

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Teil 1: Kurzbericht

Zuwendungsempfänger:

Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP)

Felix-Hausdorff-Str. 2

17489 Greifswald

Zum Vorhaben:

IBÖM-07: CELLZERO Meat – Innovative Lösungen zur zellbasierten, gentechnik- und antibiotikafreien Erzeugung von hochwertigem tierischem Protein

Teilvorhaben: Dekontamination des Ausgangsgewebes mittels Plasmatechnologie

Förderkennzeichen: 031B1259C

Verantwortliche Autoren: Dr. Sybille Hasse

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1259C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

Die konventionelle Produktion von Fleisch mit landwirtschaftlichen Nutztieren leistet einen wichtigen Beitrag zur Versorgung der Bevölkerung mit tierischem Protein. Gleichzeitig steht sie jedoch wegen negativer Effekte auf Umwelt und Klima sowie im Zusammenhang mit ethischen Aspekten und zum Teil veränderten Essgewohnheiten immer mehr in der Kritik. In diesem Spannungsfeld entwickelte sich die Idee, zellbasiertes Fleisch als innovative und nachhaltige Alternative herzustellen. Im Vergleich zu herkömmlichem Fleisch und veganen Produkten soll zellbasiertes Fleisch die Vorzüge des Fleischkonsums bieten ohne die negativen Auswirkungen auf Tierwohl und Umwelt. Dafür werden tierische Zellen mittels biotechnologischer Verfahren in Muskel- oder Fettgewebe prozessiert. Die grundsätzliche Machbarkeit konnte bereits vor mehr als 10 Jahren von Mark Post gezeigt werden, der als Pionier auf diesem Gebiet gilt¹. Jedoch existieren technische Limitationen und Schwachstellen, die eine industrielle Produktion von zellbasiertem Fleisch bisher einschränken.

In diesem Projektvorhaben wurden Lösungsansätze verfolgt, die eine effektive und dabei nachhaltige Herstellung von gesundem zellbasiertem Fleisch in großem Maßstab ermöglichen sollen.

Das Gesamtprojekt unterteilte sich in folgende Aufgabenbereiche, die durch die vier Projektpartner bearbeitet wurden:

1. antibiotikafreie Dekontamination des tierischen Ausgangsgewebe durch Plasmatechnologie bearbeitet durch das Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP);
2. Entwicklung spezieller Nährmedien für die Lebensmittelproduktion mit Zellen bearbeitet durch PAN Biotech GmbH;
3. Verfahrenslösungen zur Optimierung der Isolierung und Vermehrung von gewonnenen Stammzellen (UC-MS) validieren und skalieren bearbeitet durch das Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN);
4. Identifikation der Untersuchungs- und Bewertungsmethoden für eine Zulassung als menschliches Lebensmittel bearbeitet durch die Hochschule Anhalt, FB Landwirtschaft, Ökotrophologie und Landschaftsentwicklung (HSA).

Dieser Bericht stellt die Ergebnisse aus Aufgabe 1 zusammen.

Zur Gewinnung der Ausgangszellen für die weitere Prozessierung wurden in diesem Projekt Stammzellen mesenchymalen Ursprungs verwendet. Diese wurden aus porzinem Nabelschnurgewebe isoliert. Die sichere und zuverlässige Dekontamination der gewonnenen Nabelschnurgewebe ist ein essentieller Verfahrensschritt, um sterile Zellkulturen generieren zu können, die wiederum als Rohstoff für antibiotika- und rückstandsfreies kultiviertes Fleisch nutzbar sind.

Hierfür standen am INP verschiedene Konzepte von Plasmaquellen zur Verfügung. Eine Auswahl von vier Plasmaquellen wurde im Rahmen dieses Projektes hinsichtlich ihrer Effizienz bezüglich der Projektziele untersucht. Als geeignete Flüssigkeit wurde ungepufferte Kochsalzlösung verwendet. Diese wurde mit verschiedenen Plasmaanlagen behandelt und hinsichtlich der antimikrobiellen Wirksamkeit, ihrer physikochemischen Veränderungen und ihrer Gewebeverträglichkeit analysiert, wobei die Protokolle für jede Plasmaanlage leicht angepasst werden mussten.

¹ Mark J.Post, Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects, 2012

Im ersten Schritt wurde eine Funkenentladung (Stift-zu-Flüssigkeitsentladungen) mit 4 Pins verwendet. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Ansäuerung der Flüssigkeit sowie eine gute antimikrobielle Wirksamkeit auf den Nabelschnüren, die bis zu 48 Stunden anhielt. Es konnten aber keine Zellisolierungen durchgeführt werden, sodass die zellulären Effekte nicht beurteilt werden konnten.

Eine skalierte (etwa 5-mal größer) Funkenentladung mit insgesamt 20 Pins im Durchflussbetrieb bietet eine bessere Temperaturkontrolle und die Möglichkeit einer direkten Behandlung der Gewebe. Für diese Versuche wurden Laufzeiten von bis zu 60 Minuten untersucht. Es zeigte sich, dass alle kürzeren Laufzeiten nicht das gewünschte Ergebnis zeigten und in allen Proben bakterielles Wachstum nachweisbar war. Während nach 60-minütiger Plasmabehandlung ein bakterielles Wachstum anfänglich nicht nachweisbar war, konnten nach 24 Stunden Inkubation KBE nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich, dass die erhobenen Replikate sehr unterschiedliche Ergebnisse lieferten, was auf eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit hindeutet. Somit konnten die zellulären Effekte nicht beurteilt werden.

