



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.

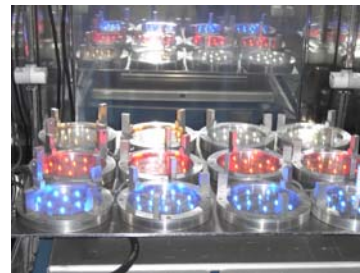
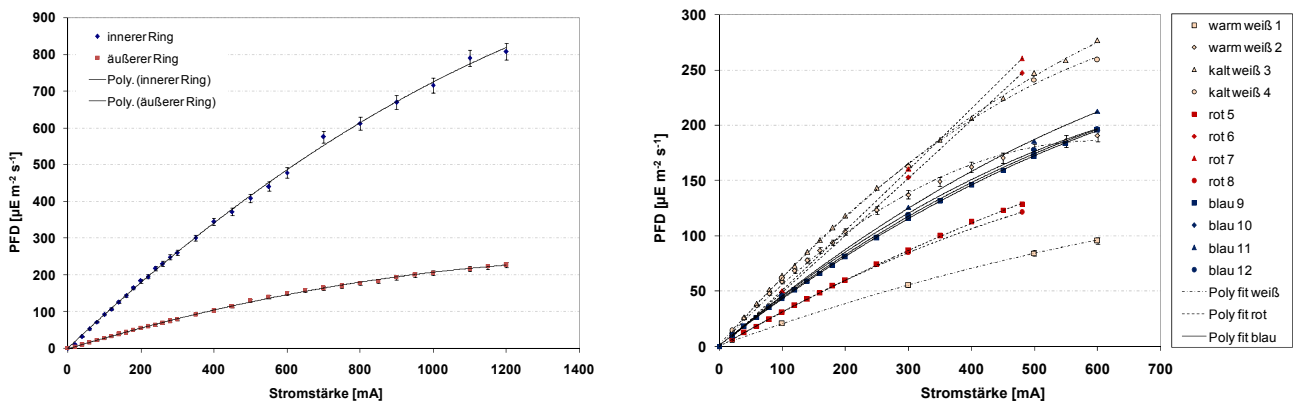

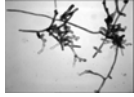



Abbildung 1: Neuentwickelte LED-Beleuchtungseinrichtungen für Umwurfreaktor (links) und Schüttelkolben (rechts) mit entsprechenden Leistungscharakteristika

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 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			

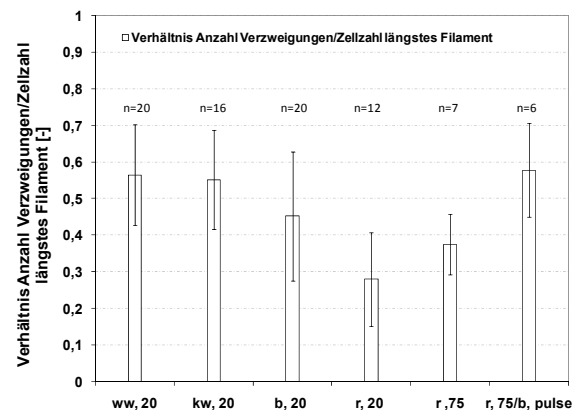


Abbildung 2: links: Daten aus Reaktorkultivierungen mit herkömmlicher Halogenbeleuchtung unter Verwendung eines Bandfilters; rechts: Daten aus Schüttelkolbenkultivierungen unter Verwendung von LED-Platten; Erklärungen: „b 20“: blaues Licht bei einer konstanten Lichtintensität von  $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; „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  $\text{CO}_2$ -angereicherter Luft begast werden, um einer  $\text{CO}_2$ -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 ( $750 \text{ nm}$ ) 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 sowohl für  $\mu$  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).

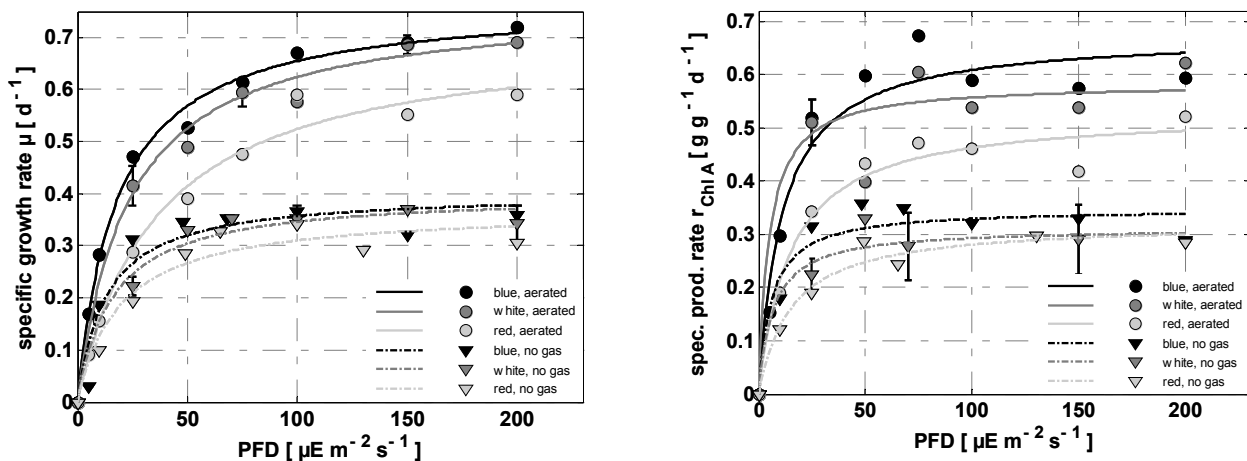


Abbildung 3: links: Wachstumskinetik von begasteten und unbegasteten Kolben, Betrachtung der spez. Wachstumsraten  
rechts: Bildungskinetik von Chlorophyll A; Linien: Fit nach Monod; Verwendung von jeweils einer Lichtfarbe

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 Chlorophyllbildungsraten 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