

Abschlussbericht

MBFSt-Kennziffer: 3414

Berichtszeitraum: 01. Juli 2014 – 30. Juni 2015

Optimierung der Wertstoffproduktion terrestrischer Cyanobakterien

Prof. Dr.-Ing. K. Muffler

Fachbereich Life Sciences and Engineering

Fachhochschule Bingen

In Kooperation mit

Prof. Dr. R. Ulber

Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik

Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik

TU Kaiserslautern

Einleitung und Zielsetzung

Cyanobakterien zeichnen sich durch ein vielseitig nutzbares Produktspektrum aus, welches zur Wertschöpfung in der Biotechnologie beitragen kann. Die Kultivierung der Organismen erfolgt üblicherweise als Suspensionskultur, was insbesondere auf die Verfügbarkeit kommerzieller Reaktorsysteme zurückzuführen ist, die exklusiv auf die Kultivierung von Zellsuspensionen ausgelegt sind. Jedoch kann eine submers Prozessführung bei Cyanobakterien problematisch sein, wenn sie aus Habitaten stammen, in denen sie luftexponiert und in Assoziation mit einer Oberfläche vorkommen. Diese als terrestrisch bezeichneten Cyanobakterien lassen sich oftmals nur unzureichend submers kultivieren, weshalb neuartige Reaktorsysteme angewandt werden müssen, um auch diesen Biodiversitätspool für die Wertstoffproduktion zugänglich zu machen. Die Organismen kommen in ihrem natürlichen Habitat üblicherweise in Form von Biofilmen vor, wobei sie in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind. Die Matrix übt sowohl eine strukturgebende als auch eine protektive Funktion für die Bakterien aus, zu letzterer zählt insbesondere – aufgrund des hygroskopischen Charakters – der Schutz vor dem Austrocknen. Seit kurzem ist bekannt, dass die EPS von Cyanobakterien auch biologisch aktive Komponenten, wie beispielsweise sulfatierte Polysaccharide enthalten kann, die aufgrund ihrer antiviralen Eigenschaften sowie Heparin-ähnlichen Wirkung von Interesse für medizinische Anwendungen sind [1,2]. Die EPS-Produktion ist im Allgemeinen an die Wasserverfügbarkeit gekoppelt, so dass eine gesteigerte Bildung von EPS in einer trockenen Umgebung bzw. durch Trockenstress beobachtet wird [3]. Das Forschungsvorhaben knüpfte an dieses Konzept an, wobei die EPS-Produktion in einem an der TU Kaiserslautern entwickelten Photobioreaktor (ePBR: emers geführter Photobioreaktor, vgl. [4]) optimiert werden sollte. Dieses neuartige Photobioreaktorsystem ermöglicht ein Oberflächen-assoziiertes Wachstum phototropher Mikroorganismen sowie eine gezielte Einstellung der Wasserverfügbarkeit über die Supplementierung des Mediums in Form eines Aerosols, womit eine deutliche Verbesserung der EPS-Produktion erzielt werden kann (vgl. Abb. 1).

