

Abschlussbericht

MBFSt-Kennziffer: 2986

Berichtszeitraum: 01. Juli 2012 – 30. Juni 2013

Anwendung eines neuartigen Biofilmreaktors zur Produktion einer Haloperoxidase

Dr.-Ing. Kai Muffler

Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik

Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik

Technische Universität Kaiserslautern

Einleitung und Zielsetzung

Während Biofilme in der Abwasserbehandlung einen festen Platz eingenommen haben, ist deren Einsatz zur Produktion von Bulk- und Feinchemikalien in der Biotechnologie sehr überschaubar und hat bislang keine wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Hierbei scheint sicherlich auch eine Rolle zu spielen, dass Biofilme üblicherweise mit Probleme wie z. B. dem Biofouling in technischen Anlagen oder dem Aufwachsen pathogener Mikroorganismen auf bzw. in medizinischen Geräten assoziiert werden. Dennoch birgt der Einsatz von Biofilmreaktoren eine Vielzahl von Vorteilen, die bei der Prozessentwicklung zu berücksichtigen sind. So werden die Produktionsorganismen in einer biogenen Matrix auf einer Oberfläche (Substratum) immobilisiert, wobei die Matrix von den Zellen selbst generiert wird und keine toxischen Effekte für die Organismen aufweist. Verbunden mit der Eigenimmobilisierung können – analog zu anderen Verfahren, welche immobilisierte biologische Systeme nutzen – die eingesetzten Biofilmreaktoren Standzeiten aufweisen, die um ein Vielfaches höher sind als jene von klassischen Submers- oder Emersverfahren. Hervorzuheben ist, dass durch die automatisch vorliegende Zellrückhaltung kontinuierliche Produktionsverfahren etabliert werden können. Zudem liegen die Zellen in der Matrix in einer Umgebung vor, die sie vor ungünstigen Bedingungen schützen kann, was die Prozessstabilität unterstützen kann, wenn im Verfahren toxische Komponenten auftreten oder fluktuierende Input-Ströme eingesetzt werden. Bei der Etablierung entsprechender Biofilm-nutzender Prozesse ist auch der Einfluss der eingesetzten Oberfläche auf die Biofilmbildung und der biologischen Aktivität der auf ihr anhaftenden (Mikro-) Organismen zu berücksichtigen. So werden als wesentliche Materialeigenschaften für die Biofilmbildung die Parameter Ladung, Rauheit, ggfls. Porosität und die Hydrophobizität genannt (vgl. z.B. [1]). In der Biotechnologie sind metallische Werkstoffe weit verbreitet und bei der Etablierung großtechnischer Verfahren kaum ersetzbar. Von Relevanz ist hierbei, dass sich die eingesetzten Werkstoffe prinzipiell durch eine hohe Korrosions- und Temperaturbeständigkeit auszeichnen und im Gegensatz zu Glas-, Keramik- oder natürlichen Materialien nur einen geringen Verschleiß und die notwendige Bruchsicherheit aufweisen. Zudem erfüllen metallische Werkstoffe die Kriterien für die thermische Beständigkeit, welche zwingend erforderlich für die Durchführung monoseptischer Prozesse ist, sollen die Materialien wiederholt eingesetzt werden. Somit sind entsprechende Werkstoffe als geeignete Supportmaterialien für die Ausbildung von Biofilmen anzusehen. Verbunden mit dem adhärenen Wachstum von Mikroorganismen ist in der Regel auch ein modifizierter Stoffwechsel des biologischen Systems. Prädestiniert für die Anwendung von Biofilmverfahren sind Prozesse, bei denen ein extrazellulärer Wertstoff gebildet wird, der direkt aus dem Überstand isoliert und weiter aufgearbeitet werden kann. Welche Rolle die Oberflächenstruktur auf die Produktion des Wertstoffs hat, ist allerdings bislang kaum untersucht worden.

