

MIR Spektroskopie – Eine inline-fähige Methode zur Bestimmung des intrazellulären pH-Werts von Hefekulturen?

*Livius Strachotta*¹, Michael Metzenmacher, Dominik Geier und Thomas Becker
¹Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, TU München, Freising, Deutschland
 Kontakt: livius.strachotta@tum.de

Einleitung

Der Einsatz vitaler und gärfähiger Hefen ist in der Brauindustrie Grundvoraussetzung für eine hohe und gleichmäßige Produktqualität und einen zügigen Gärverlauf. Mehrfach geführte Erntehefen werden durch verschiedenste Stresseffekte während der Gärung und Hefelagerung in ihrer Physiologie negativ beeinflusst. Der Einsatz einer Hefekultur mit zu geringer Vitalität kann zu qualitativen und ökonomischen Nachteilen führen: Erhöhte Diacetylwerte, Filtrationsprobleme und Trübungen, mangelhafte Schaum- und Geschmacksstabilität sowie langsame Gärungen [1]. Zur Quantifizierung der Hefevitalität als Zielgröße eignet sich die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes (ICP) [2]. Denn während der Propagation oder Gärung schleust die Hefe aktiv Protonen gegen einen Gradienten aus der Zelle, um einen hohen pH-Wert im Zytosol aufrechtzuerhalten. Es gibt jedoch keine Methode, mit der die Vitalität der Hefe schnell und ohne langwierige Probenaufbereitung bestimmt werden kann. Damit steht die Vitalität nicht als Informationskriterium zur Verfügung, um das Hefemanagement kontinuierlich zu überwachen und bei Abweichungen rechtzeitig und gezielt eingreifen zu können. Eine vielversprechende Möglichkeit Bioprozesse in Echtzeit zu überwachen, ist der Einsatz von Spektroskopie im nahen und mittleren Infrarot (IR). So konzentrieren sich bereits durchgeführte Forschungsarbeiten auf die Bestimmung einzelner Stoffwechselprodukte, Substrate oder der Biomasse [3-8]. Zudem zeigen Untersuchungen, dass zelluläre Hefebestandteile, die mit der Vitalität der Hefe verknüpft sind (wie Glykogen und Trehalose), mittels Infrarotspektroskopie analysiert werden können [9, 10]. Ein besonderes Potenzial dieses Messansatzes liegt in der

Entwicklung von Vorhersagemodellen, die die Quantifizierung komplexer Parameter wie der Hefevitalität ermöglichen. Durch die synchrone Messung spektraler Eigenschaften verschiedener Stoffgruppen, die mit der Zielgröße in Zusammenhang stehen, sollen Rückschlüsse auf den ICP der untersuchten Hefekultur gezogen werden.

Methoden und Materialien

Vorkultur

Die Versuche wurden mit *Saccharomyces pastorianus* ssp. *carlsbergensis* TUM 34/70 durchgeführt. Die Vorkulturen wurden aus Trockenhefe in mehreren Stufen über 168 h bis zu einem Gesamtvolumen von 1.5 L herangezogen. Als Wachstumsmedium wurde eine ungehopfte Würze aus Malzextrakt mit einem Extraktgehalt von 12.5 °P verwendet.

Propagation

Die Hefepropagation wurde in einem Bioreaktor (Biostat Cplus, Sartorius AG) mit einem Gesamtvolumen von 30 L durchgeführt. Das Füllvolumen betrug 10 L und die Propagation erfolgte bei 24 °C. Die Ausgangszellzahl wurde auf 15 Millionen Zellen/mL eingestellt. Die Online-Prozessdaten des Bioreaktors (Temperatur, pH, pO₂ und Trübung) wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Ebenso wurde jede Minute ein MIR-Spektrum von 2500 - 600 cm⁻¹ mit einer Auflösung von 2 cm⁻¹ aufgenommen (ReactIR 15, Mettler-Toledo, Inc.). Um Hefezellen mit sehr unterschiedlicher Physiologie zu erhalten, wurden die Kulturen verschiedenen Stressoren ausgesetzt. Dazu gehörten die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von H₂O₂ während der Propagation (0.1 Vol.-%; 0.2 Vol.-%), die Zugabe von Ethanol (5 Vol.-%; 10 Vol.-%) sowie die Verwendung eines verdünnten

Wachstumsmediums (2 °P), um einen Nährstoffmangel zu forcieren.

Messung des ICP

Als Referenzmethode zur Bestimmung der Hefevitalität wurde der ICP der Zellen nach Weigert et al. bestimmt [11]. Die erhaltenen Hefeprouben wurden dreimal gewaschen (0 °C, 3000 U/min). Nach Zugabe von 2 µL Carboxy-Fluoresceindiacetat wurde die Probe für 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz von 20000 Events im Durchflusszytometer (CytoFLEX S, Beckman Coulter, Inc.) bei 525 nm (A_{525}) und 585 nm (A_{585}) gemessen. Der ICP jedes Events berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$ICP = \left(\frac{A_{525}}{A_{585}} + 3.2393 \right) \div 1.074$$

Der arithmetische Mittelwert der ICP-Werte ergibt den ICP-Wert der Hefekultur.

