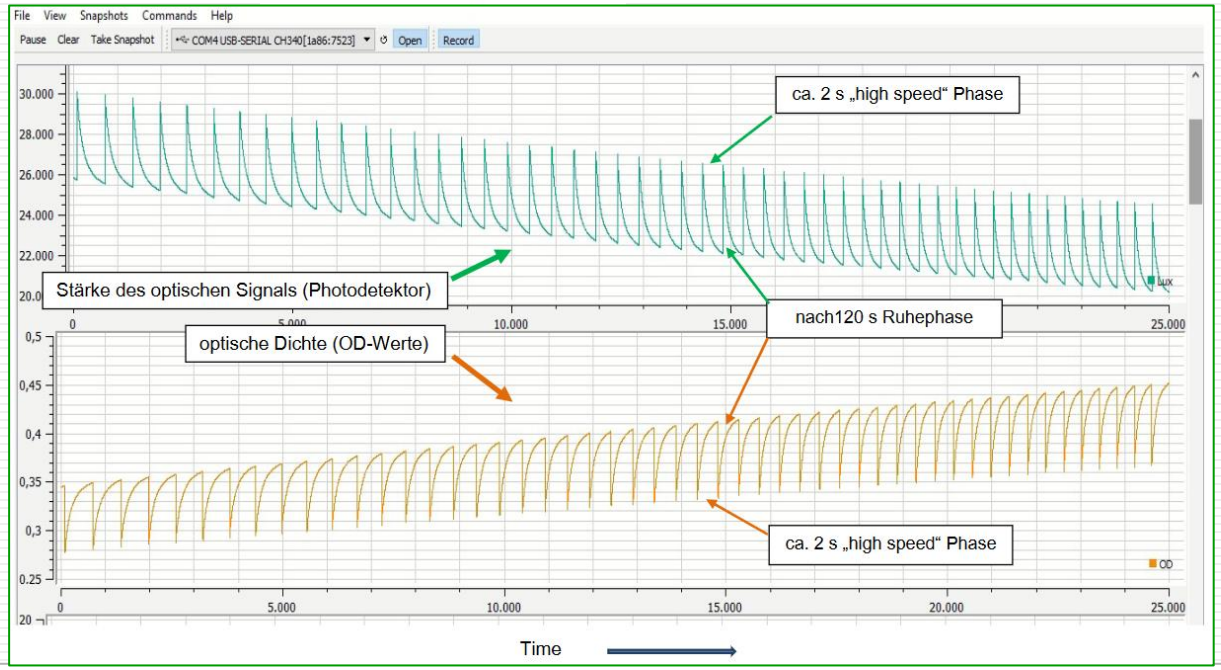
- Eine mikrocontrollerbasierte Steuerung
- Eine PC-gestützte Auswertungs- und Datenmanagement-Software.

Primäre optische Signale

und

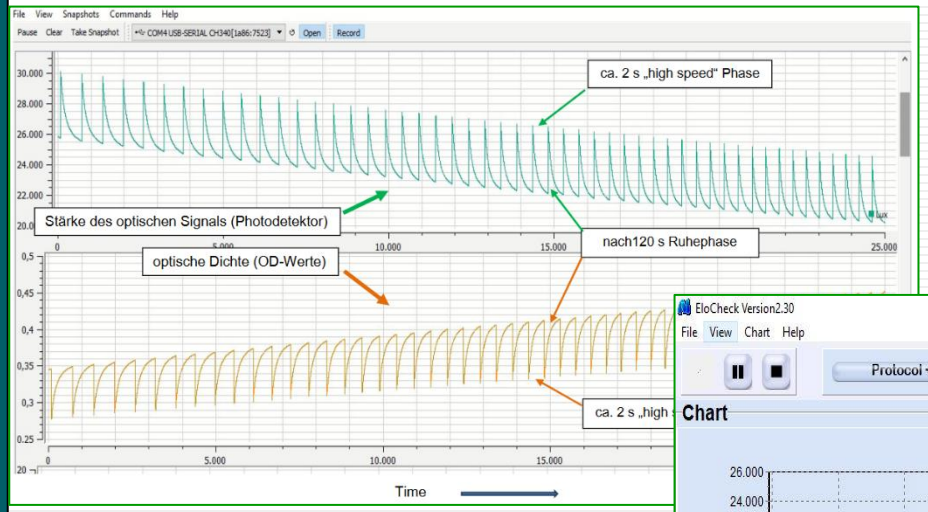
optische Extinktion (OD)