Im Rahmen des Vorhabens sollte daher erstmalig die Expression eines extrazellulären Enzyms in Abhängigkeit von der Oberflächenstruktur des für die Biofilmbildung eingesetzten metallischen Substratums untersucht werden. Als Modellorganismus wurde der marine Pilz *Caldariomyces fumago* (Synonym: *Leptoxyphium fumago*) ausgewählt, da dieser mit dem Enzym Chloroperoxidase ein interessantes Produkt herstellt, welches ein großes Potential für Biotransformationen aufweist. So kann das Enzym (CPO; EC 1.11.1.10) unter Nutzung von Wasserstoffperoxid eine Reihe von Oxidationsreaktionen katalysieren, die auch industriell von Bedeutung sind. Hierzu zählen zum Beispiel Epoxidierungen [2,3], Hydroxylierungen [4], Oxidationen von Alkoholen und Indol-Derivaten [5,6] aber auch Oxidationsreaktionen von Heteroatomen [7,8,9]. Das Enzym ist zwar kommerziell verfügbar, dennoch ist der industrielle Einsatz des Enzyms limitiert, weil dessen Separierung von einem ins Medium co-sezernierten Pigment sehr aufwändig ist und somit einen erheblichen Kostenfaktor darstellt (vgl. z.B. [10,11,12]). Insofern sollte das Vorhaben auch darauf ausgerichtet werden, zu überprüfen, ob durch das adhärente Wachstum von *C. fumago* in Gegenwart mikrostrukturierter Edelstahloberflächen die Pigmentproduktion beeinflusst wird. Darüber hinaus wurden

die Proteinmenge, die Enzymaktivität, die Biomasse und der pH-Wert des Fermentationsmediums bei Einsatz verschiedener Oberflächen charakterisiert.

Ergebnisse und Diskussion

Nach der Etablierung der Kultivierung von *C. fumago* in Schüttelkolben, sollte die Kultivierung in Durchflusszellen übertragen und untersucht werden, die am Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik der TU Kaiserslautern innerhalb des Sonderforschungsbereichs 926 entwickelt wurden. Hierbei zeigte sich jedoch, dass sich die Vorarbeiten, durchgeführt an prokaryotischen Systemen, nicht direkt auf die Kultivierung des filamentös wachsenden Organismus übertragen lassen. So weist das pilzliche System bei Verwendung eines einheitlichen, homogenen Inokulums einen hohen Heterogenitätsgrad bezüglich Wachstum und Expression der Chlorperoxidase auf. Inwiefern die eingesetzte Oberfläche einen Einfluss auf die Physiologie des Mikroorganismus aufweist, ist somit nur mit einem entsprechenden Parallelisierungsgrad des Kultivierungssystems zu beobachten, welcher jedoch mit den verfügbaren Durchflusszellen und Oberflächen nicht erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurde eine Übertragung der Versuche in ein anderes Kultivierungssystem vollzogen, wobei *C. fumago* in sterilen 6er-Mikrotiterplatten kultiviert wurde. Der ursprüngliche Ansatz der Kultivierung des Organismus in Gegenwart strukturierter Edelstahloberflächen konnte hierbei weiterverfolgt werden. Zum Einsatz kamen Mikrotiterplatten aus Polystyrol (PS) in unbehandelter Form, Mikrotiterplatten mit aufgerauter Oberfläche sowie Mikrotiterplatten, die mit Edelstahlplättchen versehen waren. Das Aufrauen der Oberflächen der modifizierten PS-Mikrotiterplatten erfolgte unter sterilen Bedingungen mit einem Stahlschwamm, wobei die aufgerauten Wells im Anschluss zur Entfernung von vorhandenen Polystyrolpartikeln mit sterilem Medium ausgespült wurden. Für die Versuche mit dem Werkstoff 1.4571 (V4A-Stahl) wurden die Böden unbehandelter Mikrotiterplatten, wie in Abbildung 1 dargestellt, mit den Edelstahlplättchen versehen. Die Auswahl des Werkstoffs erfolgte dahingehend, dass dieser zum einen in der Biotechnologie als etabliert anzusehen ist und zum anderen die prozessrelevanten Anforderungen erfüllt (thermische Beständigkeit, nicht-korroderend, etc.).