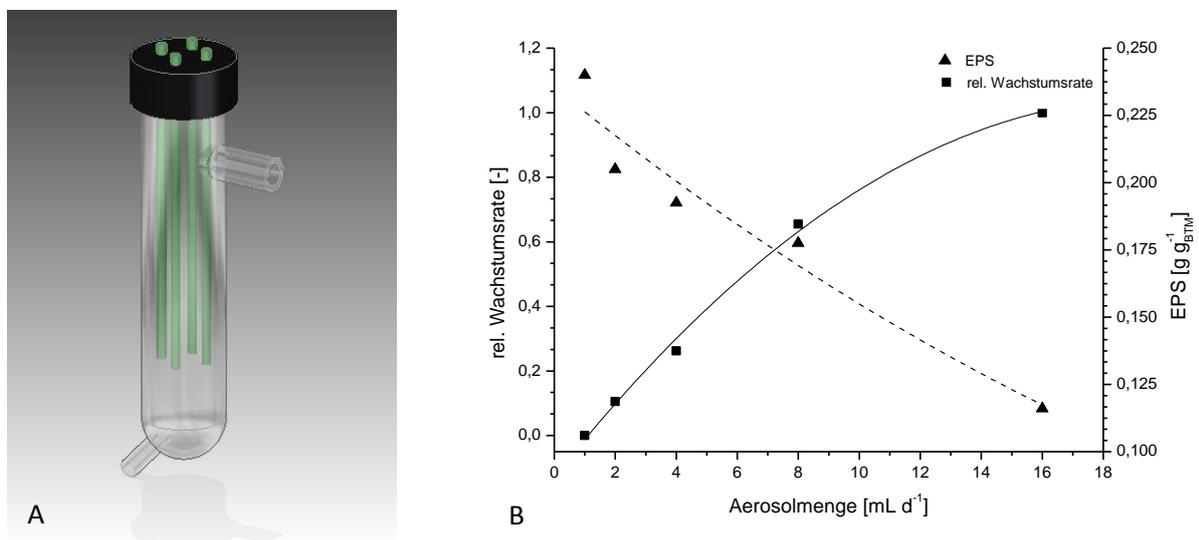


Abbildung 1: A) Schematische Darstellung des eingesetzten Photobioreaktors (ePBR). Die über den Reaktordeckel fixierten aufgerauten Glasstäbe dienen als Lichtwellenleiter und als Aufwuchsfläche für die Cyanobakterien. Die Lichtquelle wird oberhalb der aus dem Reaktordeckel ragenden Glasstäbe positioniert. Eine Versorgung mit Wasser und Spurenelementen erfolgt über ein Aerosol, welches über die obere Reaktoröffnung hinzugefügt werden kann, überschüssiges Medium wird im unteren Reaktorbereich abgezogen. B) Abhängigkeit von Wachstum und EPS-Bildung von der zugeführten Aerosolmenge am Beispiel von *Nostoc muscorum*.

Auf Basis der Voruntersuchungen mit *N. muscorum* sollten verschiedene Cyanobakterien sowohl unter emersen und submersen Bedingungen in Abhängigkeit von den Parametern Licht, CO_2 und Wasserverfügbarkeit phototroph kultiviert und die EPS-Bildung untersucht werden (Arbeitspaket 1). Darauf aufbauend war vorgesehen, eine Analytik der EPS-Komponenten durchzuführen (Arbeitspaket

2) und eine kontinuierliche Prozessführung mit dem in Abb. 1 dargestellten Bioreaktorsystem zu etablieren (Arbeitspaket 3). Abschließend sollte ein Prozessmodell für die EPS-Produktion aufgestellt werden (Arbeitspaket 4).

Ergebnisse und Diskussion

AP1: Kultivierung der Cyanobakterien unter emersen und submersen Bedingungen

Ein Einsatz terrestrischer Cyanobakterien zur Produktion von Wertstoffen setzt eine profunde Kenntnis über Wachstum und Produktbildung (hier EPS) in Abhängigkeit von verschiedenen Prozessparametern bzw. Umgebungsbedingungen voraus. Im Rahmen des Arbeitspakets wurden zwei unterschiedliche submerse (Schüttelkolben und Rührreaktor) und zwei emerse Systeme (Agarplatten und ePBR) angewandt, die sich grundlegend hinsichtlich der Art des Leistungseintrags und der Belüftung unterscheiden. Die Kultivierung erfolgte mit den terrestrischen Cyanobakterien *Nostoc muscorum* und *Trichocoleus sociatus*, von einem ursprünglichen Einsatz des aquatischen Cyanobakteriums *Arthrospira platensis* musste abgesehen werden, da sich dieser Organismus aufgrund des hohen Salzgehalts des erforderlichen Nährmediums in Voruntersuchungen als nicht kultivierbar im emersen System erwiesen hat. Daher wurde zusätzlich *Chlamydomonas reinhardtii* mit in die Untersuchungen aufgenommen, da diese einzellige, eukaryotische Grünalge als vielseitiger Modellorganismus in der Algenbiotechnologie gilt.