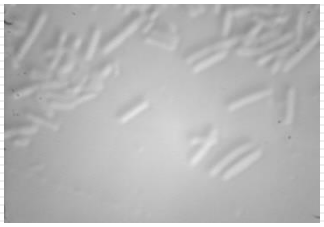
(Beispiel *L. rhamnosus* in 100 % MRS Medium, ohne pH Regelung, T 34°C)



µCheck: Datenanalyse und -visualisierung

Primäre optische Signale und optische Extinktion (OD)





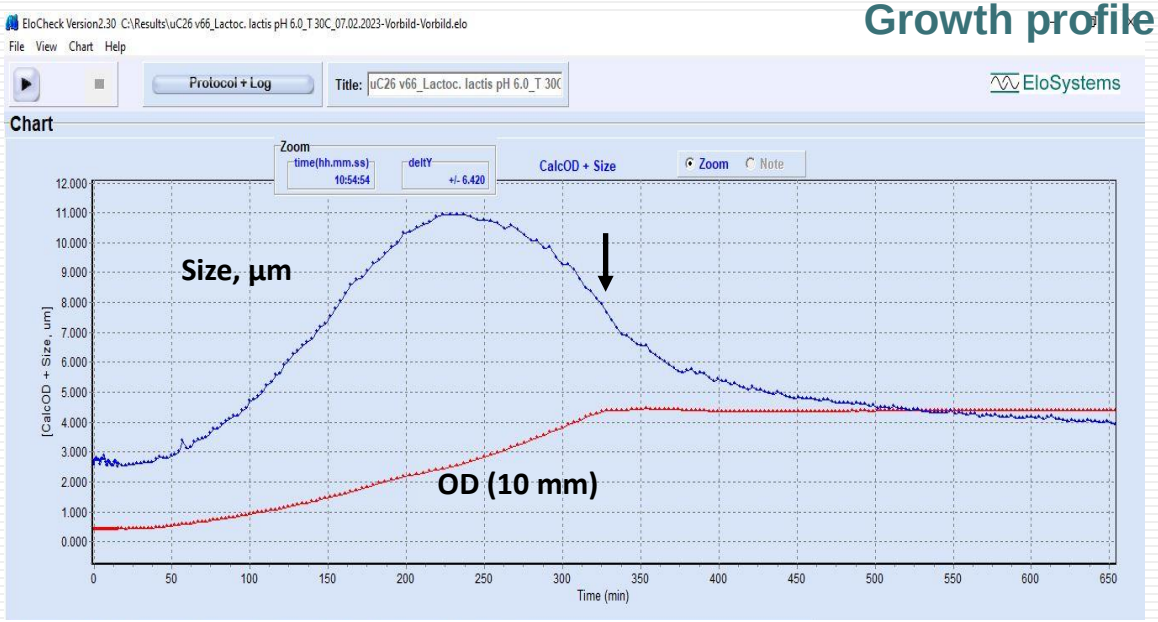
Beispiel *L. rhamnosus* in 100 % MRS Medium, ohne pH Regelung, T 34°C. Volumen 5 mL (26 h)

