



Vorhabenbezeichnung (*BioChancePlus-3*)

***Entwicklung und Produktion neuartiger Biopharmazeutika im
Moos***

Förderkennzeichen: 0313852B

Laufzeit des Vorhabens: 01.09.2006 bis 31.05.2009

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0313852B gefördert.

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Institut für Bio- und Lebensmitteltechnik
Bereich III: Bioverfahrenstechnik
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Straße am Forum 8
76131 Karlsruhe

Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten
Dipl.-Ing. Martin Cerff

1. Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

a) Technologietransfer an greenovation zur Unterstützung der Etablierung des 100 L Photobioreaktors

Das Moos *Physcomitrella patens* eignet sich trotz seiner Eigenschaft, eine Landpflanze zu sein, hervorragend für die submerse Kultivierung in geschlossenen Photobioreaktoren (Decker 2004; Decker 2008). Die produzierten und ins Medium ausgeschleusten, rekombinanten Proteine wie z.B. rekombinantes Erythropoietin liegen jedoch in sehr niedrigen Titern vor, so dass für die Gewinnung dieser Proteine in ausreichenden Mengen große Reaktionsvolumina benötigt werden. Damit wird ein skalierbarer Reaktor benötigt, der alle Anforderungen an einen Photobioreaktor, wie z.B. geringe Schichtdicken für kurze Lichtwege aufweist. Ein an der Universität Karlsruhe entwickelter und gebauter 30 L-Rohrreaktor hat sich bestens zur submersen Kultivierung von *Physcomitrella patens* erwiesen (Perner-Nochta 2007) und wurde im Rahmen dieses Projektes als 100 L-Reaktor (4x25 L-Module) bei greenovation installiert. Die Aufgabe seitens der Universität Karlsruhe bestand darin, die verschiedenen Reaktorkomponenten für den in der Größe erweiterten Reaktor auszuwählen und auszulegen. Zu diesen Komponenten zählen der Dampfgenerator, die Zerkleinerungseinrichtung, die pH-Regelung, das Pumpensystem und die Be- und Entgaserstation. Alle Anforderungen an diese Komponenten wurden in einer URS (user requirement specification) beschrieben, die Teil der Ausschreibung an den Hersteller des Reaktors war.

Die Trennung des Wertstoffstromes von den Zellen kann generell mit Hilfe einer Perfusionseinheit durchgeführt werden. Bei der Abtrennung erwiesen sich die Hohlfasermodule mit 1 µm Porendurchmesser, geringer Durchströmung und geringem Transmembrandruck als grundsätzlich geeignet. Für eine verbesserte Performance wurden Recherchen für andere Module bzw. Verfahren durchgeführt. Zusammen mit einer Vorfiltration ergeben sich die für den Produktionsbetrieb erforderlichen hohen Standzeiten. Eine Alternative zu stationären Membranen stellen Spin-Filter dar, die bei greenovation für den Einsatz im Rohrreaktor (bypass) und an der Universität Karlsruhe für den Einsatz im 3 L-Umwurfreaktor (in situ) getestet wurden (siehe h).

Des Weiteren wurde für Durchführung der Pilotversuche zur Mooszerkleinerung die erforderliche Menge an Biomasse im 30L-Reaktor in Karlsruhe produziert und bereitgestellt.

Entwicklung neuer LED-Lichtquellen

Für die Kultivierung der Moose unter homogenen und hochgeregelten Bedingungen wurde für einen 3L-Photobioreaktor (Csogor 1999) eine neuartige, aus Hochleistungs-LEDs (SMD-LEDs; SMD=surface mounted device) bestehende Beleuchtungseinrichtung entwickelt und realisiert (Abbildung 1). Im Gegensatz zur Verwendung einer Kombination aus herkömmlicher Lichtquelle (Halogenlampe) und Spektralfilter ermöglichte das neue LED-Konzept die Realisierung deutlich höherer Photonenflussdichten. Die Beleuchtungseinrichtung für den Umwurfreaktor besteht aus zwei halbkreisförmig gebogenen Leiterplatten, die beidseitig mit SMD-LEDs bestückt sind. Die beiden Halbschalen sind im Innern des aus zwei konzentrischen Glasrohren bestehenden Flüssigkeits-Leitrohres des Umwurfreaktors eingebaut. Da die beiden Seiten der Leiterplatten getrennt geregelt werden können, kann trotz unterschiedlicher Lichtweglängen zwischen Innen- und Außenseite des Leitrohres eine nahezu homogene Lichtverteilung im gesamten Reaktor realisiert werden mit einer maximalen Photonenflussdichte (PFD) von $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Um Voruntersuchungen bezüglich der Auswirkung unterschiedlicher Lichtqualitäten auf das Mooswachstum und Pigmentbildung zeiteffektiv durchführen zu können, wurden zusätzlich parallelisierte, LED-basierte Beleuchtungseinrichtungen für Schüttelkolben entwickelt. Durch den Einsatz unterschiedlich farbiger LEDs (weiß, rot, blau) konnten Kultivierungen in genau definierten,

eng begrenzten Spektralbereichen durchgeführt werden. Die roten LED's emittieren dabei Licht mit Wellenlängen zwischen $\lambda=600-670$ nm, die blauen im Bereich von $\lambda=430-530$ nm und die weißen im Bereich von $\lambda=430-800$ nm. Durch die Möglichkeit des homogenen, regelbaren Lichteintrages über die Unterseite der Schüttelkolben und die Verwendung des gleichen LED-Typs, sind die Ergebnisse bezüglich des Lichteintrages gut auf die Kultivierungen im 3L-Reaktor übertragbar. Zur Charakterisierung aller neuen LED-Beleuchtungseinrichtungen wurden PFD-Profile gemessen (Abbildung 1). Nachfolgende kinetische Untersuchungen (siehe Teil d) und e)) haben bestätigt, dass beide Beleuchtungssysteme bestens für die submersive Kultivierung von *Physcomitrella patens* geeignet sind. Beide Systeme wiesen zudem ausreichende thermische und mechanische Beständigkeit auf.

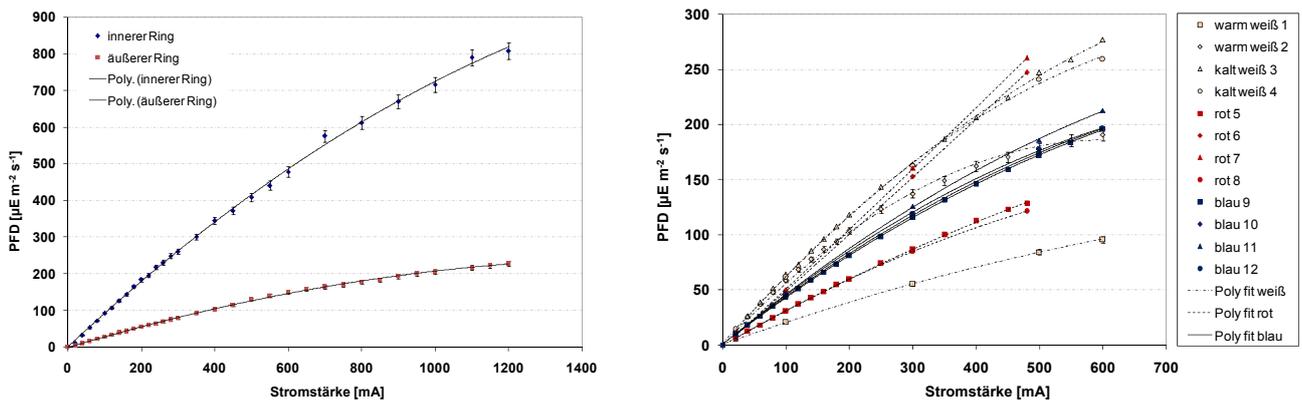


Abbildung 1: Neuentwickelte LED-Beleuchtungseinrichtungen für Umwurfreaktor (links) und Schüttelkolben (rechts) mit entsprechenden Leistungscharakteristika

b) Untersuchungen zur Zellmorphologie und -differenzierung unter dem Einfluss von monochromatischem Licht in Schüttelkolben und im 3 L-Umwurfreaktor