Im nächsten Schritt wurde eine Dielektrisch-behinderte Entladung (DBE) im Durchfluss verwendet. Dabei können Gewebeproben direkt oder indirekt einer Plasmabehandlung ausgesetzt werden. Die Ergebnisse zeigten teilweise eine sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit auf den Gewebeproben, die allerdings stark variierte. Hartnäckige Mikroorganismen konnten in zahlreichen Proben nachgewiesen werden. Eine direkte Plasmaexposition stellte sich als effektiver heraus als eine indirekte. Damit waren die Voraussetzungen für die folgende Explantatkultur gegeben, und lieferten eine Zellausbeute von $1-2 \cdot 10^4$ /g Gewebe.

Im Weiteren wurde eine Plasmaanlage basierend auf einer Mikrowellenentladung untersucht. Eine komplette Eliminierung des mikrobiellen Wachstums konnte mit verschiedenen Nachweismethoden gezeigt werden. Gleichzeitig ist es gelungen vitale, proliferierende Zellen aus dem Nabelschnurgewebe zu isolieren. Die grundsätzliche Funktionalität der isolierten Zellen konnte durch Kultivierung in einer 3D Zellkultur und die Bildung von Sphäroiden gezeigt werden. Da diese Ergebnisse bereits das Projektziel erfüllten, wurde der ursprünglich geplante Plasmajet oder andere Plasmageräte nicht eingesetzt. Nach der erfolgreichen Dekontamination erfolgte die Überführung in die Zellkultur, um die Stammzellen zu isolieren. Da die Plasmabehandlung sich durchaus negativ auf die Gewebeintegrität auswirkte, wurden zusätzliche Waschschrte unter Verwendung von Ultraschall eingefügt, um die Kontaktzeit zu minimieren und die Zellausbeute zu steigern. Dies stellte sich als sehr erfolgreich heraus. Im Ergebnis konnten vitale Stammzellen gewonnen werden, wobei die Zellausbeute vergleichbar mit dem bestehenden Protokoll unter Einsatz von Antibiotika ist. Begleitend konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der generierten reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies und der erzeugten plasmachemischen Prozesse gemessen werden, die die Unterschiede in der antimikrobiellen Wirksamkeit verursachen und erklären.

Die Ergebnisse wurden in einer Publikation veröffentlicht: A. Pogoda, Y. Pan, M. Röntgen and S. Hasse; Plasma-Functionalized Liquids for Decontamination of Viable Tissues: A Comparative Approach; Int J Mol Sci 2024 Vol. 25 Issue 19; DOI: 10.3390/ijms251910791

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Teil 2: Eingehende Darstellung

Zuwendungsempfänger:

Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP)

Felix-Hausdorff-Str. 2

17489 Greifswald

Zum Vorhaben:

IBÖM-07: CELLZERO Meat – Innovative Lösungen zur zellbasierten, gentechnik- und antibiotikafreien Erzeugung von hochwertigem tierischem Protein

Teilvorhaben: Dekontamination des Ausgangsgewebes mittels Plasmatechnologie

Förderkennzeichen: 031B1259C

Verantwortliche Autoren: Dr. Sybille Hasse

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung, Technologie und Raumfahrt unter dem Förderkennzeichen 031B1259C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorin/beim Autor.“

Inhaltsverzeichnis

1. Erzielte Ergebnisse	4
1.1. Einleitung.....	4
1.2. Gegenüberstellung der geplanten und durchgeführten Arbeiten	6
1.3. Ergebnisse Plasmaquelle wINPlas	8
1.4. Ergebnisse Plasmaquelle wINPlas XXL	9
1.5. Ergebnisse Plasmaquelle Durchfluss- dielektrische Barriereentladung (DBE) 10	
1.6. Ergebnisse Mikrowellen-Plasmaquelle (PLexc2).....	12
1.7. Vergleichende Zusammenstellung der Leistungsfähigkeit der Plasmaquellen 15	
1.8. Begleitende Untersuchungen mit analogen chemischen Tests	16
2. wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:	17
3. die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten.....	18
4. der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	18
5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	19
6. Veröffentlichungen	19

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung des CELLZERO MEAT-Verfahrens zur Herstellung von Zell-basiertem Fleisch aus ethisch gewonnenen Nabelschnurstammzellen (entnommen aus der Vorhabenbeschreibung). Bereits erfolgte Patentanmeldungen und die Sicherung der Marke „CELLZERO“ erhöhen das Verwertungspotential.	5
Abbildung 2. Mikrobieller Gehalt in der Transportlösung (a) in CFU/100 mL und auf Nabelschnurgewebe (b) in CFU/pUC. [CFU: colony forming unit = Koloniebildende Einheit (KBE); pUC: porcine umbilical cord = Nabelschnur vom Schwein]	6
Abbildung 3. Funkenentladung-Plasmaquelle wINPlas (links) und schematische Zeichnung des Versuchsaufbau (rechts)	8
Abbildung 4. Die Plasmaquelle wINPlas XXL stellt eine Weiterentwicklung der wINPlas dar. In diesem Aufbau fließt die Flüssigkeit in einem Kreislauf und während der Passage durch die Rohre in denen die Funkenentladungspins angebracht sind, findet die Plasmaentladung statt.	9
Abbildung 5. Antimikrobielle Wirksamkeit von plasmabehandelter NaCl Lösung (wINPlas XXL) für Behandlungszeiten von 10, 20, 30 und 60 min (z.B. PT-0,9% NaCl-10 min) und nach Expositionszeiten von 2h,4h,6h,24h und 48h im Vergleich zur unbehandelten NaCl Lösung. Ergebnisse stammen von 3 Versuchsreihen. [CFU: colony forming units = koloniebildende Einheiten KBE].	10
Abbildung 6. Foto des Durchfluss-DBE-Versuchsaufbaus und Skizze der Plasmaquellenkonfiguration. Betrieb: 3 Liter sterile 0,9% NaCl-Lösung mit der Durchfluss-DBE bei hoher Leistung (Pulsbreite: grob 550 ns; Pulsfrequenz: Basis 3 KHz, Multiplikator 1,5.....	10