Multivariate Datenanalyse

Mit Hilfe des Relieff-Algorithmus wurden die vier wichtigsten Merkmale für die Vorhersage der Zielgröße ausgewählt [12]. Dabei wurden neben den MIR-Spektren auch die Online-Prozessdaten des Bioreaktors mit einbezogen. Die extrahierten Merkmale wurden mittels maschinellen Lernens (Fine Gaussian Support Vector Machine) mit dem ICP korreliert [13]. Als Trainingsdatensatz wurden 80 % der Gesamtdaten verwendet. Die Validierung des Modells erfolgte mit den restlichen 20 % der Gesamtdaten.

Ergebnisse

Durch die gezielte Stressbelastung von Hefekulturen während der Propagation, konnten sehr unterschiedliche ICP-Werte erzielt werden. Wie Abb. 1 zeigt, unterscheiden sich dabei auch die Verteilungen des ICP zwischen den Versuchsreihen deutlich. Auffällig ist, dass der ICP der untersuchten Hefekulturen nicht immer normalverteilt, sondern teilweise auch bimodal verteilt ist. Auch innerhalb einer Propagation waren Schwankungen der ICP-Werte zu beobachten, die

auf den anfänglichen Stress während der Inokulation und die natürlichen Wachstumsphasen einer Hefekultur zurückzuführen sind.

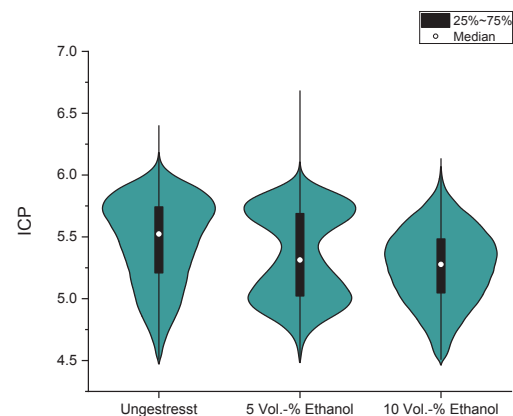


Abb. 1: Violin-Plot der ICP-Verteilung bei Zugabe von Ethanol nach 12h Propagation.

Die MIR-Spektren variierten ebenfalls im Verlauf der Propagation, bspw. bei der induzierten Stressung mit Ethanol (Abb. 2).

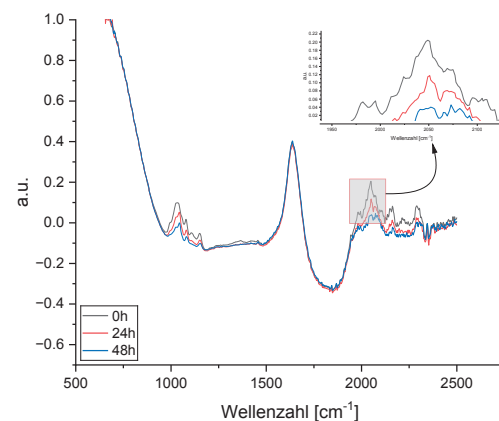


Abb. 2: MIR-Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten während der Propagation von mit Ethanol gestressten Hefen (10 Vol.-%; 0h, 24h, 48h Exposition). Hervorgehoben ist der Bereich zwischen 2000-2100 cm^{-1} .

Die Identifikation geeigneter Merkmale zur Erstellung eines Vorhersagemodells mittels Relief-Algorithmus zeigte, dass bestimmte Wellenzahl-Bereiche stärker gewichtet werden (Abb. 3) und es wurden drei Bereiche ausgewählt. Die jeweils am höchsten gewichtete Wellenzahl in den einzelnen Bereichen wurde für die Modellbildung ausgewählt. Neben drei definierten Wellenzahlen (2325 cm^{-1} , 2090 cm^{-1} , 1650 cm^{-1}) konnte die Temperatur als wichtiges Merkmal

identifiziert werden. Die Wellenzahl 1650 cm^{-1} wurde bereits in Vorversuchen mit einem Offline-MIR-Spektrometer als relevant identifiziert. Das mit Hilfe dieser vier Merkmale erstellte Modell konnte mit den Testdaten erfolgreich validiert werden (siehe Abb. 4; $\text{RMSE} = 0.03$, $R^2 = 0.98$).