Ziel dieser Untersuchungen war es, den Einfluss der Wellenlänge des emittierten Lichts bei konstanter Photonenflussdichte auf die Zellmorphologie zu untersuchen. Unter „Zellmorphologie“ wird hier der Verzweigungsgrad im Verhältnis zum apikalen Wachstum gesehen, d.h. es wurden nur einzelne Filamente betrachtet. Weiterhin hatte die Art der Strömung im Kulturgefäß einen großen Einfluss auf die Makromorphologie, d.h. die räumliche Anordnung der Filamente unter bestimmten Mischzuständen wie z.B. Rühren oder Schütteln (siehe d) und e)). Uenaka et al. haben für einzelne, mit einem hoch fokussierten Lichtstrahl beleuchtete Moosfilamente gezeigt, dass eine Mindestphotonenflussdichte von $6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und eine Mindestbeleuchtungsdauer von 3 h vonnöten sind, um sogenanntes „sidebranching“ zu induzieren (Uenaka 2005). Dabei liegt der Verzweigungsgrad bei weißem Licht am höchsten, bei blauem Licht etwas niedriger und bei rotem Licht deutlich unter den Werten von weißem Licht. Werden die Zellen hingegen konzentriert mit rotem und blauem Licht bestrahlt, nimmt der Verzweigungsgrad deutlich zu. Diese Ergebnisse wurden unsererseits durch Schüttelkolbenexperimente auf LED-Platten bestätigt, jedoch behaftet mit einem hohen Fehler bei der visuellen Auszählung (Abbildung 2, rechts). Erstmals wurden Untersuchungen nicht nur an einzelnen Filamenten, sondern an einer Gesamtheit an Zellen unter

Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Demnach zeigten Zellen, die mit rotem Licht bestrahlt wurden, den niedrigsten Anteil an Verzweigungen pro Filamentlänge. Zellen, die mit weißem Licht oder konzentriert mit rotem und blauem Licht bestrahlt wurden, wiesen das höchste Verhältnis von ca. 0,6 auf. Kolben wurden für 32 d bei einer konstanten PFD (Photonenflussdichte) von $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt bzw. für 7 Tage bei einer konstanten PFD von $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Qualitativ ähnliche Aussagen konnten aus Kultivierungen im 3 L-Umwurfreaktor getroffen werden (Abbildung 2, links): Auch hier lässt sich bei rotem Licht, im Gegensatz zu blauem, ein niedriger Verzweigungsgrad erkennen. Allerdings schwankte die PFD zwischen 3,7 und 13,7. Wurden Zellen mit sehr schwachem, rotem Licht bei einer PFD von $4 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt, neigten einzelne Zellen zu Krüppelwachstum. Die Analyse der Zellmorphologie mittels Image Analysis gestaltete sich als sehr schwierig, da fast immer mehrere Zellfäden auf dem Objektträger übereinander geschichtet waren und deshalb die Auszählung manuell erfolgte.

Licht-qualität	rot, 620-750 nm, PFD 11,97	blau, 400-460nm, PFD 3,36	weiß, 400-750nm, PFD 13,7
Morphologie			
Verzweigungs-grad	niedrig	hoch	sehr hoch
Apikal-wachstum	stark	schwach	schwach
Mikroskop. Aufnahmen			
PFD in $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			

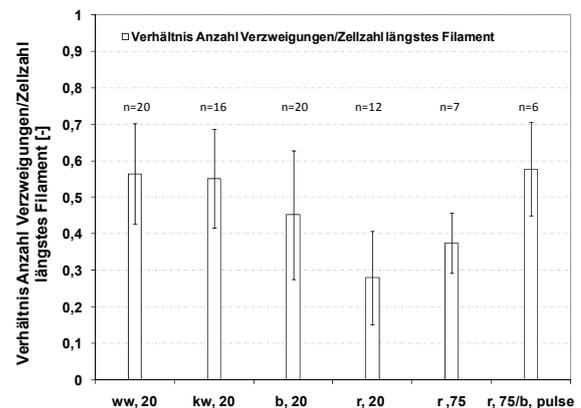


Abbildung 2: links: Daten aus Reaktorkultivierungen mit herkömmlicher Halogenbeleuchtung unter Verwendung eines Bandfilters; rechts: Daten aus Schüttelkolbenkultivierungen unter Verwendung von LED-Platten; Erklärungen: „b 20“: blaues Licht bei einer konstanten Lichtintensität von $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; „b,pulse“: blaues Licht mit einer PFD von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 10 s, sich alle 190 s wiederholend; „n=20“: 20 einzelne Moosfilamente

c) Untersuchung von Wachstums- und Pigmentbildungskinetiken in Schüttelkolben

Wie unter Punkt c) erläutert kann eine Variation der Wellenlänge des Lichts dazu genutzt werden, das Erscheinungsbild von Moosfilamenten, z.B. den Verzweigungsgrad, gezielt zu beeinflussen. Das weitere Interesse lag jedoch nicht darin, das Erscheinungsbild einzelner Filamente statistisch zu untersuchen, sondern die Auswirkungen verschiedener Wellenlängen auf eine Gesamtheit von Zellen in einem Kultivierungsraum zu bestimmen. Es wurden einerseits Kinetiken gemessen für Bestrahlung mit Licht einer Lichtfarbe bei verschiedenen Lichtintensitäten als auch Kinetiken für zwei konzentrierte Farben bei verschiedenen Intensitäten. Alle Kolben konnten zusätzlich mit CO_2 -angereicherter Luft begast werden, um einer CO_2 -Limitierung zu entgehen. Als Reaktionsraum dienten für die folgenden Experimente Schüttelkolben. Alle Kolben wurden gleichermaßen mit frisch turraxiertem Moos angeimpft, um für alle Experimente konstante Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die Animpfkonzentration lag unter $0,05 \text{ g/L}$, um eine gegenseitige Zellabschattung zu vermeiden. Im Gegensatz zu den Versuchen aus c) wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit einem Rotor-Stator-System zerkleinert, um eine homogene Probeentnahme zu gewährleisten. Gemessen wurden zeitliche Verläufe der optischen Dichte (750 nm) und des Chlorophyll a- bzw. b-Gehalts. Die OD-750-Werte konnte mit der Biotrockenmasse korreliert werden. Abbildung 3 zeigt die gemessenen maximalen spezifischen Wachstumsraten, die jeweils für die exponentielle Wachstumsphase einer Kultivierung ermittelt wurden. Hinter jedem Messpunkt steht letztendlich ein Kultivierungsverlauf. Betrachtet man die beiden Graphen in Abbildung 3, sieht man, dass sowohl die Neubildung von Biomasse als auch die Chlorophyllbildung gut durch eine Sättigungskinetik nach Monod beschrieben werden können. Die Neubildung von Chlorophyll A

erfolgt also wachstumsgekoppelt, ebenso die Neubildung von Chlorophyll B (Daten nicht gezeigt). Die Kurven mit Begasung (aerated), dies gilt sowohl für μ als auch $r_{\text{Chl A}}$, liegen deutlich über den Kurven ohne Begasung (no gas). Wurden die Kolben mit Licht einer Farbe bestrahlt, wurden max. Raten für blaues und weißes Licht von $\mu=0,7 \text{ d}^{-1}$ und $r_{\text{Chl A}}=0,6 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gemessen, für rotes Licht hingegen nur $\mu=0,6 \text{ d}^{-1}$ und $r_{\text{Chl A}}=0,5 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Bei den unbegasteten Kolben wurden bei einer Lichtfarbe maximale Raten für blaues und weißes Licht von $\mu=0,35 \text{ d}^{-1}$ und $r_{\text{Chl A}}=0,32 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gemessen, für rotes Licht hingegen nur $\mu=0,3 \text{ d}^{-1}$ und $r_{\text{Chl A}}=0,3 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Affinitätskonstante liegt für rotes Licht etwas unter denen für weißes und blaues Licht bei konstanter PFD (Abbildung 3).