Abbildung 7. Nabelschnurgewebestücke nach Spülung mit plasmabehandelter 0,9% NaCl Lösung (PTL) auf CASO-Agar nach Inkubation bei 37 °C für 48 Stunden.....	11
Abbildung 8. Mikroskopische Aufnahmen einer Explantatkultur von Nabelschnurgewebe nach Tga 8 (day 8) und Tag 22 (day 22). Neben dem Gewebestück sind spindelförmige adhärenente Zellen zu finden sowie nicht adhärenente Zellen. Nach 22 Tagen hat sich eine konfluente Zellkultur ausgebildet. Links: Kultur nach Spülung mit Antibiotika-Lösung, Mitte: Kultur nach einmaliger Spülung mit PTL, rechts: Kultur nach zweimaliger Spülung mit PTL. Phasenkontrastmikroskop, Vergrößerung x100	12
Abbildung 9. Mikrowellen Plasmaentladung zur Erzeugung einer plasmabehandelten Flüssigkeit. In der Anlage wird plasmaprozessierte Luft durch eine Flüssigkeit geleitet und gemischt. Für unsere Anwendung wurden innerhalb von 4 min 4 L Flüssigkeit behandelt.....	12
Abbildung 10. Workflow zur Dekontamination der Nabelschnurgewebe mit einer plasmabehandelten Flüssigkeit in (Mikrowellen-Plasmaanlage) in Kombination mit Ultraschallapplikation und Schüttlung (oberer Kasten). Die Explantatkultur (unterer Kasten) dient der Gewinnung der Stammzellen (2D), die anschließend in 3D Kulturen überführt wurden. Im gesamten Prozess wurden keine Antibiotika eingesetzt.	14
Abbildung 11. 3D-Kultur der isolierten Stammzellen am Tag 3 und Tag 5. Sphäroidbildung ist als kreisrunde Formierung zu erkennen. Nicht alle Zellen schließen sich dem Zellverbund an.....	15

1. Erzielte Ergebnisse

1.1. Einleitung

Gemeinsames Ziel in diesem Projektvorhaben war die Herstellung von hochwertigem tierischem Protein ("zellbasiertes Fleisch" oder "Clean Meat") als innovative Alternative zur konventionellen Fleischproduktion basierend auf biotechnologischer Nachbildung der Muskel- und Fettentwicklung. Dabei sollte ebenso auf den Einsatz von tierischen Medienzusätzen als auch auf Antibiotika während des gesamten Prozesses von der Gewinnung der Zellen bis hin zum Produkt verzichtet werden.

In diesem Projektvorhaben wurden Lösungsansätze verfolgt, die eine effektive und dabei nachhaltige Herstellung von zellbasiertem Fleisch in großem Maßstab zum Ziel hatten. Das Gesamtprojekt unterteilte sich in folgende grobe Aufgabenbereiche:

1. antibiotikafreie Dekontamination des tierischen Ausgangsgewebe durch Plasmatechnologie wurde bearbeitet am Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP);
2. Entwicklung spezieller Nährmedien für die Lebensmittelproduktion mit Zellen wurde bearbeitet durch PAN Biotech GmbH
3. Verfahrenslösungen zur Optimierung der Isolierung und Vermehrung von gewonnenen Stammzellen (UC-MS) validieren und skalieren wurde bearbeitet am Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN)
4. Identifikation der Untersuchungs- und Bewertungsmethoden für eine Zulassung als menschliches Lebensmittel wurde bearbeitet an der Hochschule Anhalt, FB Landwirtschaft, Ökotoxikologie und Landschaftsentwicklung (HSA)

Dieser Bericht stellt die Ergebnisse aus Aufgabe 1 zusammen.

Zur Generierung des Ausgangsmaterials sollten plasmabehandelte Flüssigkeiten zur Reinigung des Gewebes zum Einsatz kommen und deren antibakterielle Eigenschaften untersucht, optimiert und weiterentwickelt werden. Die Aufgaben des INP bestanden zum einen in der Bereitstellung funktionsfähiger Plasmageräte zur Behandlung von großen Volumina von Flüssigkeiten und zum anderen in der Charakterisierung der antimikrobiellen Eigenschaften und deren Optimierung. Dazu gehörte auch eine grundlegende Charakterisierung der physikochemischen Eigenschaften der plasmaprozessierten Flüssigkeiten, die zu der gewünschten Wirkung führen. Neben der Optimierung der antimikrobiellen Wirksamkeit ist eine gute Gewebevitalität essentiell für das Verfahren, die unbedingt berücksichtigt werden muss, um die Gewebe anschließend in die Zellkultur zu überführen und aus ihnen vitale und funktionsfähige mesenchymale Stammzellen zu gewinnen.