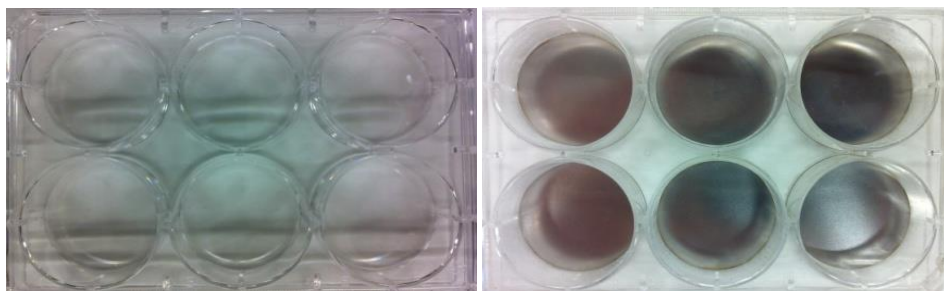


Abbildung 1: Verwendete Mikrotiterplatten.

Mikrotiterplatte aus Polystyrol (links), Mikrotiterplatte mit eingesetzten Böden des Edelstahls 1.4571 (rechts).

Zur Herstellung der Edelstahlplättchen wurden zunächst Platten mit einem Durchmesser von 35 mm aus einem 0,5 mm dicken Folienblech des Werkstoffs 1.4571 ausgestanzt. Anschließend wurde der Durchmesser der Edelstahlplatten durch Schleifen an den Durchmesser der Böden der Mikrotiterplatten angepasst (ca. 34 mm). Die Stahlplättchen wurden zum einen in dieser nicht weiter behandelten Form und zum anderen nach der Behandlung mittels 120er Schleifpapier (zweifach bzw. mehrfach aufgeraut) eingesetzt. Die Plättchen wurden nach der Oberflächenmodifikation mit Aceton und VE-Wasser gespült und vor der Verwendung in den Kultivierungsversuchen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Eine Charakterisierung der Oberflächentopographie der eingesetzten metallischen

Oberflächen erfolgte mittels Rasterkraftmikroskopie. Hierbei zeigte sich erwartungsgemäß, dass mit der Behandlungsintensität eine Zunahme der jeweiligen Rauheitskennwerte resultiert. Die ermittelten Kennwerte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Rauheitskennwerte der eingesetzten Edelstahlplättchen.

Die aufgeführten Kennwerte sind Mittelwerte dreier gemessener Positionen einer Fläche von 100 x 100 µm der jeweiligen Edelstahlplättchen.

Oberfläche	Mittenrauwert R_a [µm]	quadratischer Mittenrauwert R_q [µm]	absolute Rautiefe R_t [µm]
<i>unbehandelte Edelstahloberfläche</i>	0,13 ± 0,02	0,17 ± 0,02	1,89 ± 0,03
<i>zweifach aufgeraute Edelstahloberfläche</i>	0,23 ± 0,07	0,31 ± 0,11	3,47 ± 1,03
<i>mehrfach aufgeraute Edelstahloberfläche</i>	0,37 ± 0,16	0,42 ± 0,14	5,65 ± 1,11

Für die Kultivierung wurden die entsprechend präparierten Wells mit je 3 mL eines Fructose-Salz-Mediums versetzt (vgl. Pickard et al. [10]). Beimpft wurden die einzelnen Mikrotiterplattenwells mit 1 % (v/v) einer zuvor mittels Glasbeads homogenisierten Vorkultur (19,2 mg_{BTM}/mL). Nach dem Verschließen mit einer gaspermeablen Folie wurden die Mikrotiterplatten anschließend bei 24 °C und 150 rpm inkubiert. Um die Verdunstung des Kultivierungsmediums über den Kultivierungszeitraum zu reduzieren, wurden die Platten in Kunststoffbags mit feuchten Tüchern im Schüttelinkubator platziert, wobei sichergestellt wurde, dem Organismus ein ausreichendes Gasvolumen für den aeroben Stoffwechsel bereitzustellen. Üblicherweise erfolgt die Kultivierung von *C. fumago* in Schüttelkolben oder Bioreaktoren für einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen. Eine Übertragung dieser Prozesszeit auf das hier eingesetzte Mikrotiterplattensystem erwies sich in einleitenden Versuchen aufgrund der Biomasseakkumulation, welche eine adäquate Probenahme von Nährmedium über einen Zeitraum von einer Woche hinaus nicht zuließ, als nicht sinnvoll. Daher wurden die relevanten Prozessparameter initial bis zu einem Zeitraum von sieben Tagen ermittelt. In Abbildung 3 sind beispielhaft die am siebten Kultivierungstag resultierenden Parameter bezüglich der Aktivität des Enzyms, der sezernierten Proteinmenge, der Biotrockenmasse sowie der Pigmentabsorption dargestellt, wobei das System mit den unbehandelten Edelstahlplättchen als Referenz dient. Die Enzymaktivität wurde mittels Monochlordimedon-Assay bestimmt, wobei die Chlorierung des Substrats Monochlordimedon spektroskopisch bei 278 nm detektiert wird. Eine Charakterisierung des Proteingehalts erfolgte mittels Bradford-Assay, während der Pigmentgehalt (qualitativ) durch Messung der Absorption des Kultivierungsüberstandes bei 575 nm ermittelt wurde.