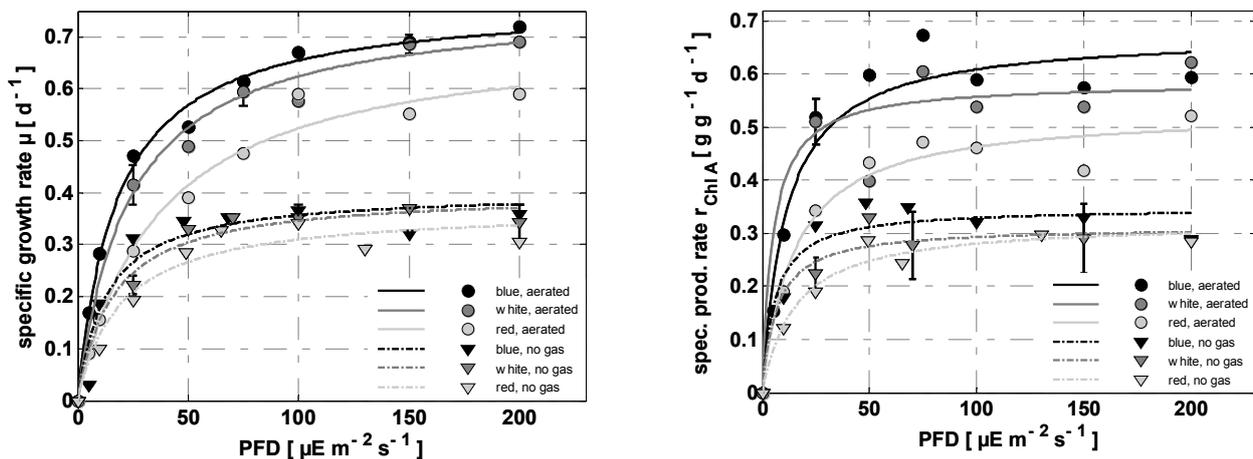


Abbildung 3: links: Wachstumskinetik von begasteten und unbegasteten Kolben, Betrachtung der spez. Wachstumsraten
rechts: Bildungskinetik von Chlorophyll A; Linien: Fit nach Monod; Verwendung von jeweils einer Lichtfarbe

Neben den Chlorophyllen gibt es im Moos *P. patens* jedoch noch weitere sensorische Pigmente wie z.B. den Rot-/Ferrorezeptor Phytochrom und die Blau-Rezeptoren Phototropin und Cryptochrom (Uenaka 2005). Alle drei Pigmente sind u.a. an dem Mechanismus der Filamentverzweigung beteiligt und wirken sowohl bei der Induktion als auch der Lokalisation von neuen Verzweigungen mit. Die Überlegung ging nun dahin, rotes Licht für die Anregung des Chlorophylls zu verwenden und Wachstumsprozesse anzuregen. Weiterhin sollte blaues Licht den Blaulichtrezeptor Cryptochrom spezifisch im Absorptionsmaximum von 450 nm anregen und eine eventuelle physiologische Antwort anhand der kinetischen Daten beobachtet werden. Kolben, die konstant mit rotem Licht bestrahlt wurden, wurden alle 3 min für 10 s mit einem blauen Lichtimpuls hoher Intensität bestrahlt ($200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Integral gesehen entspricht dies einer konstanten Intensität von lediglich $5\text{-}10 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. In einem weiteren Versuch wurden konzentriert rotes und blaues Licht mit jeweils konstanter, halber Intensität eingestrahlt. Die kinetischen Untersuchungen ergaben deutlich erhöhte Wachstums- und Chlorophyllbildungsrate für die duale Bestrahlung mit rotem und blauem Licht im Vergleich zu rotem Licht bei konstanter Gesamtphotonenflussdichte (Abbildung 4). Für begastete dual beleuchtete Kolben ergaben sich Werte von $\mu=0,75 \text{ d}^{-1}$ gegenüber $\mu=0,6 \text{ d}^{-1}$ für rot beleuchtete Kolben. Bei den unbegasteten Kolben ergaben sich $\mu=0,45 \text{ d}^{-1}$ gegenüber $\mu=0,35 \text{ d}^{-1}$. Für die Bildung von Chlorophyll A resultierte dementsprechend $r_{\text{Chl A}}=0,52 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ im Gegensatz zu $r_{\text{Chl A}}=0,45 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und für Chlorophyll B $r_{\text{Chl B}}=0,47 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ gegenüber $r_{\text{Chl B}}=0,35 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Diese Erhöhung der gemessenen spezifischen Raten könnte auf einen erhöhten Verzweigungsgrad zurückzuführen sein, wie Uenaka bereits an einzelnen Moosfilamenten beobachtet hat (Uenaka 2005). Demnach entsteht bei einem hohen Verzweigungsgrad viel mehr Biomasse als bei überwiegend unverzweigtem Wachstum. Ist der Verzweigungsgrad hoch, wird gleichzeitig auch mehr Chlorophyll für neue Chloroplasten benötigt, was sich anhand der ebenfalls erhöhten Chlorophyllneubildung zeigt. Nach unserer Vermutung sind diese erhöhten Raten auf die sensorischen Pigmente als Mediatoren zurückzuführen. Die erhaltenen Ergebnisse könnten zukünftig als Grundlage dienen, physiologische Prozesse in der

Photobiotechnologie gezielt durch den Einsatz verschiedener Lichtwellenlängen zu steuern und die Differenzierung zu beeinflussen.

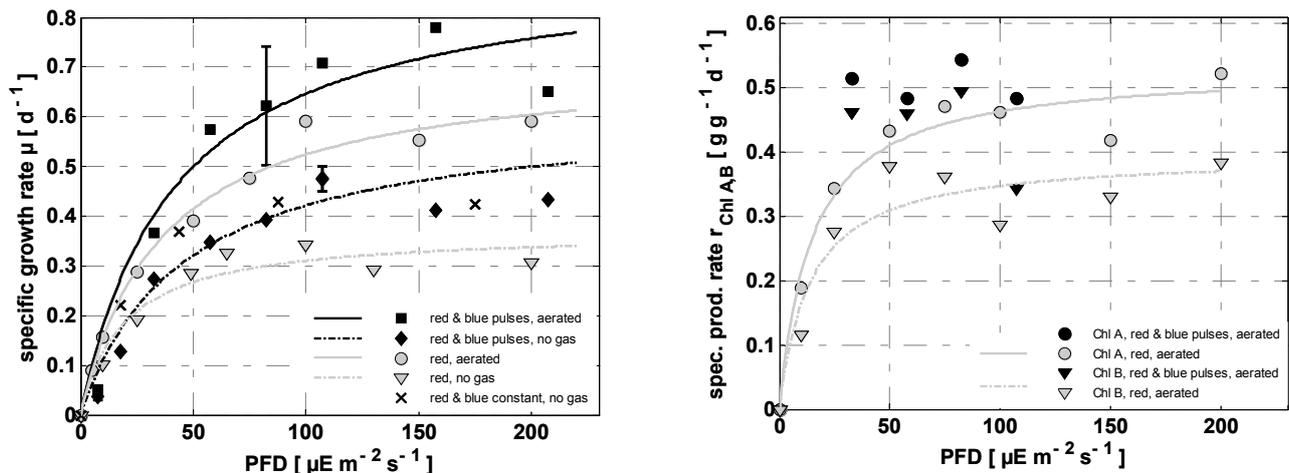


Abbildung 4: links: Wachstumskinetik von begasteten und unbegasteten Kolben, Betrachtung der spez. Wachstumsraten
rechts: Bildungskinetik von Chlorophyll A; Linien: Fit nach Monod; Vergleich: rot und rot + blau

d) Untersuchung der Wachstums- und Pigmentbildungskinetiken unter Berücksichtigung der Zellmorphologie im 3 L-Photobioreaktor