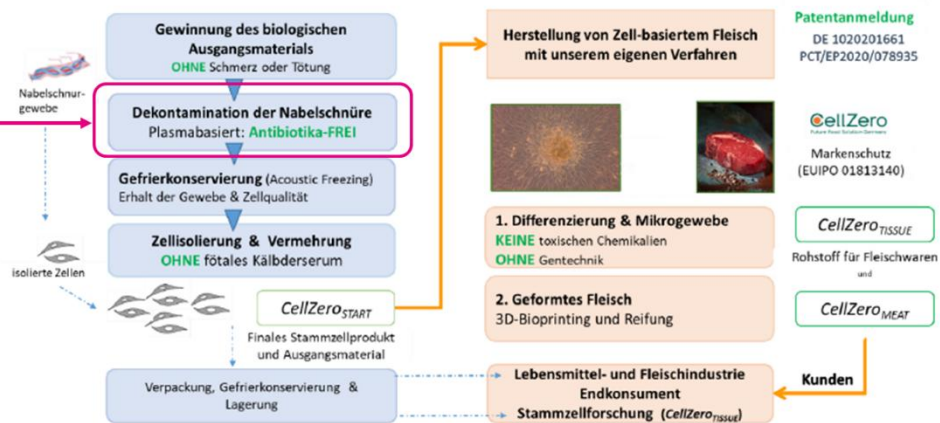


Abbildung 1. Schematische Darstellung des CELLZERO MEAT-Verfahrens zur Herstellung von Zell-basiertem Fleisch aus ethisch gewonnenen Nabelschnurstammzellen (entnommen aus der Vorhabenbeschreibung). Bereits erfolgte Patentanmeldungen und die Sicherung der Marke „CELLZERO“ erhöhen das Verwertungspotential.

Im Projektvorhaben konnten wesentliche wissenschaftliche Ergebnisse erzielt werden, die für die Erreichung der Gesamtziele des Vorhabens essenziell sind. Für die Hauptaufgabe des Projektpartners INP, die Dekontamination des Ausgangsgewebes mittels Plasmatechnologie zu etablieren, wurden bereits in der Planung des Projektes Plasmageräte identifiziert, die Flüssigkeiten behandeln können und sich daher für diese Anwendung grundsätzlich eignen könnten. Da diese Anwendung komplett neu ist, mussten zahlreiche Etablierungsschritte vorgenommen werden. Auch wurde das Protokoll im Berichtszeitraum schrittweise adaptiert und an die jeweiligen Plasmageräte, Volumina und Bedingungen angepasst.

Zu Beginn wurde die Art und Anzahl der vorhandenen Mikroorganismen auf den Nabelschnüren bestimmt. Für die Identifikation wurde ein externes Labor beauftragt. Das Ergebnis ist in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Identifizierte bakterielle Spezies isoliert von Nabelschnurgewebe.

	Identified species	Gram stain	Note
No. 1	<i>Escherichia coli</i>	G ⁻	
No. 2	<i>Aerococcus viridans</i>	G ⁺	Streptococcus family
No. 3	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	G ⁺	Streptococcus family
No. 4	<i>Alloiococcus otitidis</i>	G ⁺	
No. 5	<i>Micrococcus luteus</i>	G ⁺	Micrococcus family
No. 6	<i>Kocuria rhizophila</i>	G ⁺	Micrococcus family
No. 7	<i>Acinetobacter pseudolwoffii</i>	G ⁻	
No. 8	<i>Corynebacterium xerosis</i>	G ⁺	Corynebacteriaceae family
No. 9	<i>Corynebacterium species</i>	G ⁺	Corynebacteriaceae family
No. 10	<i>Psychroacter pulmonis</i>	G ⁻	

Die Konzentration der Mikroorganismen, die in der Transportlösung oder auf den Nabelschnüren selber zu finden ist, wurde über mehrere Probenahmen bestimmt. Das Ergebnis zeigt eine breite Streuung zwischen den Einzelwerten mit 2,0 bis 5,78 KbE/100 ml in der Transportlösung und zwischen 3,65 bis 7,27 KbE pro Nabelschnur

(porcine umbilical cord: pUC). Diese Daten wurden erhoben, um die Ausgangssituation zu beschreiben.