Zunächst erfolgte eine grundlegende Charakterisierung der Wachstumsoptima in Schüttelkolben und auf Agarplatten bezüglich der Temperatur und des pH-Wertes. Mit Hilfe einer Gaswechselanlage (GFS-3000, Fa. Walz) wurden die optimalen Parameter für die Lichtintensität und den CO₂-Gehalt ergänzt. Hierfür wurden die Organismen auf einen Objektträger aufgetragen, anschließend erfolgte eine Bestimmung der Licht- und CO₂-sättigungs- und Kompensationspunkte in einer separaten Messkammer. Nachfolgend wurden diese Parameter auf den ePBR übertragen. Ausgehend von einer initialen Wachstumsrate der Mikroorganismen von 0,144 d⁻¹ im Schüttelkolben konnten durch die Verwendung optimaler pH-Werte die Wachstumsraten der Cyanobakterien mehr als verdoppelt (*T. sociatus*: 0,36 d⁻¹; *N. muscorum*: 0,29 d⁻¹) und durch die Erhöhung des CO₂-Gehalts nochmals deutlich gesteigert werden (*T. sociatus*: 1,35 d⁻¹; *N. muscorum*: 3,0 d⁻¹) werden. Die EPS-Produktion war bei den für das Wachstum optimalen Parametern geringer als bei suboptimalen Wachstumsbedingungen und konnte z.B. für *T. sociatus* unter emersen Bedingungen im Vergleich zur submersen Kultivierung von knapp 0,3 g/g_{BTM} auf 0,6 g/g_{BTM} verdoppelt werden. Dies liegt daran, dass EPS als Schutz vor abiotischen und biotischen Faktoren gebildet werden.

Tabelle 1: Dargestellt sind die optimalen Wachstumsparameter (verifiziert im Schüttelkolben und auf Agarplatten) für die terrestrischen Cyanobakterien *Trichocoleus sociatus* und *Nostoc muscorum*, sowie für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*.

Stamm	pH-Wert [-]	Temperatur [°C]	CO ₂ -Gehalt [ppm]	Lichtintensität [μmol m ⁻² s ⁻¹]
<i>T. sociatus</i>	8	30	2000	834
<i>N. muscorum</i>	6	24	1700	221
<i>C. reinhardtii</i>	9	24	1500	n. bestimmt

AP2: Analytik der EPS

Aufbauend auf den Versuchen aus AP1 erfolgte eine Analytik der EPS bezüglich deren Zusammensetzung. Vorgesehen war eine Untersuchung der EPS-Matrix hinsichtlich der folgenden Substanzklassen: Zucker, Proteine und (Glyco-)Lipide. Die Analysen zeigten, dass die Kultivierungsführung (emers/submers) keinen signifikanten Einfluss auf die EPS-Zusammensetzung hat. Die

analytischen Verfahren wiesen allerdings eine erhebliche Varianz auf, was auf die komplexe Zusammensetzung der untersuchten Matrix und die beim jeweiligen Test vorhandenen Störsubstanzen zurückzuführen war. Als Hauptkomponente der Matrix wurden Polysaccharide ermittelt. Der Gehalt an Polysacchariden lag bei *T. sociatus* zwischen 40 und 95 %, bei *N. muscorum* zwischen 20 und 40 % und bei *C. reinhardtii* zwischen 30 und 40 %. Proteine konnten mit einem Anteil < 1 % bei den Cyanobakterien sowie mit einem Anteil von 1 % in der EPS von *C. reinhardtii* nachgewiesen werden. Die Lipidgehalte waren für die Cyanobakterien wie folgt: *T. sociatus* ca. 20 %, *N. muscorum* ca. 40 %. Für *C. reinhardtii* wurde der Lipidanteil als Hauptkomponente nachgewiesen. Hierbei ist zu betonen, dass zusätzliche Untersuchungen, die eine Analytik der separierten Komponenten vorsehen, erforderlich sind, um detailliertere Kenntnisse über die Zusammensetzung der EPS zu erhalten.