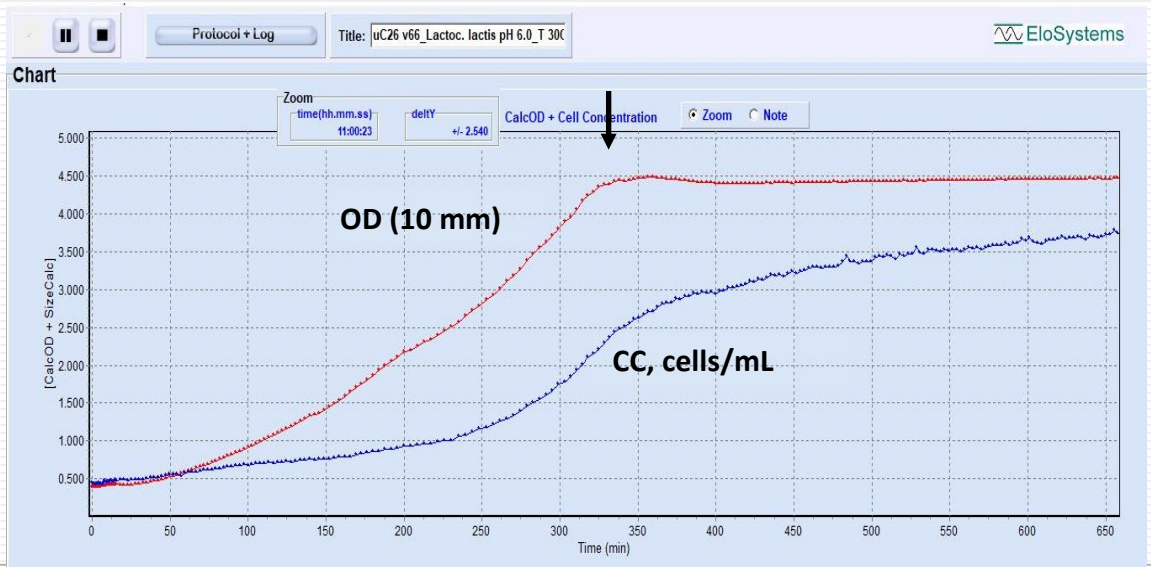
Auswertung:

- Bestimmung der Zeitkonstanten
- Datenbanken, Kalibrierdaten (Referenz: mikroskopische Bildanalyse)
- Berechnung **Size, OD, Cell concentration**
- Datenanzeige im Echtzeit-Modus

Anwendungsbeispiele

Growth profile of *Lactococcus lactis*





Probiotic strain LI-23 (DuPont/Danisco)

Cutivation volume: 15 mL.
Growth conditions: 100% MRS-medium, anaerobic, T=30°C, controlled pH=6.0

Variation of cell, cell chain length:
2.7 µm inoculum, **10.9 µm** max,
3.9 µm at the end of the cultivation.

OD - optical density at 620 nm

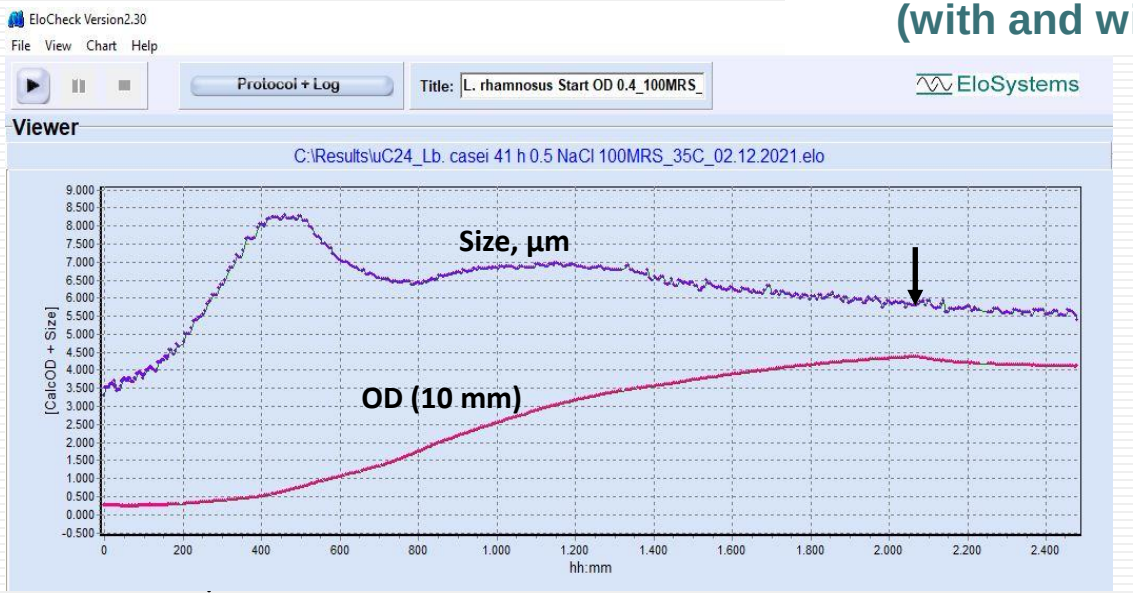
Cell concentration (CC):
0.49*E+09 cells/mL at inoculation;
final concentration: 3.75*E+09 cells/mL