Die unter Punkt d) beschriebenen Experimente wurden in Reaktorkultivierungen wiederholt, um zusätzlich den pH-Wert regeln und die online-Abgasanalytik nutzen zu können. Der unter Punkt b) beschriebene Umwurfreaktor mit interner Beleuchtungseinrichtung wurde für diese Zwecke verwendet. Während die Volumina der Schüttelkolben, und damit auch die Probevolumina, auf 100 mL begrenzt waren, konnte in einer Reaktorkultivierung genügend Probevolumen entnommen werden, um den Verlauf der Biotrockenmassekonzentration repräsentativ zu bestimmen. Die Batchkultivierungen im Reaktor wurden ohne Zerkleinerung der Zellen durchgeführt, so dass die Morphogenese bzw. die Entwicklung der Makromorphologie der Moosfilamente für bestimmte Strömungszustände im Reaktor mit fortschreitender Kultivierungszeit beobachtet werden konnte. Es wurden zwei Versuchsreihen mit jeweils 5 bzw. 4 Batchkultivierungen durchgeführt, bei denen jeweils die Photonenflussdichten zwischen $25\text{-}200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei zwei Drehzahlen, 250 und 500 rpm, variiert wurden. Das von den LED's emittierte, weiße Licht lag im Spektralbereich von $430 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$. Diese Versuche bildeten die Grundlage für die kinetischen Untersuchungen. Die Ergebnisse zeigen, dass der oben beschriebene, mit LED's modifizierte Reaktortyp geeignet ist, um Biomassekonzentrationen von über 4 g/L zu erzielen (Abbildung 5). Anhaftungen der Zellen an Reaktorbauteilen wurden in geringem Maße bei hohen Zelldichten ($>2 \text{ g/L}$) an der Begasungsmembran beobachtet. Das so entstandene „Moospolster“ konnte sich in den meisten Fällen auch nicht durch Druckstöße durch die Membran oder erhöhte Rührerdrehzahlen von 1000 rpm redispergieren lassen. Zwei Kultivierungsverläufe bei einer Drehzahl von 500 rpm sind exemplarisch in Abbildung 5 dargestellt. (25 und $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Nach einer exponentiellen Wachstumsphase erfolgte lineares Wachstum aufgrund von Lichtlimitierung im Medium (Diagramme oben links und rechts). Die Bildung von Chlorophyll a und b verlief analog zum Biomassewachstum, wie bereits unter b) geschildert. Der Biomasse-spezifische Gesamtchlorophyll-Gehalt lag für eine PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ höher als bei einer PFD von 100, um das vorhandene Licht optimal nutzen zu können (Abbildung 5 unten). Wurden die Mooszellen zu einem späteren Zeitpunkt mit einer PFD von $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt, nahm zwar die BTM stark zu (Abbildung 5, oben links), der spezifische Chlorophyllgehalt jedoch rapide ab (Abbildung 5, unten links). Auf einen Stimulus erhöhter Lichtintensität reagierten die Mooszellen mit der verstärkten

Neubildung von Biomasse, jedoch wurde verhältnismäßig wenig neues Chlorophyll synthetisiert. Die Zellen verteilen quasi das vorhandene Chlorophyll auf die neugebildeten Zellen.

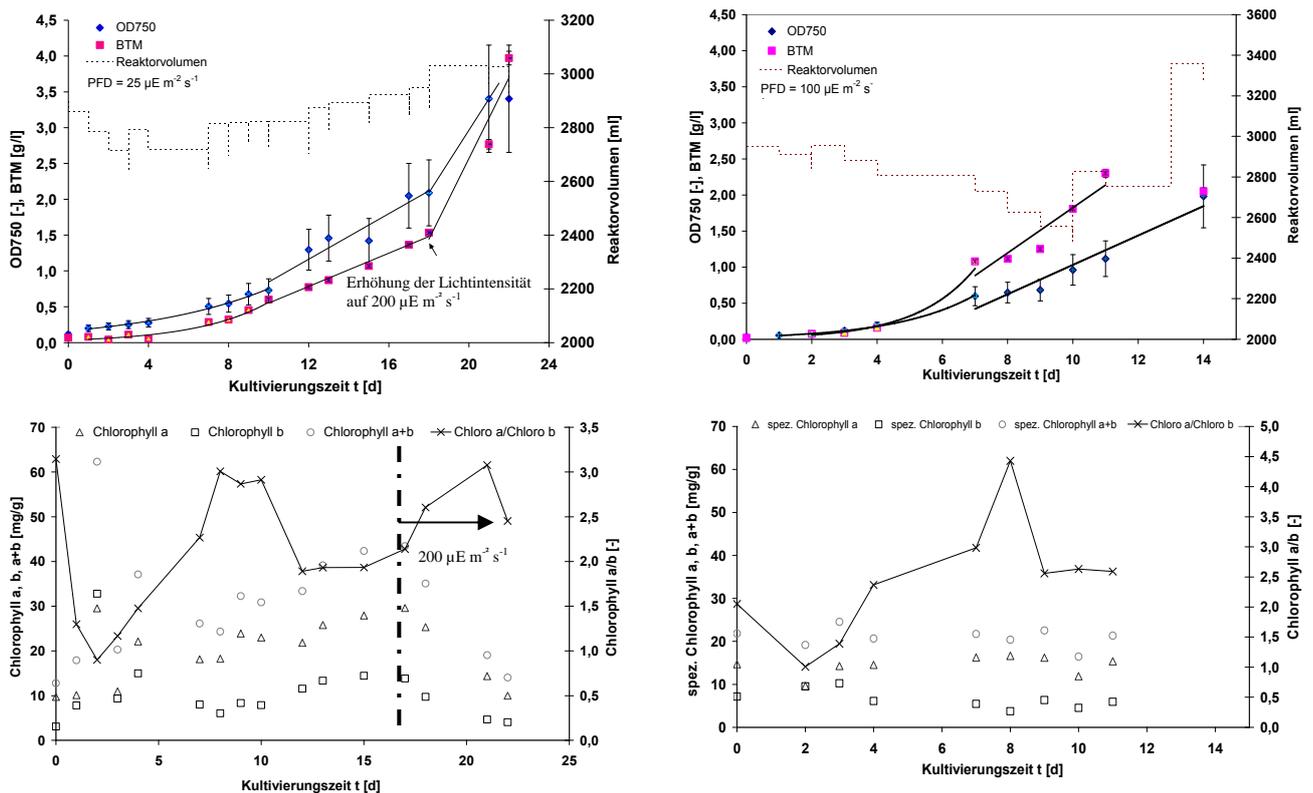


Abbildung 5: oben links: Kultivierung von *P. patens* im 3 L-PBR bei konstanter PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; oben rechts: $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; dargestellt sind die Verläufe für die Biotrockenmasse, die optische Dichte (750 nm) und das Reaktorvolumen über der Kultivierungszeit; unten links: Verläufe des spez. Chlorophyllgehalts bei einer PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; unten rechts: bei $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Es konnten, in Abhängigkeit der PFD, maximale Wachstumsraten von ca. $\mu=0,65 \text{ d}^{-1}$ bzw. $\mu=0,5 \text{ d}^{-1}$ für die Rührerdrehzahlen 250 und 500 rpm bestimmt werden (Abbildung 6, links). Das Diagramm links in Abbildung 6 zeigt eine Sättigungskurve: μ , $r_{\text{Chl, ges}}$ sowie die CO_2 -Aufnahmerate (CUR) steigen bis zu einer PFD von 75-100 linear an und bleiben dann nahezu konstant, wie es bereits bei den Schüttelkolbenkultivierungen (b) beobachtet worden war. Die Sättigungswerte unterscheiden sich, je nach Rührerdrehzahl: Bei 500 rpm liegen auch die Maximalwerte für $r_{\text{Chl, ges}}$ und CUR unter denen, die bei 250 rpm gemessen wurden ($r_{\text{Chl, ges}}$: 0,7 vs. 0,5 $\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ und CUR: 1,2 vs. 1 $\text{mmol CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Die maximal erreichten Wachstums- und CUR-Raten sind mit denen aus Kultivierungen im Rohrreaktor vergleichbar (Lucumi 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Extinktionskoeffizienten K_A vom Anteil des in den Zellen enthaltenen Chlorophylls abhängig sind. Dieser Zusammenhang wurde für die einzellige Alge *Isochrysis galbana* bereits ermittelt (Molina Grima, 1994) und ist mit dem des Moores vergleichbar (Abbildung 6, rechts). Die Koeffizienten wurden aus dem exponentiellen Abfall der Lichtintensität verschiedener Reaktorkultivierungen mit fortschreitendem Abstand zur Lichtquelle gemessen. Auffällig ist, dass der Extinktionskoeffizient des fädigen Moores bei gleichem Chlorophyllanteil fast doppelt so groß ist wie der des pelletartigen Moores. Dies könnte mit der viel höheren Packungsdichte, bezogen auf das gesamte Kulturvolumen, zusammenhängen und der damit insgesamt stärkeren Abschwächung des Lichts. Auch lassen die gemessenen BTM-OD(750 nm) - Korrelationen Rückschlüsse auf die Morphologie zu. Bei konstanter BTM liegt bei Pellets eine wesentlich niedrigere optische Dichte vor als bei losen Filamenten, da der Anteil des Zellvolumens am Gesamtvolumen viel geringer ist.

