



Kultivierung von Sonnenblumen-Zellen im Schüttelkolben mit Monitoring-System

Geipel, Katja¹, Haas, Christiane¹, Georgiev, Milen², Ackermann, Jörg-Uwe³, Bley, Thomas¹, Steingroewer, Juliane¹

¹ Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Dresden, Bergstrasse 120, 01069 Dresden, Deutschland

² Stephan Angeloff Institut für Mikrobiologie, Bulgarische Akademie der Wissenschaften, Plovdiv, Bulgarien

³ Professur für Technische Biochemie und Bioverfahrenstechnik, Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, Deutschland

Einleitung:

- oft unzureichende Überwachung der Vorgänge im Schüttelkolben [1], lediglich **offline-Proben**
→ Aufwand, Gefahr für Sterilität, Zeitverzug zwischen tatsächlichem Zustand & ermitteltem Ergebnis
- exaktes **Monitoring** & realistisches **Scale-up** erschwert
→ häufige Folgen: Limitationen oder Kultivierungsabbruch vor Erreichen des Wachstumsmaximums
- Anwendung **miniaturisierter Parallelkultivierungssysteme mit Sensoren** für Mikroorganismenkulturen
→ Einsatz für Kultivierung von Pflanzenzellen bisher nur wenig untersucht



Bild 1: Einjährige Sonnenblume (*Helianthus annuus*)

Zielsetzung:

- Screening von Suspensionen (Kallus) der Sonnenblume (*H. annuus*, Bild 1) zur Medien- & Zelllinienoptimierung im Parallelkultivierungssystem **RAMOS** (Respiration Activity Monitoring System; HiTec Zang GmbH) [1]
- Ziel: optimierte Synthese des pflanzlichen Sekundärmetaboliten **α-Tocopherol** (E-Vitamin) für industrielle Anwendungen z.B. in Kosmetik & Pharmazie
- Handhabung** bei der Überführung von pflanzlichen *in vitro*-Zellkulturen in RAMOS, Aufstellung Setup sowie Interpretation *online*-Daten [3]

Durchführung:

Kallus: totipotente, durch Phytohormon-Wirkung (z.B. Auxin 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, kurz 2,4-D) undifferenzierte Pflanzenzelle [2] (Bild 2)

Pflanzliche Suspensionskultur: in flüssigem Medium kultivierter Kallus (Bild 3)

Kultivierungsparameter:

- 26°C, 110 rpm, dunkel, Sonnenblumen-Suspensionskultur, 20% Inokulum
- Linsmaier&Skoog-Medium → Variation 2,4-D-Konzentration: 0,1 und 0,2 mg/l

RAMOS-Messung: Differenz- & O₂-Partialdruck im Schüttelkolben → *online*-Monitoring [1]



Bild 2: Kallus der Sonnenblume

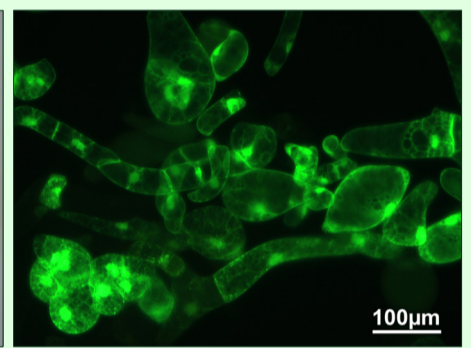


Bild 3: Suspension der Sonnenblume (Fluoreszenz, Lebendfärbung mit FDA)

Pflanzenzellen im Vergleich zu Mikroorganismen:

- hohe Sensitivität pflanzlicher *in vitro*-Kulturen in Bezug auf Wachstum & Metabolitbildung
- starke Agglomeration von Pflanzenzellen in Suspension → schwierige Handhabung z.B. bei Inokulation & Analytik
- geringe Wachstumsgeschwindigkeit → hohes Kontaminationsrisiko; lange Versuchsdauer
- sehr starke Viskositätszunahme während stationärer Phase → Risiko O₂-Limitation