AP3: Etablierung einer kontinuierlichen Prozessführung im Photobioreaktor

Das Wachstum der untersuchten Cyanobakterien und die Produktion der Zielsubstanz sind voneinander entkoppelt: eine hohe Aerosolgabe führt zu einer größeren Wachstumsrate, die EPS-Bildungsrate verhält sich hierzu reziprok (vgl. auch AP1). Insbesondere vor dem Hintergrund der im Vergleich zu anderen Bakterien geringen Wachstumsrate und der Korrelation der Produktbildung mit der Biomasse, scheint daher eine Prozessführung zielführend zu sein, die auf einer Retention der Zellen im Reaktor und gleichzeitiger Ernte des Wertstoffs basiert. Die Rückhaltung der Zellen im ePBR erfolgt über eine Selbstimmobilisierung der untersuchten Organismen in Form von Biofilmen, wobei der Wertstoff EPS den interzellulären Raum ausfüllt. Mittels iterativer Prozessführung konnte erfolgreich ein semikontinuierlicher Produktionsprozess etabliert werden, der schematisch in Abb. 2 dargestellt ist.



Abbildung 2: Semikontinuierlicher Prozess zur EPS-Produktion unter Anwendung des ePBR. Nach dem Animpfen, durch Eintauchen der Glasstäbe in eine Zellsuspension, folgt das Wachstum der Organismen. Eine nachfolgende Trockenphase unterstützt die EPS-Produktion. Der Trockenphase schließt sich die Extraktion, ausgeführt durch die Schritte Fluten des Reaktors mit Extraktionsmittel (0,14 M NaCl- und 0,2 mM EDTA-Lösung), Durchmischen durch Begasung (Luft) und Ablassen der Extraktionslösung, an.

Der semikontinuierliche Prozess wurde über einen Zeitraum von vier Wochen durchgeführt, wobei wöchentlich 15 mg EPS (absolut) geerntet werden konnten.

AP4: Aufstellung eines Prozessmodells

Auf Basis der experimentellen Daten sollte ein Prozessmodell für das Wachstum und die EPS-Bildung in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern erstellt werden. Zunächst wurde bezüglich des Wachstums der Cyanobakterien ein erweitertes Monod-Modell (vgl. Gleichung 1) verwendet, mit dem das Wachstum für *N. muscorum* und *T. sociatus* in Schüttelkolben in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Kultivierungstemperatur mit einer Genauigkeit von 98,8 % ($R^2=0,988$) bzw. 75 % ($R^2=0,75$) beschrieben wird.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot e^{-\left(\frac{T_x - T_{opt}}{A}\right)^2} \cdot \left(1 - \frac{10^{pH_{min}}}{10^{pH}}\right) \cdot \left(1 - \frac{10^{pH}}{10^{pH_{max}}}\right) \quad (\text{Gl. 1})$$

Die in Gl. 1 aufgeführten Größen sind wie folgt: T_x = Verwendete Temperatur [°C]; T_{opt} = organismus-spezifische optimale Temperatur [°C]; A = Peakbreite [-]; pH_{min} = organismusspezifischer saurer pH-Wert, bei dem der Organismus noch lebensfähig ist; pH_{max} = organismusspezifischer alkalischer pH-Wert, bei dem der Organismus noch lebensfähig ist; pH = verwendeter pH-Wert; μ_{max} = maximale Wachstumsrate [h^{-1}]; S = Konzentration des limitierenden Substrats im BG11-Medium [$g L^{-1}$]; K_S = Sättigungskonstante [$g L^{-1}$]. Um auch Wechselwirkungen der Parameter sowie weitere für die phototrophe Kultivierung elementare Parameter wie CO_2 -Gehalt und Lichtsupplementierung zu berücksichtigen, war vorgesehenen, dieses Basis-Modell entsprechend zu erweitern. Hierfür wurden zunächst die Wechselwirkungen der Parameter (Temperatur, $T = 18-36^\circ C$; pH-Wert, $pH = 5-8$; Lichtstärke, $PFD = 50-110 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (Auswahl erfolgte technisch bedingt); CO_2 -Gehalt, $c = 0,03-5$ Vol.-%; Konzentration an Mineralsalzen, $c = 25-100$ %) und deren Einfluss auf die maximale Wachstumsrate mittels DoE untersucht, wofür ein D-optimaler Versuchsplan erstellt wurde. Aufgrund der Vielzahl der relevanten Einzelversuche wurden die Experimente exemplarisch mit *N. muscorum* durchgeführt (submerse Prozessführung in einem Rührkesselbioreaktor), wobei folgende Werte als optimal identifiziert wurden: $T = 24,5^\circ C$, $pH = 6,5$, Lichtstärke = $110 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, CO_2 -Gehalt = 2,97 Vol.-%, Mineralsalzgehalt = 100 %. Wesentlicher Einflussfaktor bzw. Parameter mit dem größten Effekt auf die maximale Wachstumsrate ist die CO_2 -Konzentration der Zuluft. Die Genauigkeit des auf den oben genannten Einflussfaktoren beruhenden Modells zur Berechnung von μ_{max} beträgt 79,5 % ($R^2 = 0,795$). Mit diesen Daten konnte nachfolgend das in Gl.1 vorgestellte Modell um die Faktoren Lichtintensität und CO_2 -Konzentration erweitert werden. Vergleiche von Simulation und Experiment zeigten Genauigkeiten > 90 %. Eine Übertragung des Modells vom Rührkesselbioreaktor auf den ePBR erfolgt gegenwärtig.