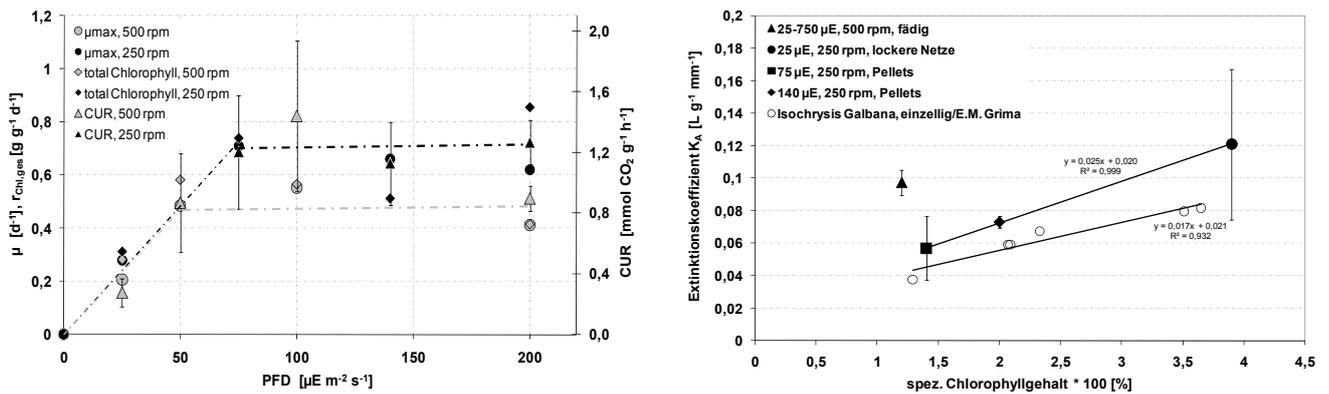


Abbildung 6: links: kinetische Daten aus den Reaktor-Batchexperimenten, die gestrichelten Linien beziehen sich auf die μ_{max} -Werte; rechts: Abhängigkeit der Extinktionskoeffizienten vom Chlorophyllanteil der Zellen und Vergleich mit der einzelligen Grünalge *Isochrysis galbana* (Grima 1994)

Was geschieht nun, wenn man eine Moossuspension unterschiedlich stark rührt? Je schneller der Propellerrührer am Boden des Reaktors dreht, desto stärker ist die Sogwirkung im Zentrum des Beleuchtungsrings und damit die Strömungsgeschwindigkeit. Bei höherer Drehzahl bewegt sich die gesamte Flüssigkeit viel schneller im Kreis und jede Mooszelle durchläuft die unmittelbare Umgebung des Rührers viel häufiger pro Zeiteinheit und ist damit höheren Scherkräften ausgesetzt. Ähnliche Untersuchungen über die Abhängigkeit der Morphologie von der Rührerdrehzahl wurden bereits bei filamentösen Pilzen wie *Aspergillus niger* durchgeführt (Paul 1999). Der Einfluss der Rührerdrehzahl wurde durch Analyse der Partikelgrößenverteilungen (PGV) mittels Laserbeugung erstmals an Moospellets und Filamenten gemessen (Abbildung 7). Liegt fädiges bis netzartiges Moos als dominierende Morphologie vor (hervorgerufen durch eine $\text{PFD} \sim 25 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei geringem Verzweigungsgrad), so wachsen diese Gebilde bis zu einem Modalwert von ca. 1200 μm an (Abbildung 7, links). Dieser bleibt ab einer Konzentration von 0,3 g/L konstant bzw. nimmt unter Umständen sogar ab. Im Gegensatz dazu wachsen Pellets bis zu einem Modalwert von ca. 1800 μm an, welcher erst ab einer Konzentration von 1,3 g/L konstant bleibt und nicht wieder abnimmt (Abbildung 7, rechts). Pellets liegen dann vor, wenn die Kultur mit einer hohen initialen PFD von $\gg 25 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bestrahlt wird. Unter dem Mikroskop sehen diese wie sphärische, dichtgepackte Kugeln aus, aus denen, über die ganze Oberfläche gleichmäßig verteilt, Filamente herausragen. Wird nun sehr schnell gerührt, brechen einzelne Filamente und Netze viel schneller ab bzw. auf als die kompakten Pellets. Die Partikelgrößenverteilung ergibt sich also durch das Zusammenspiel des Lichtangebots (initialer Verzweigungsgrad) und den auf die Zellen wirkenden (Scher-) Kräften (Größe der Partikel). Auf den Einfluss der initialen PFD wird unter f) näher eingegangen.

Um verschiedene Kultivierungsverläufe miteinander vergleichen zu können, wurde als charakteristische Größe der Äquivalentdurchmesser x_{50} sowohl über der Kultivierungszeit (Abbildung 8, links) als auch über der Biotrockenmasse (BTM) (Abbildung 8, rechts) aufgetragen. Die x_{50} -Werte aus den Kultivierungen bei 250 rpm liegen deutlich über denen bei 500 rpm. Besonders deutlich wird dies, wenn man sich die Auftragung der x_{50} -Werte über der BTM betrachtet. Liegen Pellets als dominante Morphologieform vor, bleibt der x_{50} -Wert ab einer bestimmten BTM konstant. Liegen hingegen lockere Strukturen vor, neigen diese zum Brechen und der x_{50} -Wert nimmt nach einer anfänglichen Steigphase wieder ab. Welche Morphologie in der Zellkulturtechnik bevorzugt werden sollte, hängt

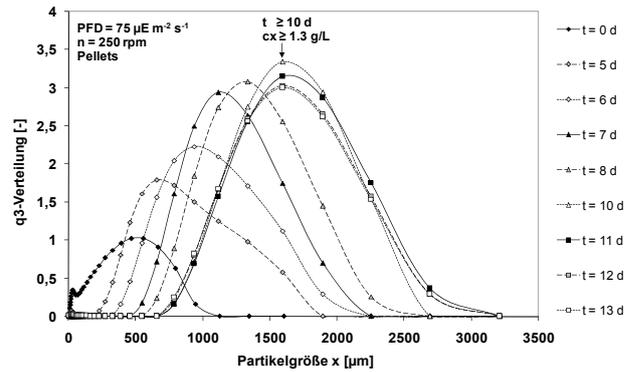
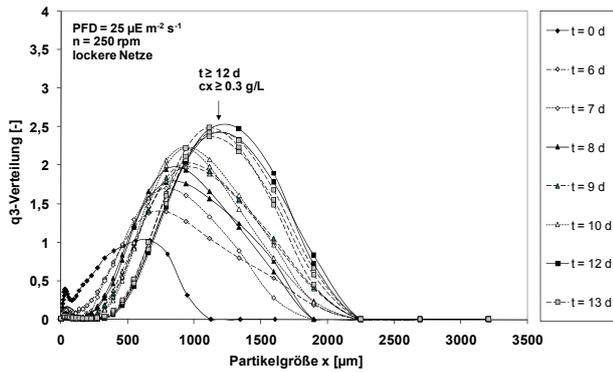


Abbildung 7: links: Partikelgrößenverteilung bei einer PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 250 rpm; rechts: PGV bei einer PFD von $75 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 250 rpm

75

letztendlich auch vom Downstream Processing ab. Es liegt auf der Hand, dass große Pellets oder Netze eine Membran weniger stark verblocken würden als viele einzelne Filamente.

Fest steht, dass der Kern eines Pellets sehr stark licht- und evtl. stofftransportlimitiert ist und die Strömung so gewählt werden sollte, dass Filamente aus dem Kern herauswachsen können ohne zu brechen. Dies würde den Lichteintrag bis in den Kern hinein erhöhen und führt damit, wie gezeigt, zu höheren Wachstumsraten. Die Sektion einiger Kerne ergab, dass deren Inneres trotz Lichtlimitierung vital und nicht etwa abgestorben erschien, was mit einem hohen Gehalt an Chloroplasten begründet werden kann.