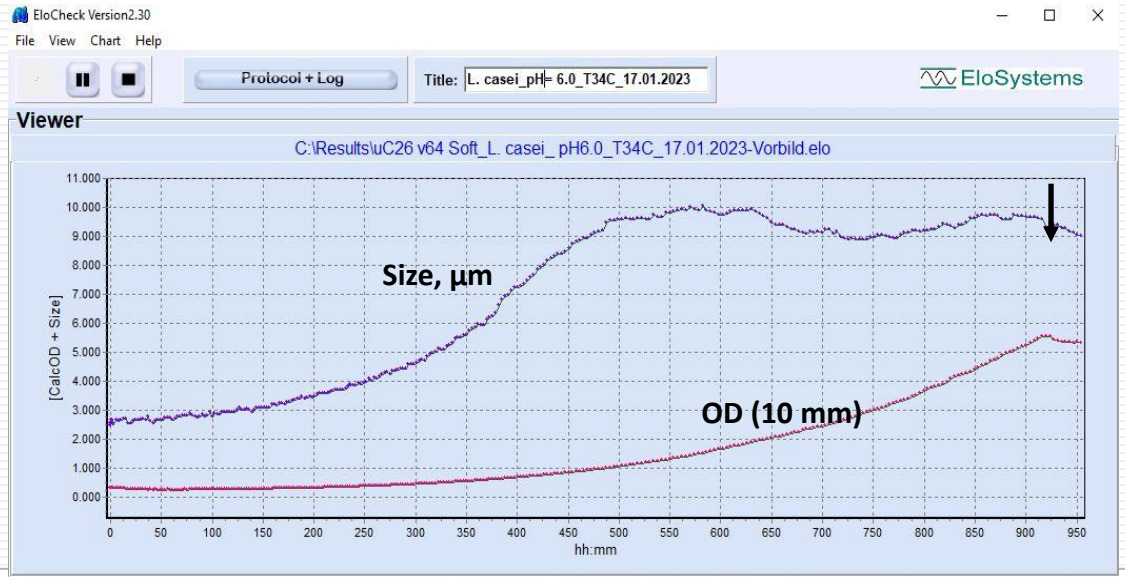
Total cultivation duration: 11 h.
Arrow - time of glucose consumption.

[Device uCheck-26, number of measuring cycles: 220]

Anwendungsbeispiele

Growth profile of *Lactobacillus casei* (with and without pH control)





Probiotic strain Lc-11 (DuPont/Danisco)

Cutivation volume: 5 mL.
Growth conditions: 100% MRS-medium + 0.5 g/L NaCl, anaerobic, T=35°C, final pH=4.1, or pH=6.0 (controlled).

.
Arrow - time of glucose consumption.