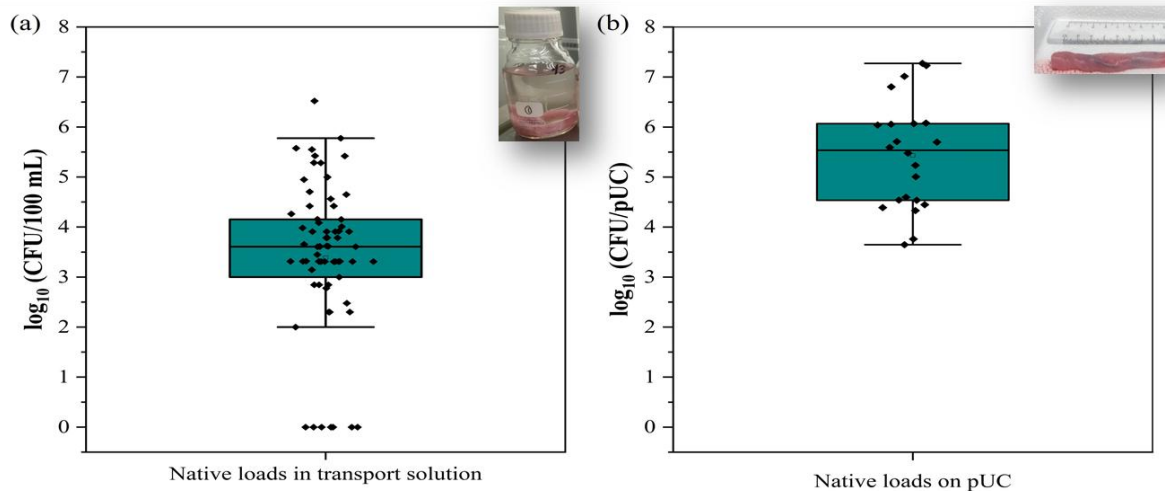


Abbildung 2. Mikrobieller Gehalt in der Transportlösung (a) in CFU/100 mL und auf Nabelschnurgewebe (b) in CFU/pUC. [CFU: colony forming unit = Koloniebildende Einheit (KbE); pUC: porcine umbilical cord = Nabelschnur vom Schwein]

1.2. Gegenüberstellung der geplanten und durchgeführten Arbeiten

Insgesamt konnten vier Plasmageräte umfangreich hinsichtlich ihrer physikochemischen Komposition und antimikrobiellen Wirksamkeit auf Nabelschnurgewebe untersucht werden. Nur bei zwei davon konnte Keimfreiheit der Gewebe nachgewiesen werden, sodass auch die Gewebeverträglichkeit und Zellausbeute im nächsten Schritt bestimmt werden konnte. Die nachfolgende Tabelle 2 stellt die geplanten und durchgeführten Arbeiten gegenüber.

Tabelle 2. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten und der während der Projektlaufzeit bearbeiteten Arbeitspakete

Ursprünglich geplante Arbeitspakete:	Bearbeitete Arbeitspakete:
AP4.1 Plasmaquelle (PQ) winPlas <ul style="list-style-type: none"> physikochemische Charakterisierung 	PQ wurde eingesetzt <ul style="list-style-type: none"> wurde bestimmt
<ul style="list-style-type: none"> Antimikrobielle Wirksamkeit 	<ul style="list-style-type: none"> wurde bestimmt, Protokolle wurden etabliert
<ul style="list-style-type: none"> Prüfung der Gewebeverträglichkeit und Zellausbeute 	<ul style="list-style-type: none"> erste Zellkultivierungsversuche lieferten keine verwertbaren Ergebnisse, Protokolle wurden entsprechend angepasst
AP4.2 Plasmaquelle winPlas XXL <ul style="list-style-type: none"> physikochemische Charakterisierung 	PQ wurde eingesetzt <ul style="list-style-type: none"> wurde bestimmt Ergebnisse liegen vor

<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrobielle Wirksamkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Wurde bestimmt und Behandlungszeitabhängige Wirkung konnte gezeigt werden
<ul style="list-style-type: none"> • Prüfung der Gewebeverträglichkeit und Zellausbeute 	<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrobielle Wirksamkeit reichte nicht aus, um die Zellkultur fortzuführen
AP4.3 Plasmaquelle Durchfluss-DBE <ul style="list-style-type: none"> • physikochemische Charakterisierung 	PQ wurde eingesetzt <ul style="list-style-type: none"> • Wurde bestimmt • Ergebnisse liegen vor
<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrobielle Wirksamkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Protokoll für den Nachweis der antimikrobiellen Wirksamkeit wurde angepasst • Ergebnisse liegen vor
<ul style="list-style-type: none"> • Prüfung der Gewebeverträglichkeit und Zellausbeute • 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkulturen wurden angelegt • Stammzellen wurden isoliert • Zellausbeute wurde bestimmt
AP4.4 Plasmaquelle Plasmajet <ul style="list-style-type: none"> • physikochemische Charakterisierung 	PQ wurde ersetzt durch Mikrowellen-Plasmaquelle (,PLexc 2') <ul style="list-style-type: none"> • Wirksame reaktive Spezies wurden bestimmt
<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrobielle Wirksamkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrobielle Wirksamkeit wurde gezeigt
<ul style="list-style-type: none"> • Prüfung der Gewebeverträglichkeit und Zellausbeute 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellkulturen wurden angelegt • Stammzellen wurden isoliert • Zellausbeute wurde bestimmt
AP4.5 Plasmaquelle Plasmavernebler (,Vader') <ul style="list-style-type: none"> • physikochemische Charakterisierung 	PQ wurde nicht eingesetzt. Dieses AP wurde ersetzt durch Simulationsversuche mit analoger chemischer Zusammensetzung zu plasmagenerierten chemischen Spezies.
<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrobielle Wirksamkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrobielle Wirksamkeit wurde gezeigt
<ul style="list-style-type: none"> • Prüfung der Gewebeverträglichkeit und Zellausbeute 	<ul style="list-style-type: none"> • Wurde geprüft, Ergebnisse liegen vor
AP4.6 Demonstrator <ul style="list-style-type: none"> • Sammlung und Abstimmung zu praxisrelevanten Aspekten 	Umfangreiche technische Informationen zu Anforderungsprofil an Demonstrator wurden erstellt.

<ul style="list-style-type: none"> Entwicklung und Bau eines Demonstrators 	Ein Demonstrator wurde nicht entwickelt.
---	--

Plasmaanlagen, Protokolletablierungsschritte und Ergebnisse sind im Einzelnen nachfolgend dargestellt.