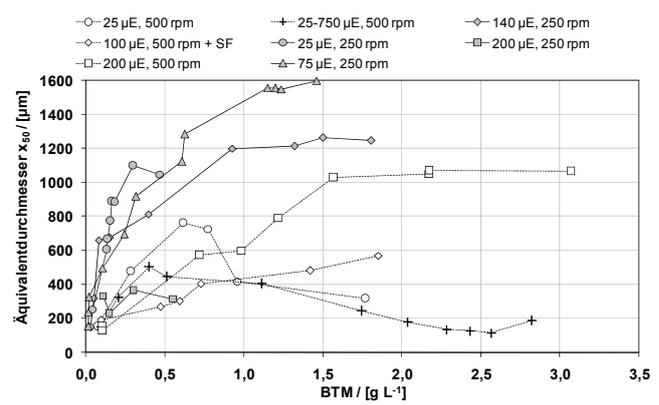
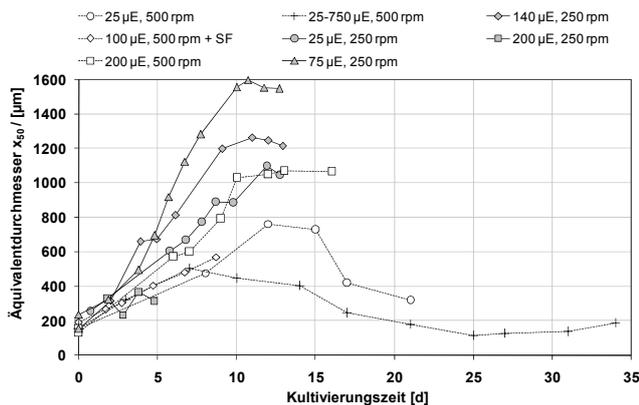


Abbildung 8: links: Auftragung der Äquivalentdurchmesser x_{50} über der Kultivierungszeit bei unterschiedlichen Rührerdrehzahlen; links: Auftragung der Äquivalentdurchmesser x_{50} über der Biotrockenmasse bei unterschiedlichen Rührerdrehzahlen; SF: Spin-Filter

An dieser Stelle sei angemerkt, dass in Zukunft das Image Analysis Tool in Kombination mit der Lichtmikroskopie zur Validierung der Daten aus der Laserbeugung herangezogen werden könnte, z.B. zur visuellen, statistischen Bestimmung der Pelletdurchmesser.

e) Untersuchungen zur Steuerung der Zellmorphologie mit Hilfe der PFD im 3 L-Photobioreaktor

Wie aus mikroskopischen Aufnahmen hervorging (Abbildung 9), wiesen Zellfilamente bei einer hohen PFD $\gg 25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einen drastisch erhöhten Verzweigungsgrad gegenüber Zellen auf, die nur mit einer geringen PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt wurden. Dies führte bei ersteren zu kugelförmigen, ineinander verflochtenen, kompakten Gebilden mit einem maximalen Durchmesser von bis zu 3 mm gegen Ende einer Kultivierung (gemessen unter dem Lichtmikroskop). Kulturen, die lediglich mit einer PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt wurden, wiesen im Gegensatz dazu sehr lange, kaum verzweigte, in lockeren Agglomeraten vernetzte Zellverbände auf. Letztendlich konnte die Makromorphologie der Zellen aufgrund der initial gewählten PFD beeinflusst werden. In einigen Fällen konnte Gametophorbildung aus den Sphären heraus beobachtet werden, was auf eine

erhöhte Konzentration an Phytohormonen im Inneren der Sphären zurückzuführen sein könnte (verringertes Stofftransport in und aus dem Pellet). Bei den lockeren Zellverbänden kam es hingegen selten zur Gametophorenbildung. Ein quantitativer, direkter Vergleich ist jedoch nur anhand sehr vieler mikroskopischer Bilder möglich, was mit einem hohen zeitlichen Aufwand verbunden wäre.

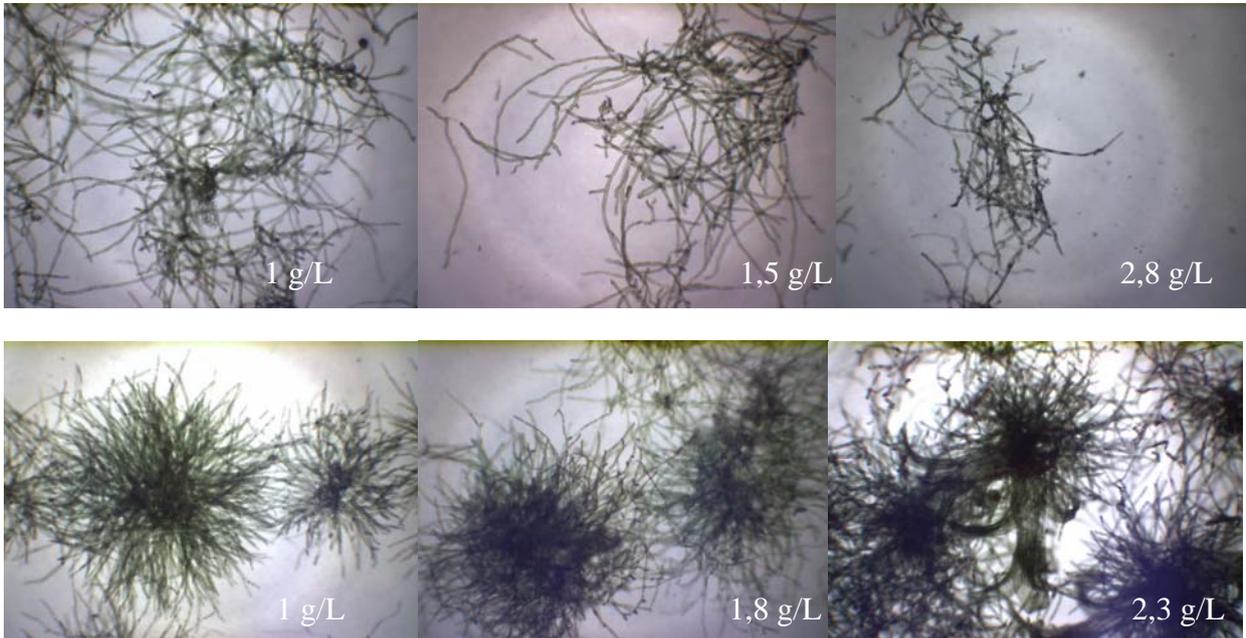
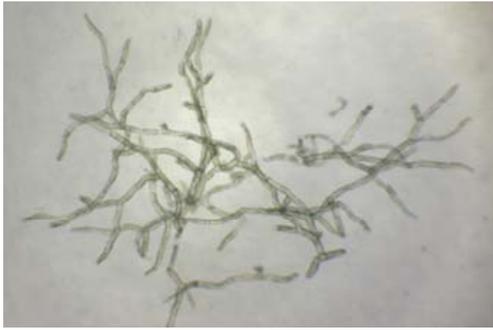


Abbildung 9: Moosfilamente unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung ca. 40fach) bei konstanter PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Filamente-Netze: obere Reihe) und $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Pellets: untere Reihe)

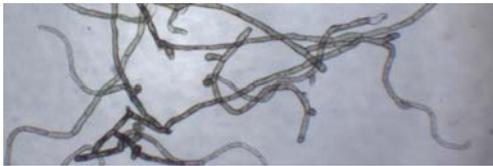
Es wurden zwei Reaktorkultivierungen durchgeführt, bei denen die PFD von anfänglich 25 auf bis zu $750 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ schrittweise erhöht wurde. Ab einer BTM von ca. $0,6 \text{ g/L}$ wachsen die Zellen bei einer PFD von $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ linear (Abbildung 5, oben links). Ab diesem Zeitpunkt wurde die PFD schrittweise erhöht. Durch solch eine stufenweise Erhöhung der PFD konnte die Morphologie gezielt in Richtung loser Filamente und Netze gesteuert werden. Pellets traten zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung auf. Auf diese Weise konnte ein sehr hoher, spezifischer Gesamtchlorophyll-Gehalt von bis zu 40 mg/g erzielt werden (Abbildung 5, oben links) und das Chloronema-Stadium wurde somit weitestgehend erhalten (kaum sichtbare Gametophoren). Dies ist das gewünschte Stadium für die Produktion rekombinanter Proteine wie rhEPO oder rhVEGF (Decker 2008).