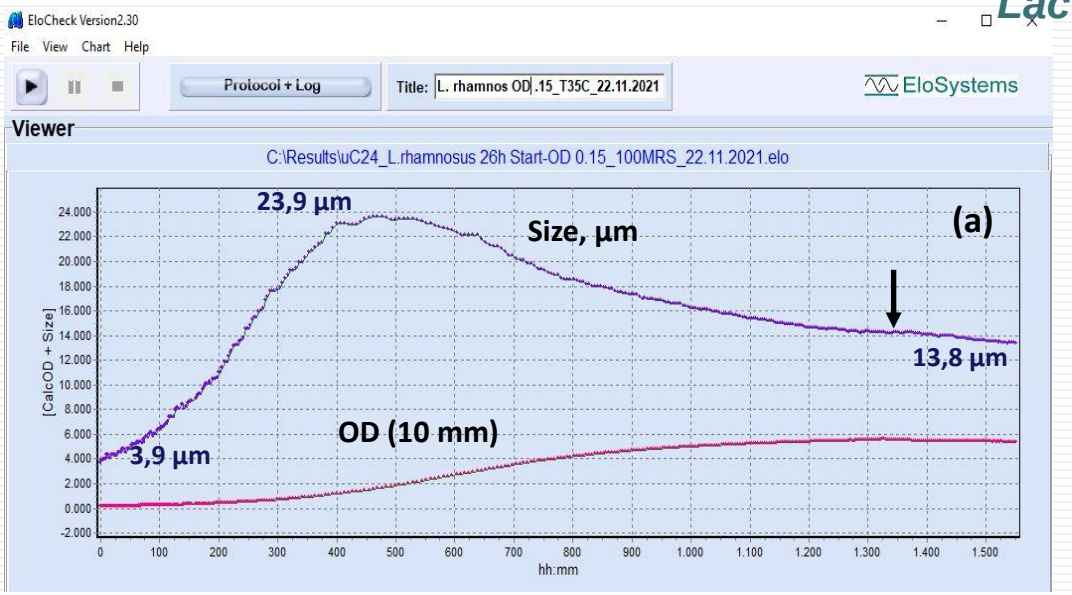
Without pH control: cultivation duration: 40.6 h
[Device uCheck-24, number of measuring cycles: 820]

pH 6.0: total cultivation duration: 16 h.

[Device uCheck-26, number of measuring cycles: 320]

Anwendungsbeispiele

Parallel analysis of the growth of *Lactobacillus rhamnosus*



Probiotic strain GG (DuPont/Danisco)

Various inoculum sizes.
Sample (a) initial OD=0.15.
Sample (b) initial OD=0.46.

Monitoring of two identical vials, cutivation volume: 5 mL. Growth conditions: 100% MRS medium, anaerobic, T= 35°C, without pH control, final pH=4.05 (both samples).

OD - optical density at 620 nm

Variation of cell, cell chain length:
(a) 3.9 µm inoculum, 23.9 µm max, 13.8 µm final;
(b) 3.9 µm inoculum, 14.4 µm max, 9.2 µm final.

Final OD and cell concentration:
(a) OD= 5.8; CC= 1.9*E+09 cells/mL,
(b) OD= 4.9; CC= 2.2*E+09 cells/mL.

Total cultivation duration: approx. 26 h. Arrow - time of glucose consumption.

[Devices uCheck-24 and uCheck-30 running in parallel, number of measuring cycles: 793, both samples]

µCheck: Anwendungsbereiche, Versionen

Anaerobe Prozesse und/oder leichte Begasung:

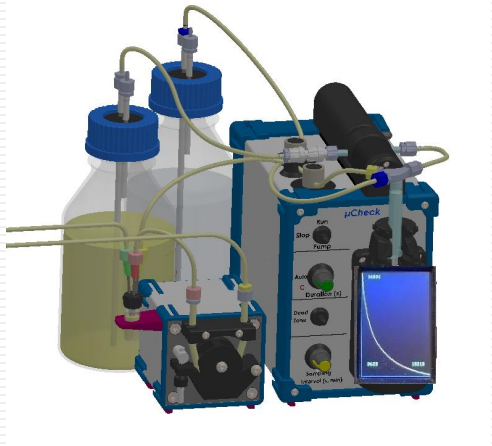
µCheck „classic“

Aerobe Prozesse:

µCheck „classic“ mit Bypass-Modul

Hochzell- Dichte-Kultivierung:

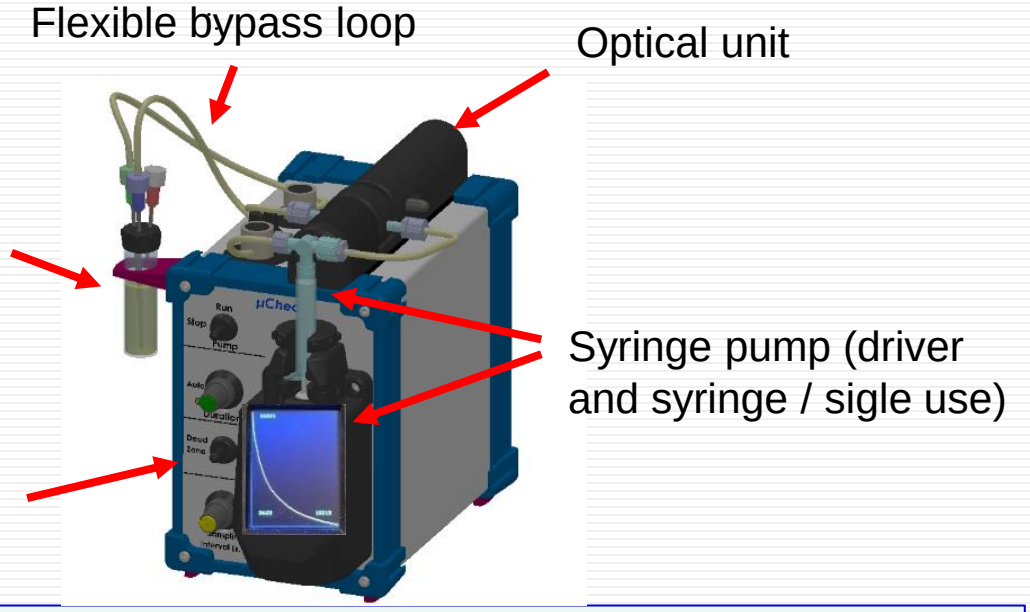
µCheck-D



µCheck: Anwendungsbereiche, Versionen

Anaerobe Prozesse oder leichte Begasung

µCheck „classic“



- Detection range of cell (cell chains) length: 0.8 – 40 µm
- Range of operation for the OD of a cell suspension: 0.2 - 40.0 (lower OD ranges available on request, for OD ranges > 40 the µCheck-D system is recommended)
- Minimum suspension volume: 4 mL (lower volumes on request). Maximum volume: > m³
- Minimum recommended cell concentration: 0.2 x 109 cells/mL (version for lower concentrations on request)

A special design of the sample lines, connections and optical device ensures a sterile connection to the cultivation volume and contamination-free operation. At the end of the bioprocess, the bypass line is easy to decontaminate and dispose properly.

µCheck: Anwendungsbereiche, Versionen

Kultivierungen mit starker Begasung

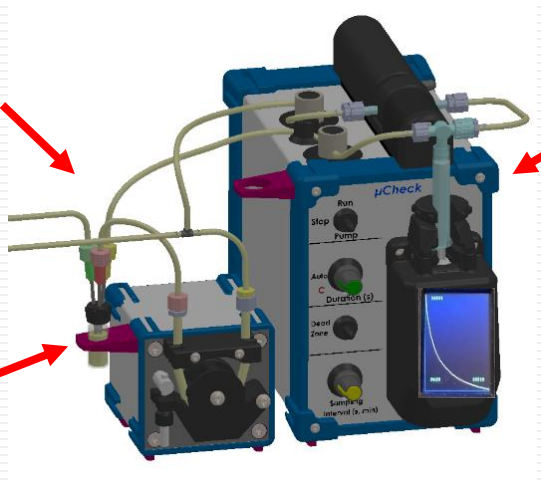
µCheck „classic“ mit Bypass-Modul / Gasblasenabscheider