Fazit

Das Wachstum terrestrischer Cyanobakterien und die Produktion einer Modellkomponente (EPS) dieser Organismen wurde in diesem Vorhaben erstmalig in verschiedenen Fermentationssystemen untersucht, wobei neben der klassischen Submerskultivierung eine emerse Prozessführung u.a. in Form eines phototrophen Biofilms in einem neuartigen Photobioreaktortyp erfolgte. Erstaunlicherweise lagen die Wachstumsraten in den betrachteten Systemen in derselben Größenordnung. Als deutlich überlegen bezüglich der Produktbildung erwies sich der Photobioreaktor mit emerser Prozessführung. Dieses System ermöglichte, durch eine Reduktion der Aerosolzugabe, die gezielte Einstellung von Trockenphasen, womit die Produktbildung erfolgreich unterstützt wurde. Die Zusammensetzung der EPS scheint jedoch unabhängig von der verwendeten Prozessführung zu sein. So zeigten sich analoge Verhältnisse der zu detektierenden EPS-Hauptkomponenten.

Mit dem eingesetzten ePBR wurde darüber hinaus eine sequentielle Produktion von EPS etabliert, wobei die Biomasse nach definierten Zeitintervallen mit einem Extraktionsmittel zur Gewinnung von EPS behandelt wurde. Im betrachteten Versuchszeitraum von einem Monat konnten dabei gleichbleibende Ausbeuten von $15 g_{EPS}/\text{Woche}$ realisiert werden. Im Vergleich zum Batch-Verfahren entfällt – nach der Erstsequenz für alle folgenden Zyklen – der initiale Animpfschritt, womit eine Produktion von Wertstoffen der EPS deutlich effizienter gestaltbar ist. Während ein Modell zur Beschreibung des Wachstums für eine submerse Prozessführung etabliert wurde, das eine hohe Genauigkeit aufweist, steht eine Übertragung des Modells auf Wachstum und Produktbildung im ePBR noch aus.

Referenzen

- [1] S. Singh, S. Das, *Screening, production, optimization and characterization of cyanobacterial polysaccharide*, World Journal of Microbiology and Biotechnology 27 (2011) 1971-1980.
- [2] S. Raveendran, Y. Yoshida, T. Maekawa, S. Kumar, *Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms*, Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine 9 (2013) 605-626.
- [3] S. Pereira, A. Zille, E. Micheletti, P. Moradas-Ferreira, R. De Philippis, P. Tamagnini, *Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structure, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly*, FEMS Microbiology Reviews 33 (2009) 917-941.
- [4] S. Kuhne, D. Strieth, M. Lakatos, K. Muffler, R. Ulber, *A new photobioreactor concept enabling the production of desiccation induced biotechnological products using terrestrial cyanobacteria*, Journal of Biotechnology 192 (2014) 28-33.