1.3. Ergebnisse Plasmaquelle winPlas

Die Plasmaquelle winPlas (Abbildung 3) erzeugt Plasma durch eine Wechselstromgetriebene Stift-zu-Flüssigkeitsentladung (engl.: discharge) in Luft, auch als Funkenentladung bekannt, wobei reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies an der Oberfläche erzeugt werden und durch Durchmischung aktiv im Volumen verteilt werden.

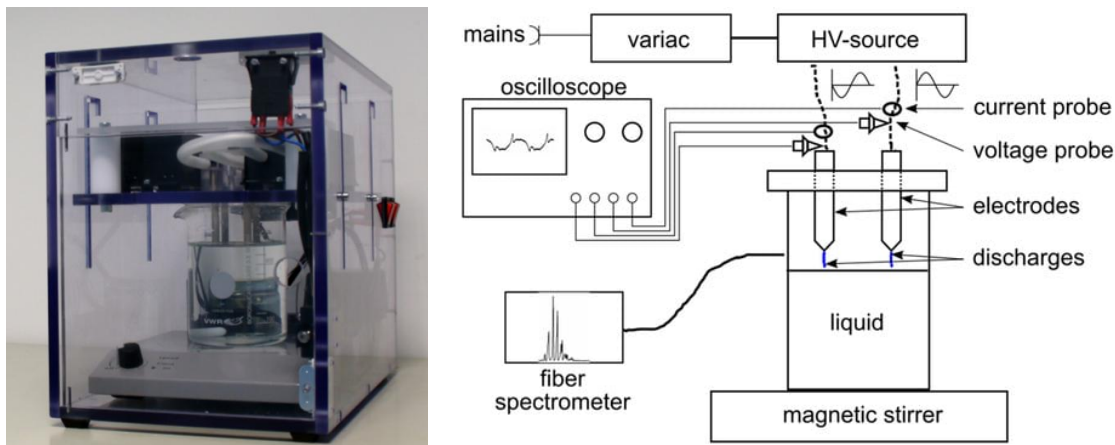


Abbildung 3. Funkenentladung-Plasmaquelle winPlas (links) und schematische Zeichnung des Versuchsaufbau (rechts)

Durch die Reaktion der Plasmaentladung mit der Flüssigkeit kommt es zu einer Azidifizierung, wobei der pH-Wert innerhalb von 10 min auf etwa 3 absinkt. Die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Nitrit-Ionen (NO_2^-) sowie die kontinuierliche Ansäuerung führen zur Bildung von Peroxynitritsäure ($ONOOH$ (im μM -Bereich)), das direkt zu Nitrat-Ionen (NO_3^-) zerfällt. Nach 30 min Behandlung betragen die Konzentrationen von NO_2^- und NO_3^- 1,83 mM bzw. 0,92 mM. Die Konzentration von H_2O_2 war vernachlässigbar.

Die antimikrobielle Wirksamkeit der plasmabehandelten Flüssigkeiten wurde direkt an Nabelschnurgewebe untersucht. Dieses wurde vom Verbundpartner Forschungsinstitut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf zur Verfügung gestellt. In ersten Tests zeigte sich, dass ungepufferte Lösungen (NaCl) gepufferten Salzlösungen (PBS) vorzuziehen sind, da der pH-Wert eine entscheidende Rolle bei der Plasmachemie spielt. Daher wurde für alle weiteren Versuche NaCl verwendet. Wenn die Nabelschnüre in frisch hergestellter plasmabehandelter 0.9% NaCl-Lösung inkubiert wurden, konnten selbst nach 48 Stunden keine nachweisbaren Mikroorganismen gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass PT-PBS nach 24 Stunden allmählich seine antibakterielle Wirkung auf Gewebe verliert, während PT-0.9% NaCl-Lösung seine antibakterielle Wirkung für bis zu 48 Stunden

aufrechterhalten konnte. Im Verlauf des Projektes wurde eine Methode zur Untersuchung der Zellvitalität nach der Dekontamination etabliert, umso eine direkte Kontrolle der Gewebeverträglichkeit zu haben. Für diese PQ konnten allerdings keine Zellkulturen etabliert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Gewebe sich durch die Plasmabehandlung verfärbten, was auf eine Gewebeschädigung hindeutete. Insgesamt ist die PQ winPlas eine vielversprechende Methode zur Dekontamination, wobei Azidifizierung der behandelten Flüssigkeit und die Bildung von reaktiven Verbindungen wie NO_3^- , NO_2^- , H_2O_2 und ONOOH zur antimikrobiellen Wirkung beitragen. Die Konstruktion und Funktionsweise ermöglichen eine zuverlässige und kontrollierte Plasmaerzeugung für eher kleinere Volumen.

1.4. Ergebnisse Plasmaquelle winPlas XXL

Größere Volumen können mit der winPlas XXL (Abbildung 4), eine Weiterentwicklung der Plasmaquelle winPlas, erzeugt werden. Sie erzeugt eine Funkenentladung mit 20 Metallstiften im Durchflussverfahren und kann so bis zu 25 l/h behandeln.



Abbildung 4. Die Plasmaquelle winPlas XXL stellt eine Weiterentwicklung der winPlas dar. In diesem Aufbau fließt die Flüssigkeit in einem Kreislauf und während der Passage durch die Rohre in denen die Funkenentladungspins angebracht sind, findet die Plasmaentladung statt.