Abbildung 10 fasst die Einflüsse der Photonenflussdichte und der Rührerdrehzahl auf die Differenzierung und Morphologiebildung in einem 3 L-Umwurfreaktor nochmals zusammen: Von großer Bedeutung ist die PFD, die zu Beginn einer Kultivierung gewählt wurde. Man beachte den enormen Verzweigungsgrad bei sehr hohen Photonenflussdichten, der letztendlich, wenn die Scherkräfte nicht zu groß werden, zu Pelletbildung führt. Sind bereits Pellets ausgebildet, kann der Licht- und Stofftransport in den Kern dadurch verbessert werden, indem die Scherkräfte verringert werden und die herausragenden Filamente als Abstandhalter fungieren können. Als ultima ratio kann die gesamte Kultur mit Hilfe eines Rotor-Stator-Systems in sehr kleine von $x_{50} = 200 \mu\text{m}$ zerteilt werden. Dabei treten jedoch sehr viele Zellkomponenten wie Proteine ins Medium und können zum Verblocken der Membran des Perfusionsfilter führen. Dies kann bis zur vollständigen Immobilisierung des Moores auf einem rotierenden Spinfilter führen, da bereits anhaftendes Moos hervorragend als Tiefenfilter wirkt (siehe h)).

Lichtintensität I_0 : $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$



500 rpm,
 $25\text{-}750 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
kleines μ_{max}



Lichtintensität I_0 : $530 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$



500 rpm,
 $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
mittleres μ_{max}



250 rpm,
 $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
großes μ_{max}



Abbildung 10: Steuerung der Moosmorphologie durch geeignete Wahl der Größen PFD und Rührerdrehzahl bei weißem Licht; links oben: niedriger Verzweigungsgrad bei niedriger initialer PFD; rechts oben: hoher Grad an Verzweigung bei hoher initialer PFD

f) Untersuchung zur Produktion von rekombinantem Erythropoietin in Schüttelkolben und im 3 L-Photobioreaktor

Das Moos *Physcomitrella patens* stellt eine vielversprechende Alternative zur Produktion rekombinanter humaner Glycoproteine dar. Dennoch hat es sich als äußerst schwierig gestaltet, Aussagen über die Produktion von rekombinantem Erythropoietin (EPO) im Zusammenhang mit Wachstumskinetiken und damit der Auswirkungen von Lichtintensitäten und günstiger Emissionsbereiche auf die EPO-Produktion zu treffen. EPO hat sich als sehr „instabiles“ Molekül im Überstand einer Zellkultur sowohl bei den Schüttelkolben- als auch bei den Reaktorkultivierungen erwiesen. Ohne den Zusatz eines „Stabilisators“ wie Bovines Rinder Serumalbumin (BSA) war ein quantitativer Nachweis mittels ELISA kaum möglich. Die ohne BSA erzielten Konzentrationen an EPO im Überstand lagen bei maximal 1-2 $\mu\text{g/L}$. Der Mechanismus, der dieser Instabilität zu Grunde liegt ist von Karlsruher Seite vollkommen ungeklärt. Denkbar wäre proteolytische Aktivität oder auch eine Deaktivierung durch den Einfluss des Lichts. Auch eine Adsorption an bestimmte Oberflächen scheint nicht ausgeschlossen. Fraglich ist auch, ob ohne BSA trotzdem EPO produziert und ausgeschleust wird, dieses jedoch mit Hilfe des ELISA-Tests aufgrund einer Konformitätsänderung des Proteins nicht detektierbar ist. Gibt man BSA in der Größenordnung von 10 mg/L zum Medium hinzu, kann man einen deutlichen Anstieg der EPO-Konzentration im Medium auf bis zu 20 $\mu\text{g/L}$ beobachten (Abbildung 11, links). Es wurden geringfügig höhere EPO-Konzentrationen gemessen, wenn die Zellen im 16/8 h-Rhythmus bei einem pH-Wert von 5,8-6,8 kultiviert wurden (Abbildung 11, rechts). Über eine optimale Lichtfarbe kann an dieser Stelle keine eindeutige Lichtfarbe getroffen werden. Es spricht jedoch nichts gegen die Verwendung von weißem oder dualem (rot & blau) Licht. Aus den Ergebnissen lässt sich unter Vorsicht ableiten, dass EPO wachstumsbegleitend gebildet wird. Erhöhtes Wachstum wurde, wie in b) geschildert, bei Verwendung von weißem, blauem oder rotem und blauem Licht beobachtet. Rotes Licht alleine resultierte aufgrund des weniger stark ausgeprägten Verzweigungsgrades in geringerem Wachstum (siehe b)). Auch unter der Einstrahlung von Sonnenlicht (mit zusätzlichem Infrarotanteil) konnten EPO-Konzentrationen von bis zu 23 $\mu\text{g/L}$ bei einer niedrigen BTM von 0,3

g/L gemessen werden (Daten nicht gezeigt). War kein BSA im Medium vorhanden, konnte selbst bei einer BTM von 4,5 g/L nicht mehr als 1 µg/L EPO nachgewiesen werden. Über die stabilisierende Wirkung solcher Additive wie BSA wird ausführlich in der Literatur berichtet (Baur 2005). Jedoch ist unklar, warum rhEPO nur in Gegenwart von einigen mg/L BSA nachgewiesen werden kann. Der höchste veröffentlichte Wert für rhEPO aus Mooszellen liegt bei 105 µg/L im Rührkesselreaktor nach nur 7 Tagen (Weise 2007).

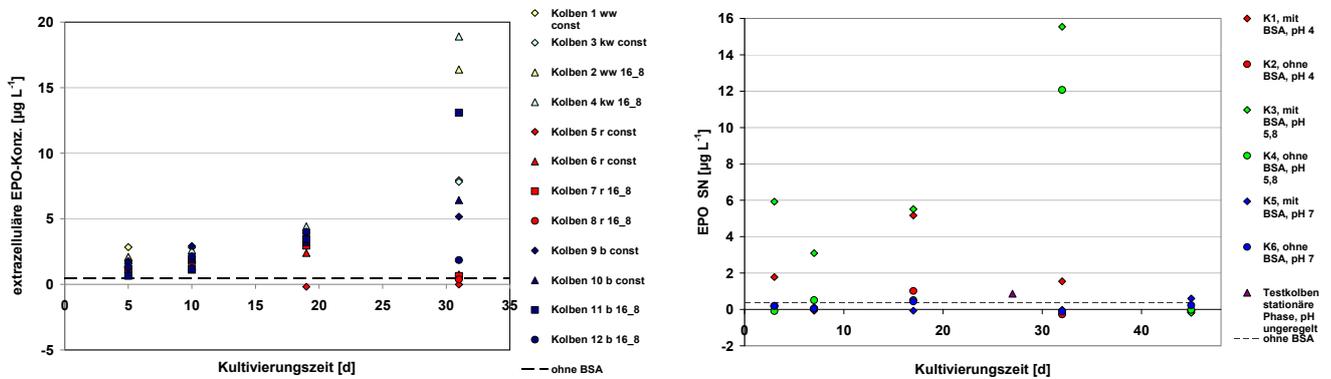


Abbildung 11: Kultivierung in Schüttelkolben mit BSA: Einfluss des 16/8h-Rhythmus, verschiedener Lichtfarben (links) und des pH-Werts (rechts) auf die Produktion von Erythropoietin

g) Etablierung eines Systems zum Perfusionsbetrieb im 3 L-Photobioreaktor

Phytohormone haben die Eigenschaft, Mooszellen zum Ausdifferenzieren zu bringen, d.h. aus Chloronema-Zellen entstehen Gametophoren, die wenig produktiv sind, was die EPO-Produktion betrifft. Sinn und Zweck der Ausstattung eines Reaktors mit Perfusionsystem ist, es diese Phytohormone während einer Kultivierung aus dem Reaktionsraum zu entfernen bzw. zu verdünnen, um das Chloronema-Stadium lange aufrecht zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ein Spinfilter von Sartorius (bereitgestellt von greenovation) in den Innenzylinder der Beleuchtungseinrichtung eingebracht. Das zellfreie Medium konnte aus dem Innenraum des Filters mittels Steigrohr steril entnommen werden. Es wurden zwei Kultivierungen durchgeführt, bei denen batchweise Medium entnommen und durch frisches ersetzt wurde (Abbildung 12, links). Auch hier zeigt sich der eindeutig positive, „stabilisierende“ Effekt des zugegebenen BSA zum Mineralmedium. Nach Zugabe des BSA steigt die EPO-Konzentration über 10 Tage kontinuierlich bis auf 12 µg/L an (K13). Die anschließende Perfusion wirkt sich ebenfalls kurzfristig positiv auf die EPO-Produktion aus. Aus den Spinfilterversuchen lässt sich sagen, dass auch dann EPO produziert wurde, wenn alle Zellen komplett auf der Membran immobilisiert waren (Abbildung 12, rechts).