Ergebnisse:

- Anpassung von RAMOS-Parametern (Dauer Spül-/Messzeit)
→ gutes Monitoring mittels OTR/CTR bzw. RQ möglich (Bild 5)
- Einteilung in Wachstumsphasen analog zu Wachstum von Mikroorganismen (Bild 5 oben)
- lange Kultivierung, starke Abhängigkeit der Kulturdauer vom Inokulum (Art, Konzentration, Menge/Volumen)
- Wachstum abhängig von 2,4-D-Konzentration
→ frühere Limitation bei halbiertes Auxinkonz., eingeschränkter Metabolismus
- Wachstum unabhängig vom Arbeitsvolumen (getestet bei 30 bzw. 50 ml und 250 ml Kolbengesamtvolumen)
- Wachstumsphase: Respirationsquotient RQ abnehmend von 1,3 auf 1,2
- stationäre Phase: langsamer RQ-Abfall auf 1,1
→ einsetzende Viskositätserhöhung der Suspension
- Limitation: sprunghafter RQ-Anstieg

Referenzkolben
Messkolben

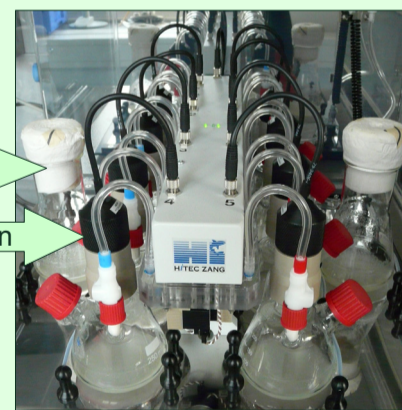


Bild 4: RAMOS (Tablar mit Mess- und Referenzkolben)

Sauerstofftransferrate: $OTR = \frac{\Delta p_{O_2} \cdot V_g}{\Delta t \cdot R \cdot T \cdot V_l} = \left[\frac{mol}{l \cdot h} \right]$

Kohlenstoffdioxidtransferrate: $CTR = \frac{\Delta p_{CO_2} \cdot V_g}{\Delta t \cdot R \cdot T \cdot V_l} = \left[\frac{mol}{l \cdot h} \right]$