Die mit den unbehandelten PS-Mikrotiterplatten erhaltenen Daten sind annähernd identisch mit den im Schüttelkolben ermittelten Werten, so dass hierüber auch ein Vergleich mit einem klassischen Kultivierungssystem besteht. Zu berücksichtigen ist ferner, dass das Wachstum in den unbehandelten Wells in Form von Pellets erfolgte und dabei zudem (qualitativ) eine Viskositätszunahme des Mediums beobachtet werden konnte, während das Wachstum in den anderen Systemen ausschließlich adhärent und ohne Viskositätszunahme erfolgte.

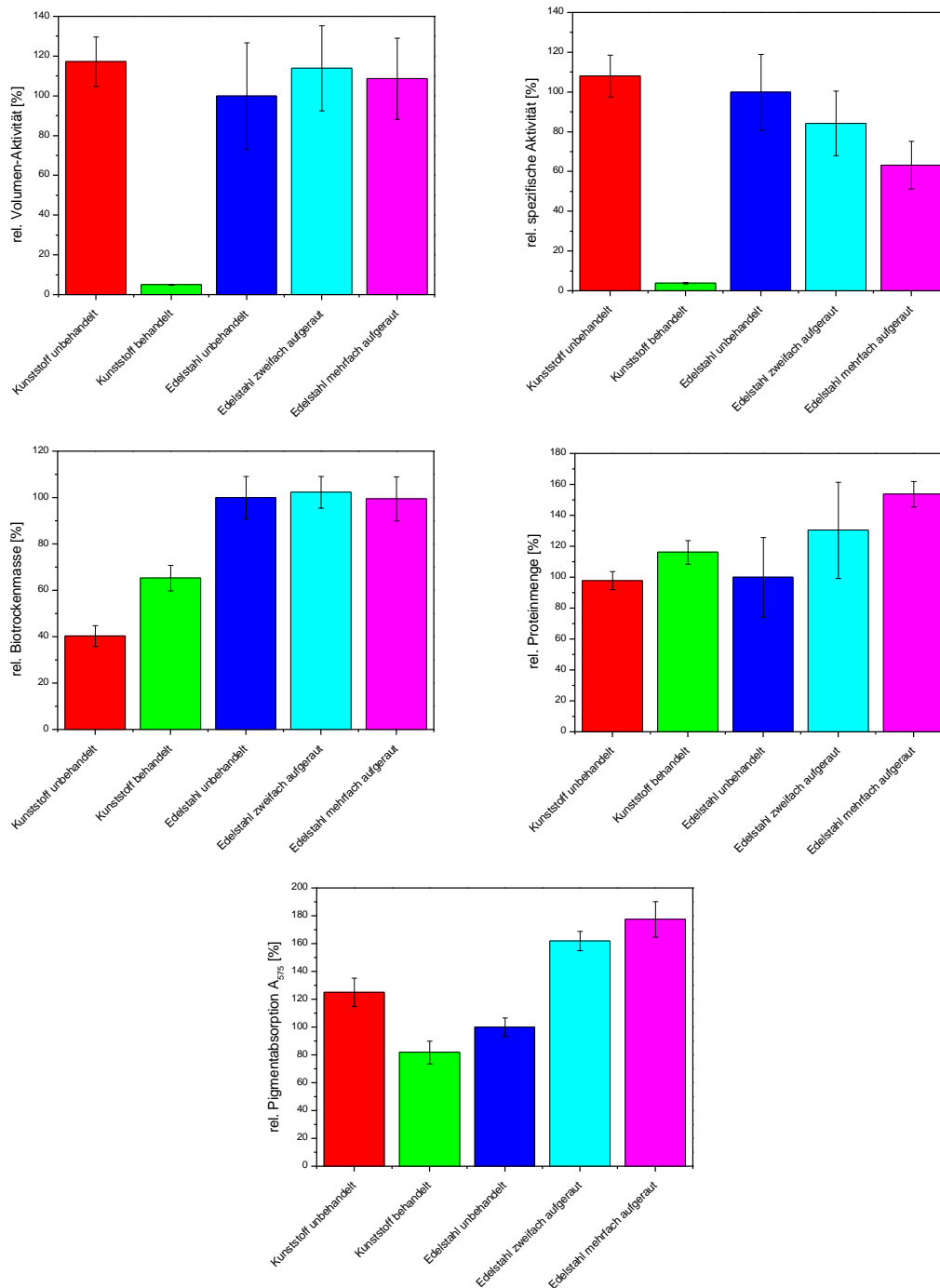


Abbildung 3: Überblick der am siebten Tag der Kultivierung von *C. fumago* in Mikrotiterplatten ermittelten Daten bezüglich Enzymaktivität, Biotrockenmasse, Proteinmenge und Pigmentabsorption bei Exposition des Mikroorganismus gegenüber den eingesetzten Oberflächen. Als Referenz dient das System mit den unbehandelten Edelstahloberflächen. Unbehandelte Polystyrolplatten (rot), aufgeraute Polystyrolböden (grün), unbehandelte Edelstahlböden (dunkelblau), zweifach aufgeraute Edelstahlböden (hellblau), mehrfach aufgeraute Edelstahlböden (pink). Kultiviert wurde *C. fumago* bei 24 °C und 150 rpm in Fructose-Salz-Medium.

Als Fazit der in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse kann subsumiert werden, dass

- a) die in den Mikrotiterplatten akkumulierte Biomasse mit der Rauheit der Oberfläche korreliert;
- b) die sezernierte Proteinmenge mit der Rauheit zunimmt, aber anscheinend hiermit auch eine Denaturierung der CPO verbunden ist (CPO ist das einzige in den Kulturüberständen nachweisbare Protein);
- c) die Volumenaktivität in den untersuchten Systemen (mit Ausnahme der behandelten Polystyroloberfläche) unter Berücksichtigung der ermittelten Varianzen annähernd identisch ist und
- d) die Pigmentproduktion in Gegenwart der unbehandelten (moderat strukturierten) Edeltahloberflächen geringer ist als jene in den unbehandelten Mikrotiterplatten und diese bei den Edeltahloberflächen mit ansteigenden Rauheitskennwerten zunimmt.