Bypass-Modul

µCheck „classic“

Zellhaltige Suspension
+ Gasblasen

Separation unit



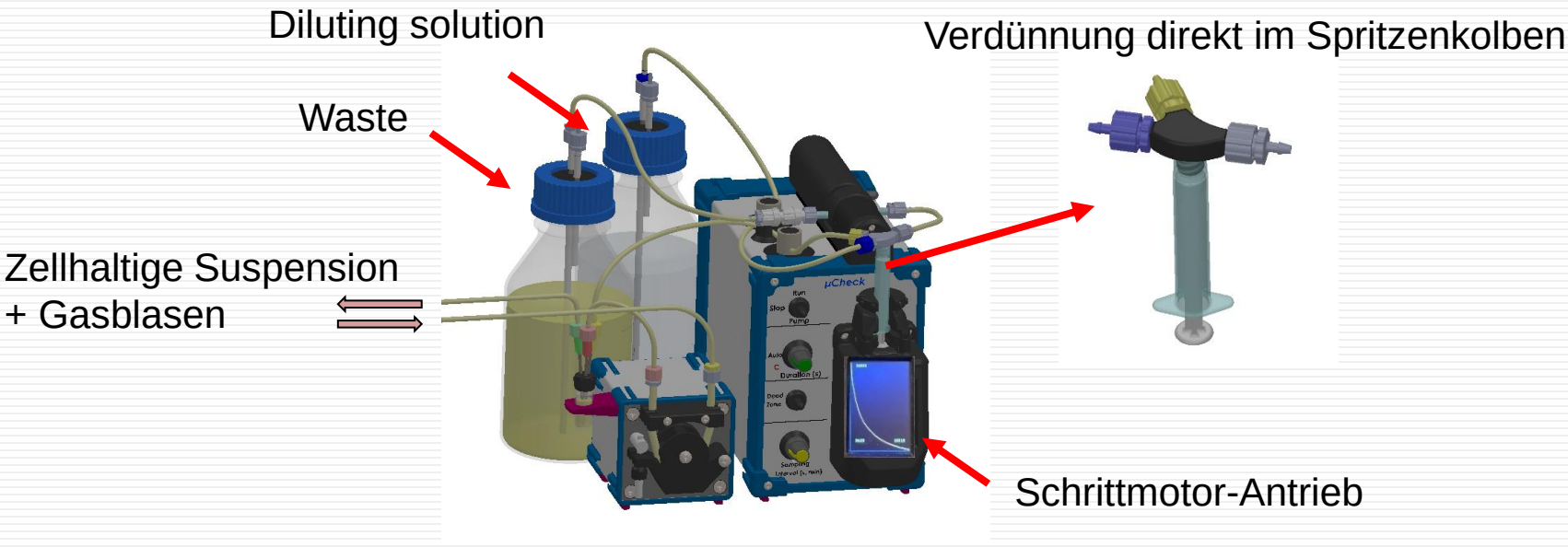
Bypass module is used to remove bubbles from the fermentation solution. Can also be used for feeding fresh samples if the distance between bioreactor and uCheck is long.

- Stand-alone unit for operation with a µCheck system
- Sterile connectors and sample lines, easy handling
- Includes compact peristaltic pump with adjustable flow rate (3 - 20 mL/min)
- Separation unit: glass vial with manifold head, retention volume 1.5 or 3.0 mL

µCheck: Anwendungsbereiche, Versionen

Speziell für Hochzell- Dichte-Kultivierung (OD bis 300)

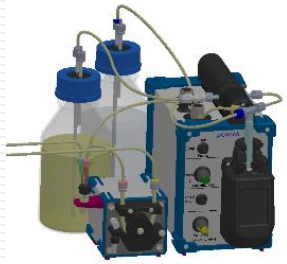
µCheck-D: Version mit automatischer Verdünnung



- Sample dilution factor > 4.5 (adjustable)
- Automatic dilution directly in the syringe plunger, no special mixing camera required
- High dilution reproducibility
- Automated sampling, aseptic mode of operation
- Recommended starting OD for operation in dilution mode: approx. 1.0
- Minimum sample volume used per measurement: 0.3 mL
- Sampling interval freely selectable