Die Reaktion der Plasmaentladungen mit der Flüssigkeit führt auch in diesem Konzept zu einer Azidifizierung der Flüssigkeit und zur Bildung reaktiver Verbindungen. Nach 60-minütiger Behandlung betragen die Konzentrationen von NO_2^- und NO_3^- 2,70 mM bzw. 1,03 mM. Die Konzentration von H_2O_2 war vernachlässigbar klein. Während keine merkliche Temperaturerhöhung gemessen werden konnte, sank der pH-Wert durch die Behandlung deutlich ab (von 7,3 auf 2,6).

Die bakterielle Konzentration in NaCl stieg erwartungsgemäß mit zunehmender Inkubationszeit allmählich signifikant an (von $1,25 \pm 1,09 \log \text{KbE/mL}$ auf $11,07 \pm 0,11 \log \text{KbE/mL}$ nach 24 h). Eine Bakterienlast ließ sich auch auf Nabelschnüren nachweisen, die in frisch zubereitetem PT-NaCl (10 min) inkubiert wurden, wobei ein signifikanter und kontinuierlicher Anstieg in 24 h beobachtet wurde (bis zu $10,30 \pm 0,81 \log \text{KbE/mL}$). Längere Plasmabehandlungszeiten (30 und 60 min) zeigten eine Reduktion der bakteriellen Konzentration bzw. ein späteres Einsetzen des bakteriellen Wachstums. Jedoch war in allen Messreihen nach 24 h oder 48 h die antimikrobielle Effizienz nicht mehr offensichtlich und signifikantes bakterielles Wachstum wurde nachgewiesen.

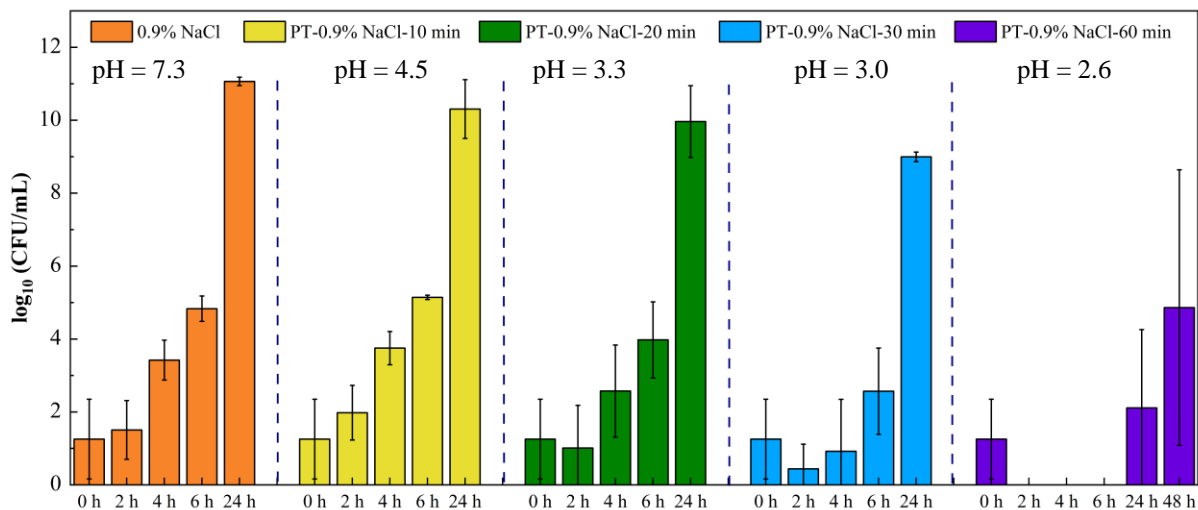


Abbildung 5. Antimikrobielle Wirksamkeit von plasmabehandelter NaCl Lösung (winPlas XXL) für Behandlungszeiten von 10, 20, 30 und 60 min (z.B. PT-0,9% NaCl-10 min) und nach Expositionszeiten von 2h,4h,6h,24h und 48h im Vergleich zur unbehandelten NaCl Lösung. Ergebnisse stammen von 3 Versuchsreihen. [CFU: colony forming units = koloniebildende Einheiten KBE].

Aufgrund der nicht ausreichenden Eliminierung der bakteriellen Last, konnten diese Gewebeproben nicht wie geplant dem weiteren Prozess der Zellkultur zugeführt werden. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass obwohl die festgelegten Betriebsparameter eine stabile und effiziente Plasmaerzeugung gewährleisteten und ein großes Volumen Flüssigkeit behandeln können, war die Reduktion der bakteriellen Last auf den Gewebeproben ungenügend.

1.5. Ergebnisse Plasmaquelle Durchfluss- dielektrische Barriereentladung (DBE)

Das nächste AP untersuchte eine Durchfluss- dielektrische Barriereentladung (DBE).

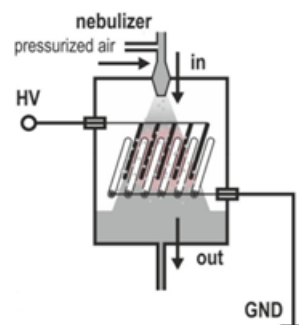
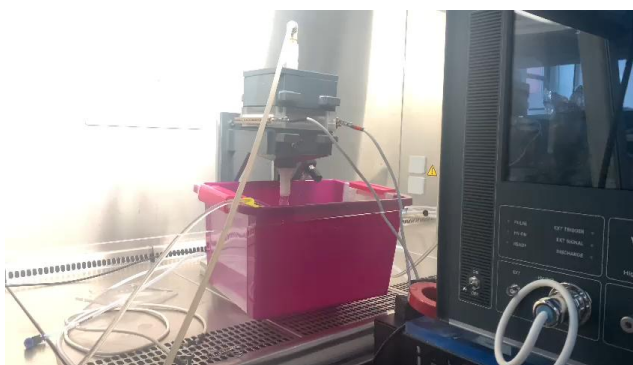