Respirationsquotient
und $RQ = \frac{CTR}{OTR}$

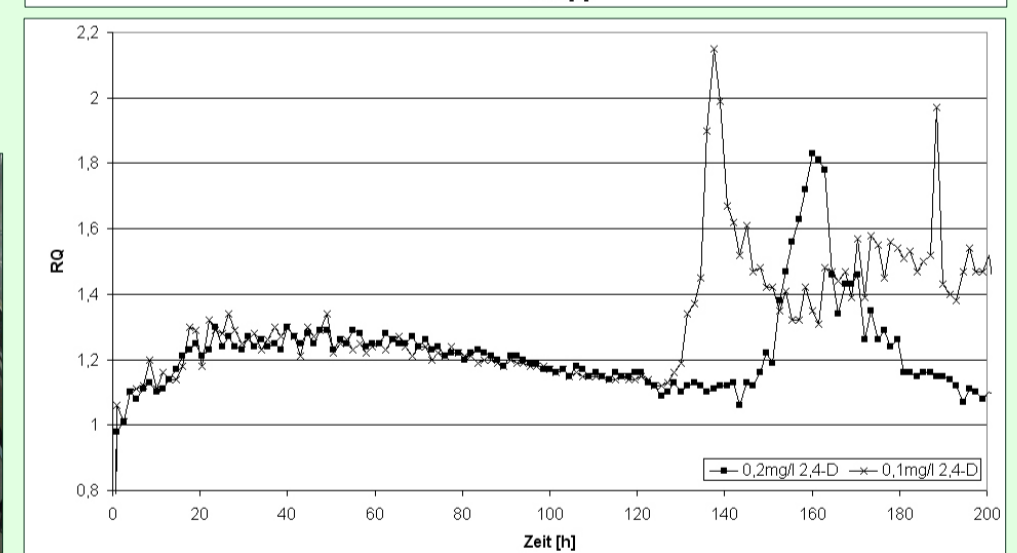
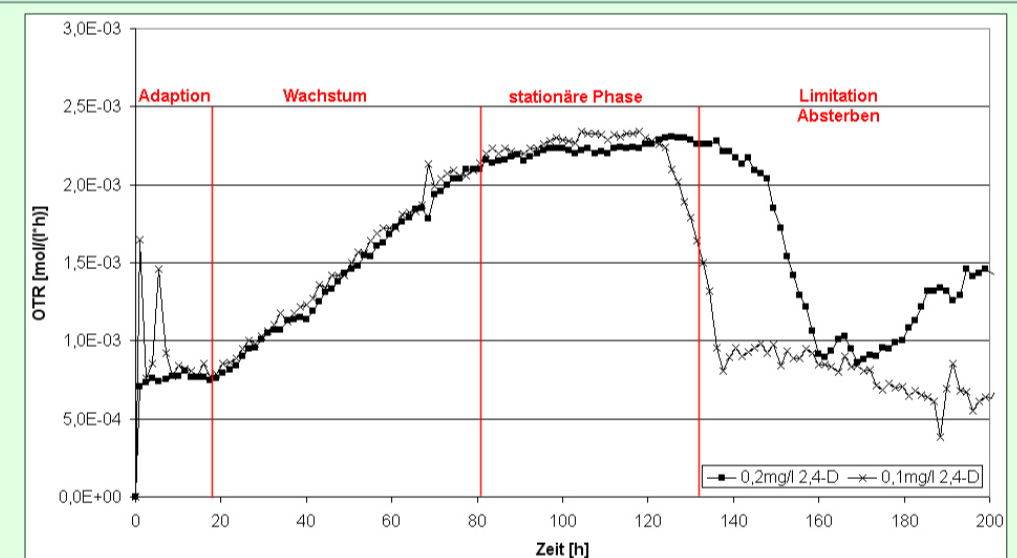


Bild 5: OTR- (oben, mit Wachstumsphasen für *) & RQ-Verläufe (unten) bei Kultivierung einer *H. annuus*-Suspensionskultur im RAMOS mit 0,1 mg/l (x) bzw. 0,2 mg/l (o) 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (26°C, 110 rpm)

Schlussfolgerung:

- Vorteile RAMOS: geringerer Arbeitsaufwand, einfachere Handhabung im Vergleich zu herkömmlichen Kultivierungsstrategien im Miniaturmaßstab sowie der Anzucht & Maßstabsübertragung
- Nachteil: aufwendige Etablierung pflanzlicher Suspensionskulturen sowie Entwicklung RAMOS-Setup
- Ausblick: Transformationsversuche an Kallus und Suspensionen mit *Agrobacterium tumefaciens*

Literatur:

- Anderlei, Büchs: Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks, *Biochem. Eng. J.* 7. 157-162, 2001.
- Haas, Weber, Ludwig-Müller, Deponte, Bley, Georgiev: Flow Cytometry and Phytochemical Analysis of a Sunflower Cell Suspension Culture in a 5-L Bioreactor, *Naturforsch* 63c. 699-705, 2008.
- Pavlov, Werner, Ilieva, Bley: Characteristics of *Helianthus annuus* Plant Cell Culture as a Producer of Immunologically Active Exopolysaccharides, *Eng. Life Sci.* 5. No. 3, 2005.

TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN
Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik

Kontakt:
Dipl.-Ing. Katja Geipel
Tel.: +49 351/4633 9042
Katja.Geipel@TU-Dresden.de

Finanziert aus Mitteln des Europäischen Sozialfonds und des Freistaat Sachsen, Projektnummer 080938406, Projektlaufzeit 01.10.2009 - 30.09.2012