Wünschenswert für einen industriellen Produktionsprozess der Chloroperoxidase ist es, eine hohe Expressionsrate des aktiven, extrazellulär vorliegenden Proteins in Kombination mit einer einfachen Abtrennung des Kulturüberstands von der Biomasse zu erreichen. Vor diesem Hintergrund scheint es sinnvoll zu sein, weitere Versuche mit den unbehandelten Edeltahloberflächen zu forcieren. So ist die hierbei resultierende Volumen- bzw. auch die spezifische Aktivität annähernd identisch wie jene mit *C. fumago* in Submerskultur erhaltenen Aktivitäten. Darüber hinaus erleichtern die automatische Zellrückhaltung des Biofilmverfahrens, die verringerte Pigmentproduktion des Biofilms und die Tatsache, dass innerhalb des Versuchszeitraumes von sieben Tagen keine Viskositätszunahme beim Einsatz der adhärent wachsenden Zellen registriert wurde, die Aufarbeitung des Zielenzyms deutlich. Zu berücksichtigen ist an dieser Stelle, dass die unbehandelten Edeltahloberflächen bereits eine gewisse Grundrauheit besitzen und mit zunehmendem Rauheitsgrad die Performance der Oberflächen in Hinblick auf die CPO-Expression abnimmt. Weitere Versuche sollten daher auch mit Oberflächen geringeren Rauheitsgrads durchgeführt werden, wobei entsprechende Oberflächentopographien mittels Elektropolieren bereitgestellt werden könnten. Darüber hinaus sind Untersuchungen zur Langzeitstabilität des Biofilmsystems in Gegenwart der Edeltahloberflächen durchzuführen. Zwar ist der im Rahmen der Versuche beobachtete Gehalt an aktiver CPO analog dem Referenzsystem, jedoch könnte mit einer Zunahme der Biofilmdicke und der damit einhergehenden Limitierung von Stofftransportvorgängen eine reduzierte (spezifische) Expressionsrate der Chloroperoxidase verbunden sein. Dies gilt es daher primär in weiteren Versuchen abzuklären.

Eine Überexpression von CPO in *C. fumago* sowie die Bereitstellung einer Mutante von *C. fumago*, die keine Pigmentproduktion aufweist, wurde kürzlich von Buchhaupt *et al.* berichtet [13,14]. Eine Kombination mit dem hier vorgestellten Biofilmverfahren könnte zu einer deutlichen Kostenreduktion des gegenwärtigen Produktionsverfahrens führen.

Zur Vorbereitung der Untersuchung von Stofftransportvorgängen in Biofilmen von *C. fumago* mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurde zunächst ermittelt, inwiefern eine störende Eigenfluoreszenz des Mikroorganismus bzw. des produzierten Pigments zu berücksichtigen ist. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei Einsatz der verfügbaren Laserlinien zur Anregung (458 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm, 561 nm und 633 nm) keine Eigenfluoreszenz zu detektieren ist. Anschließend wurde eine Methode zur Markierung des Organismus mittels SYTO 9, ein kommerziell verfügbarer Fluoreszenzfarbstoff, der üblicherweise zur Fluoreszenzmarkierung Gram-negativer und Gram-positiver mikrobieller Systeme eingesetzt wird, etabliert. Eine umfassende Charakterisierung der Strukturen sowie der dynamischen Vorgänge für die in den Mikrotiterplatten resultierenden Biofilme mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnten jedoch bislang nicht weiter forciert werden. Einleitende Untersuchungen zur initialen Biofilmbildung deuteten jedoch darauf hin, dass die Primäranlagerung der Biomasse bevorzugt an Kanalstrukturen der erzeugten Oberflächen stattfindet.

Zusammenfassung

Chloroperoxidase ist ein industriell vielseitig einsetzbares Enzym, welches aus dem Kulturüberstand des Pilzes *Caldariomyces fumago* (*Leptoxyphium fumago*) gewonnen werden kann. Für einen späteren Einsatz nachteilig wirkt sich jedoch die Co-Produktion eines schwarzen Pigments aus, die eine Aufreinigung des extrazellulär vorliegenden Enzyms erschwert. Vor dem Hintergrund der Etablierung eines neuen Kultivierungsverfahrens wurde im Rahmen des Vorhabens insbesondere untersucht, inwiefern die Expression des Zielenzym und des Pigments in Gegenwart strukturierter Oberflächen (Edelstahl, Polystyrol) erfolgt, wofür ein Mikrotiterplattensystem eingesetzt wurde. Es zeigte sich, dass der Einsatz strukturierter Oberflächen zur Biofilmbildung von *C. fumago* führt, wobei die resultierende Proteinmenge sowie die Aktivität des Zielenzym im Nährmedium in Gegenwart moderater Topographien ($R_a = 0,13 \pm 0,02 \mu\text{m}$) der Edelstahloberflächen innerhalb des betrachteten Kultivierungszeitraumes vergleichbar mit Kultivierungsansätzen ist, bei denen die Produktion des Enzyms mittels suspendierter Zellen erfolgt. Während die Prozessführung von Biofilmen in der Regel in Hinblick auf die Bildung des Biofilms sowie die Prozesskontrolle des Systems als sehr komplex anzusehen ist, scheint über das adhärent wachsende biologische Produktionssystem eine vereinfachte Aufarbeitung möglich zu sein, da im Vergleich zur Suspensionskultur eine verminderte Bildung des co-produzierten Pigments und keine Zunahme der Viskosität des Kultivierungsmediums im betrachteten Versuchszeitraums beobachtet wurde. Werden Oberflächen mit einem höheren Rauheitsgrad eingesetzt ($R_a = 0,23 \pm 0,07 \mu\text{m}$ bzw. $0,37 \pm 0,16 \mu\text{m}$) resultiert eine verringerte spez. Aktivität der Chloroperoxidase und eine gesteigerte Pigmentproduktion. Allerdings sind weitere Versuche erforderlich, um auch die Performance des Biofilmsystems in Langzeitversuchen zu untersuchen.