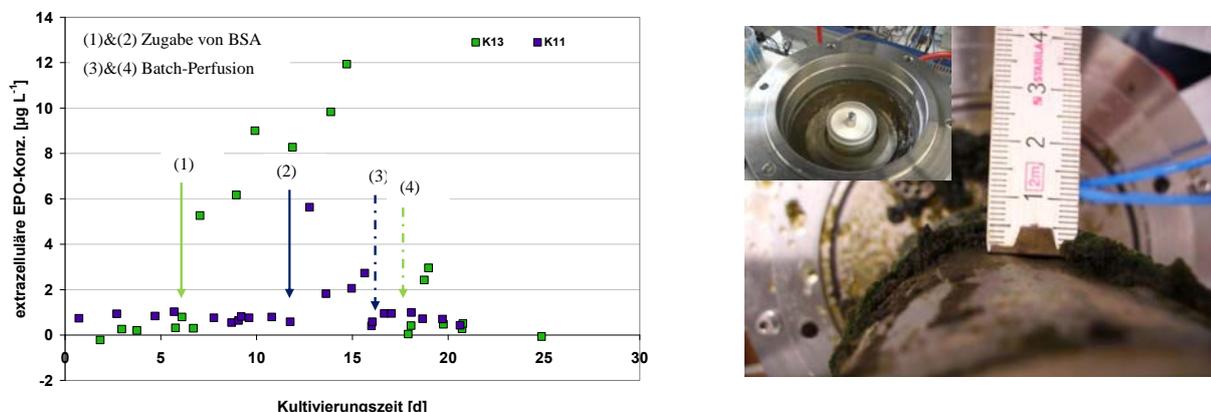


Abbildung 12: links: Kultivierung im Umwurfreaktor unter mit BSA und Perfusionsbedingungen: Stabilisierende Wirkung des BSA auf das im Medium vorhandene EPO; rechts: Totalimmobilisierung aller Zellen auf dem Spinfilter während der K13 (Schichtdicke 0,5 cm!); kleines Bild: Einbau des Spinfilters in den Umwurfreaktor

2. Verwertbarkeit/Fazit

Das Moos *Physcomitrella patens* hat sich als hervorragendes, alternatives Expressionssystem rekombinanter, glycosylierter Pharmaproteine erwiesen. Auf verfahrenstechnischer Seite konnte ein Reaktorsystem, der Rohrreaktor, zur Kultivierung dieses neuartigen Expressionssystems und zur Produktion von rhVEGF etabliert werden. Langzeitversuche haben die Produktionsfähigkeit und Stabilität des Expressionssystems sowie des Zielproteins rhVEGF unter Perfusionsbedingungen deutlich gemacht (Lucumi 2006). Wird das Moos über sehr lange Zeiträume kultiviert, müssen die für die Ausdifferenzierung verantwortlichen Phytohormone aus dem Medium entfernt werden, was mit Hilfe der Perfusion geschieht. Auch lässt sich die Ausdifferenzierung durch gezielte in-line Zerkleinerung mittels eines Rotor-Stator-Systems verzögern (Lucumi 2005),(Lucumi 2007). Für diese Versuche wurde bisher ausschließlich weißes Licht verwendet. In dem aktuellen Projekt wurden kinetische Untersuchungen bei verschiedenen Lichtintensitäten und -farben systematisch sowohl im Schüttelkolben als auch im Photo-Bioreaktor durchgeführt (Cerff 2009), um nähere Informationen über das Wachstumsverhalten und den morphologischen Zustand des Mooses unter Produktionsbedingungen zu erhalten. Es wurde erstmalig gezeigt, dass die Wahl der Lichtfarbe (z.B. rot oder blau in einem eng begrenzten Spektralbereich) bei konstanter Lichtintensität neue Potentiale bei der Prozessführung eröffnet in Hinblick auf Kontrolle der Differenzierung und der Wahl energetisch günstiger monochromatischer Beleuchtungseinrichtungen (LED). Neben der Lichtfarbe kann auch die Lichtintensität so gewählt werden, dass entweder pelletartige Strukturen oder lose Filamente in der Biosuspension vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin die Expression von rhEPO als Zielprotein unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht.

Verwendete Literatur:

- Baur, A., R. Reski , G. Gorr (2005). "Enhanced recovery of a secreted recombinant human growth factor using stabilizing additives and by co-expression of human serum albumin in the moss *Physcomitrella patens*." *Plant Biotechnology Journal* 3(3): 331-340.
- Csogor, Z., M. Herrenbauer, I. Perner, K. Schmidt , C. Posten (1999). "Design of a photobioreactor for modelling purposes." *Chemical Engineering and Processing* 38(4-6): 517-523.
- Decker, E. L. , R. Reski (2004). "The moss bioreactor." *Current Opinion in Plant Biology* 7(2): 166-170.
- Decker, E. L. , R. Reski (2008). "Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31(1): 3-9.
- Grima, E. M., F. G. Camacho, J. A. S. Perez, J. M. F. Sevilla, F. G. A. Fernandez , A. C. Gomez (1994). "A Mathematical-Model of Microalgal Growth in Light-Limited Chemostat Culture." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 61(2): 167-173.
- Paul, G. C., M. A. Priede , C. R. Thomas (1999). "Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations." *Biochemical Engineering Journal* 3(2): 121-129.
- Uenaka, H., M. Wada , A. Kadota (2005). "Four distinct photoreceptors contribute to light-induced

side branch formation in the moss *Physcomitrella patens*." *Planta* 222(4): 623-631.

3. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Erfolgte Veröffentlichungen:

- Cerff, M., Wagner, I., Kipf, E., Radtke, C., Posten, C. (2009). "Kinetische Untersuchungen zum Wachstum des Mooses *Physcomitrella patens* unter verschiedenen Lichtbedingungen." 27. Jahrestagung der Biotechnologen **81**: pp. 1293-1294.
- Lucumi, A. (2007). Prozesstechnische Optimierung des Molecular Farming glycosylierter Proteine in Photo-Bioreaktoren mit dem Moos *Physcomitrella patens*. Dissertation. Universität Karlsruhe.
- Lucumi, A., C. Posten, C. Steinweg, F. Lehr, M.-N. Pons (2007). "Improved Image Analysis Based Morphological Control Of Recombinant Moss In Photo-Bioreactors." 10th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology, IFAC **1**: pp. 257-262.
- Lucumi, A., C. Posten (2006). "Establishment of long-term perfusion cultures of recombinant moss in a pilot tubular photobioreactor." Process Biochemistry **41**(10): 2180-2187.
- Lucumi, A., C. Posten, M. N. Pons (2005). "Image analysis supported moss cell disruption in photo-bioreactors." Plant Biology **7**(3): 276-282.
- Perner-Nochta, I., A. Lucumi, C. Posten (2007). "Photoautotrophic cell and tissue culture in a tubular photobioreactor." Engineering in Life Sciences **7**(2): 127-135.
- Weise, A., F. Altmann, M. Rodriguez-Franco, E. R. Sjöberg, W. Baumer, H. Launhardt, M. Kietzmann, G. Gorr (2007). "High-level expression of secreted complex glycosylated recombinant human erythropoietin in the *Physcomitrella* Delta-fuc-t Delta-xyl-t mutant." Plant Biotechnology Journal **5**(3): 389-401.

Geplante Veröffentlichungen:

- Cerff, M., C. Posten „Studies on Growth Kinetics, Morphology and rhEPO-production of the Moss *Physcomitrella patens* under different light conditions“ in preparation

Doktorarbeiten

Abgeschlossen:

Lucumi, A. (2007). Prozesstechnische Optimierung des Molecular Farming glycosylierter Proteine in Photo-Bioreaktoren mit dem Moos *Physcomitrella patens*.
Universität Karlsruhe.

Nicht abgeschlossen:

Cerff, M.

Karlsruhe, 25.03.10
Universität Karlsruhe (TH)

Prof. Dr.-Ing. C. Posten
Dipl.-Ing. Martin Cerff