µCheck: Anwendungsbereiche, Systemkonfigurationen

Systemkonfigurationen für verschiedene Kultivierungsmethoden



Features	Device configuration		
	µCheck classic	µCheck classic & bypass module*	µCheck-D & bypass module*
Cultivation methods	anaerobic & low gassing	aerobic	high cell density cultivation
OD range (suspension)	0.2 – 40	0.2 – 40	0.2 - > 300
Continuous, real-time measurement	✓	✓	✓
Sampling free	✓	✓	No (sample usage 0.3 mL per measurement)
Online & Offline mode	✓	✓	automatic offline operation
Aseptic processing design	✓	✓	✓
Minimum suspension volume required for measurement	4 mL	8 mL	40 mL**
Dimensions (required desktop area, WxD)	120 x 230 mm	240 x 230 mm	340 x 230 mm***

* - bubble separator function; ** - for biomass concentration of OD 1.0 and higher; *** - flexible positioning of dilution and waste bottles

µCheck: Validierung

Zur Validierung und routinemäßigen Überprüfung des Messsystems sind Referenzproben von Bakterienkulturen erhältlich

Vorgeprüfte, lagerstabile Starter- oder Schutzkulturen von industriellen Herstellern DuPont/Danisco und Chr. Hansen. Zelllängen, -größen von ca. 2,0 µm bis 6,0 µm.

Single strains	Cell size/length	Manufacturer	Concentration, CFU/g*
Brevibacterium linens	1,9 - 2,4 µm	Danisco	250 x 10^9
***Lactococcus lactis* (LL23)**	2,2 - 2,8 µm	DuPont	300 x 10^9
***Lactobacillus casei* (LC11)**	2,8 - 3,4 µm	DuPont	300 x 10^9
***Streptococcus thermophilus* (St-21)**	3,1 - 3,8 µm	Danisco	400 x 10^9
Streptococcus thermophilus	3,4 – 4,2 µm	Chr. Hansen	400 x 10^9
***Lactobacillus rhamnosus* (GG)**	3,6 – 4,6 µm	Danisco	350 x 10^9
Lactobacillus helveticus	4,8 - 6,0 µm	Danisco	250 x 10^9

*- Concentrates, according to the manufacturer's specifications

Package size: 2 – 8 g, can be used in portions for multiple test runs

Eignung als Referenzproben (unsere Erfahrung)

- Industrielle Starterkulturen - ja
- Probiotische Bakterien als Nahrungsergänzungsmittel - bedingt
- Probiotische Drinks oder Joghurts (Yakult, Actimel & Co.) - nein

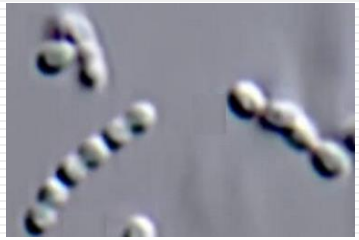
Zusammenfassung

- Neue Messmethode zur kontinuierlichen Analyse von formanisotropen Partikeln im µm-Bereich.
- Die neue Methode eignet sich zur Messung von Bakterienkulturen während des Bioprozesses.
- Die Methode und das µCheck-System liefern stabile und reproduzierbare Messergebnisse.

  - Detektionsbereich für Zelllänge, Zellketten: 0,8 - 40 µm

  - Messung direkt im Wachstumsmedium ohne Probennahme (OD-Bereich 0,2 - 40)

  - Für Hochzell- Dichte-Kultivierung (OD-Bereiche > 40) wird die Version µCheck-D empfohlen.



- Durch einfachen Aufbau und Bedienung besonders für Routineanwendungen im Labor- und Pilotmaßstab geeignet
- Durch Minifluidik geeignet für Prozesse ab kleinem Maßstab (ab 4 mL aufwärts).
- Besonders geeignet für den Einsatz in parallelen Prozessen.

<u>Im Sinne der PAT (bakterielle Bioprozesse)</u>

Im Sinne der PAT (Process Analytics Technology) ist damit eine geeignete Messtechnik für die Qualitätsüberwachung von Bakterienkulturen direkt im Bioprozess verfügbar. Ergänzend zu etablierten Prozessgrößen wie Temperatur, pH, pO2 u. a. liefert das smarte µCheck-System in Echtzeit Informationen über Veränderungen der morphologischen Eigenschaften, Zellkonzentrationen und Biomasse.

Besseres Verständnis der Prozesse / Gezielte Prozessführung / Vielseitige Dokumentation