Des Weiteren konnte SYTO 9 als geeigneter Fluoreszenzfarbstoff für die Markierung von *C. fumago* identifiziert und die initiale Biofilmbildung untersucht werden. So erfolgt die Primäranlagerung von Biomasse an den strukturierten Edelstahloberflächen anscheinend vorwiegend an den Übergängen zu erzeugten Vertiefungen (Kanalstrukturen).

Referenzen

- [1] K. Muffler, C. Schlegel, C. Ziegler, J. C. Aurich, R. Ulber, *Produktive Biofilme – Wechselwirkung zwischen Oberflächenmorphologie & Stoffwechsel*, Biospektrum 2 (2013) 216-217
- [2] S. Hu, L. P. Hager, *Asymmetric epoxydation of functionalized cis-olefins catalyzed by chloroperoxidase*, Tetrahedron Lett. 40 (1999) 1641-1644
- [3] K. M. Manoj, F. J. Lakner, L. P. Hager, *Epoxydation of indene by chloroperoxidase*, J. Mol. Catal. B Enzym. 9 (2000) 107-111
- [4] S. Hu, L. P. Hager, *Highly enantioselective propargylic hydroxylations catalyzed by chloroperoxidase*, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 872-873
- [5] E. Kiljunen, L. T. Kanerva, *Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of alcohols to aldehydes*, J. Mol. Catal. B Enzym. 2 (2000) 163-172
- [6] M. P. van Deurzen, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Synthesis of substituted oxindoles by chloroperoxidase catalyzed oxidation of indoles*, J. Mol. Catal. B Enzym. 2 (1996) 33-42
- [7] D. R. Doerge M. D. Corbett, *Peroxygenation mechanism for chloroperoxidase-catalyzed N-oxidation of arylamines*, Chem. Res. Toxicol. 4 (1999) 556-560
- [8] S. Colonnas, N. Gaggero, L. Casella, G. Carrea, P. Pasta, *Chloroperoxidase and hydrogen peroxide: an efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidation*, Tetrahedron 3 (1992) 95-106
- [9] S. G. Allenmark, M. A. Andersson, *Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric synthesis of series of aromatic cyclic sulfoxides*, Tetrahedron 7 (1996) 1089-1094
- [10] M. A. Pickard, *A defined growth medium for the production of chloroperoxidase by Caldariomyces fumago*, Can. J. Microbiol. 27 (1981) 1298-1305

- [11] D. R. Morris, L. P. Hager, *Chloroperoxidase 1 – isolation and properties of crystalline glycoprotein*, J. Biol. Chem. 241 (1966) 1763-1768
- [12] P. F. Hallenberg, L. P. Hager, *Purification of chloroperoxidase from Caldariomyces fumago*, Methods Enzymol. 52 (1978) 521-529
- [13] M. Buchhaupt, K. Ehrich, S. Hüttmann, J. Guder, J. Schrader, *Over-expression of chloroperoxidase in Caldariomyces fumago*, Biotechnol. Lett. 33 (2011) 2225-2231
- [14] M. Buchhaupt, S. Hüttmann, J. Schrader, *White mutants of chloroperoxidase-secreting Caldariomyces fumago as superior production strains, revealing an interaction between pigmentation and enzyme secretion*, Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012), 5923-5925