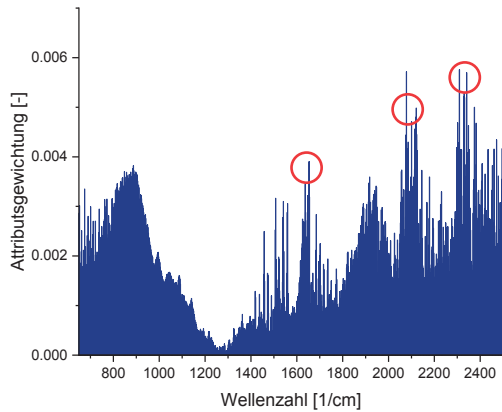


Abb. 3: Darstellung der Attributsgewichtung der MIR-Wellenbereiche mittels Relief-Algorithmus und Markierung der ausgewählten Wellenzahlbereiche.

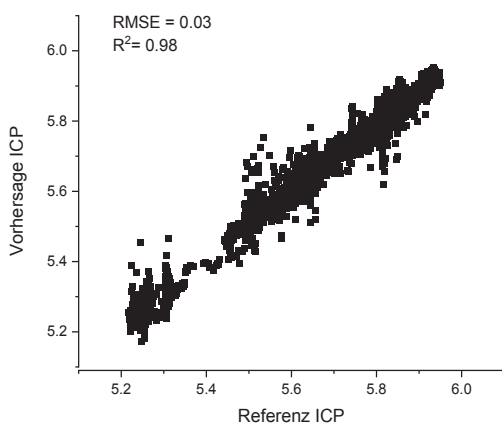


Abb. 4: Vergleich der Referenz-ICP-Werte mit den vorhergesagten ICP-Werten des Testdatensatzes ($\text{RMSE} = 0.03$, $R^2 = 0.98$).

Diskussion

Die Vorhersage des ICP-Werts einer Hefekultur während der Propagation im Bioreaktor ist mit dem erstellten Modell möglich. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um ein von der Temperatur unabhängiges Modell zu erstellen. Weiterhin ist es von Interesse die wichtigen Wellenzahlbereiche genauer zu untersuchen und auf Kausalität zu prüfen. Dazu sind zusätzliche Versuche notwendig, bei denen das Medium detaillierter hinsichtlich Extrakt- und

Alkoholgehaltes sowie Zuckerzusammensetzung untersucht wird. Durch eine präzisere Aufschlüsselung des Propagationsprozesses können die Wechselwirkungen besser erfasst und berücksichtigt werden.

Literatur

1. Back, W., *Mikrobiologie der Lebensmittel, Getränke*. 2008, Hamburg: Behr. XVIII, 393 S.
2. Thiele, F., *Einfluss der Hefevitalität und der Gärparameter auf die Stoffwechselprodukte der Hefe und auf die Geschmacksstabilität*. 2006, Technische Universität München. p. 232.
3. Corro-Herrera, V.A., et al., *Real-time monitoring of ethanol production during Pichia stipitis NRRL Y-7124 alcoholic fermentation using transflection near infrared spectroscopy*. Engineering in Life Sciences, 2018. **18**(9): p. 643-653.
4. Ge, Z., A.G. Cavinato, and J.B. Callis, *Noninvasive Spectroscopy for Monitoring Cell Density in a Fermentation Process*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(8): p. 1354-1362.
5. Kiviharju, K., et al., *On-line biomass measurements in bioreactor cultivations: comparison study of two on-line probes*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2007. **34**(8): p. 561-566.
6. Kornmann, H., et al., *Methodology for real-time, multianalyte monitoring of fermentations using an in-situ mid-infrared sensor*. Biotechnology and Bioengineering, 2003. **82**(6): p. 702-709.
7. Landgrebe, D., et al., *On-line infrared spectroscopy for bioprocess monitoring*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **88**(1): p. 11-22.
8. Mazarevica, G., et al., *On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2004. **58**(7): p. 804-810.
9. Moonsamy, N., et al., *RAPID YEAST TREHALOSE MEASUREMENT USING NEAR-IR REFLECTANCE SPECTROMETRY*. Journal of the Institute of Brewing, 1995. **101**(3): p. 203-206.
10. Skinner, K.E., *Estimation of Yeast Glycogen Content from the Mid-Infrared Spectra of Yeast*. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1996. **54**(2): p. 71-75.
11. Weigert, C., et al., *Application of a Short Intracellular pH Method to Flow Cytometry for Determining Saccharomyces cerevisiae Vitality*. Applied and environmental microbiology, 2009. **75**: p. 5615-20.
12. Kononenko, I., E. Šimec, and M. Robnik-Šikonja, *Overcoming the Myopia of Inductive Learning Algorithms with RELIEFF*. Applied Intelligence, 1997. **7**(1): p. 39-55.
13. Schölkopf, B. and A.J. Smola, *Learning with Kernels: Support Vector Machines, Regularization, Optimization, and Beyond*. 2001: The MIT Press.

Danksagung

Das IGF-Vorhaben 01IF22652N der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. (Wifö) wird im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.