Abbildung 6. Foto des Durchfluss-DBE-Versuchsaufbaus und Skizze der Plasmaquellenkonfiguration. Betrieb: 3 Liter sterile 0,9% NaCl-Lösung mit der Durchfluss-DBE bei hoher Leistung (Pulsbreite: grob 550 ns; Pulsfrequenz: Basis 3 KHz, Multiplikator 1,5

Im Vergleich zu den Plasmaquellen wINPlas oder wINPlas XXL produzierte die Durchfluss-DBE charakteristisch mehr NO_3^- als NO_2^- . Nach 30 min stiegen die Werte auf 19 mM NO_2^- , 53 mM NO_3^- und 8 mM H_2O_2 . Der pH-Wert betrug am Ende der Behandlung 3,31 und eine Temperaturzunahme auf 43,3 °C konnte gemessen werden. Für kürzere Laufzeiten oder niedrigere Leistungsstufen waren die Werte entsprechend geringer (15 min auf höchster Leistungsstufe: 10 mM NO_2^- , 27 mM NO_3^- und 5 mM H_2O_2 , pH-Wert: 3,47, Temp. 35,5 °C).

Der Vorteil dieser Plasmaanlage liegt in der variablen Anwendung. So kann entweder eine Flüssigkeit behandelt werden, die später als Waschlösung verwendet wird (indirekte Plasmabehandlung) oder die Gewebeproben können während der Plasmaoperation in der Flüssigkeit verweilen, also direkt der Plasmaentladung ausgesetzt werden (direkte Plasmabehandlung). Beide Ansätze wurden verfolgt, wobei die direkte Behandlung effektiver die mikrobielle Belastung reduzieren konnte als die indirekte Behandlung. Weiterhin führte wiederholtes Waschen zu einer besseren Dekontamination der Nabelschnüre. Dies konnte sowohl durch Kultur der Gewebeproben auf CASO-Agar als in CASO-Bouillon nachgewiesen werden. Damit erfüllte dieser Ansatz die Voraussetzungen für die folgende Explantatkultur.

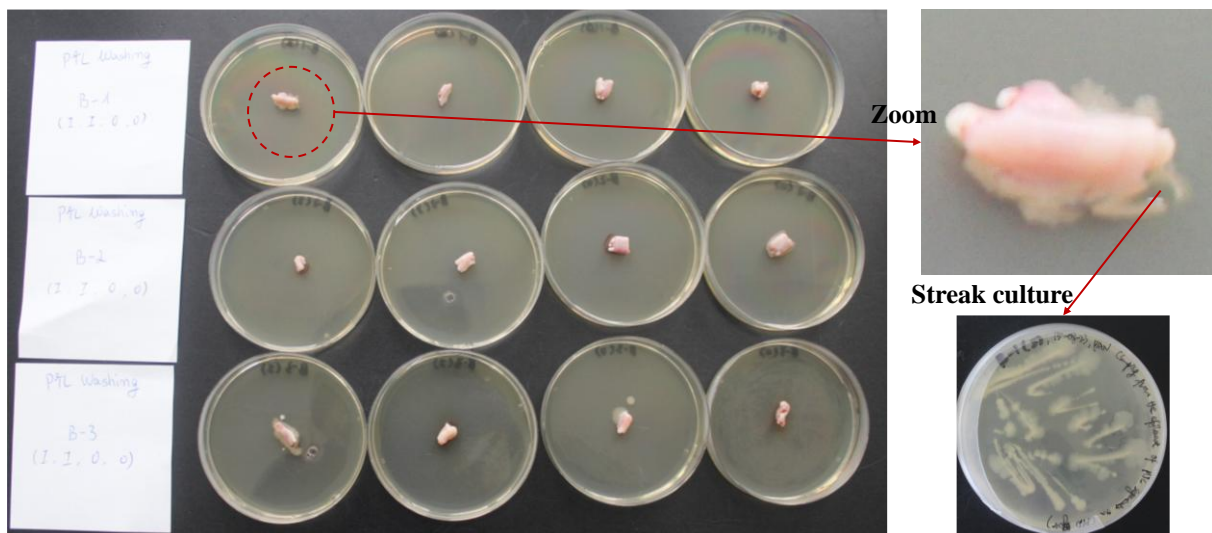


Abbildung 7. Nabelschnurgewebestücke nach Spülung mit plasmabehandelter 0,9% NaCl Lösung (PTL) auf CASO-Agar nach Inkubation bei 37 °C für 48 Stunden

Mit geringfügigen Modifikationen wurde das Protokoll des Projektpartners FBN für die Erstellung der Explantatkultur angewendet. Die folgende Kultivierung erfolgte in MEM-Medium, unter Zusatz von 10% FCS und 1% P/S und 1% Amphotericin B. Die Zellausbeute wurde am Ende durch Zellzahlbestimmung ermittelt.

Nach 29 Tagen betrug die Zellzahl $5,86 \times 10^3$ Zellen/g ($\pm 0,59$) für die indirekte Plasmabehandlung und zwischen $1,06 \times 10^4$ Zellen/g ($\pm 0,35$) bzw. $2,17 \times 10^4$ Zellen/g ($\pm 1,35$) für die direkte Plasmabehandlung. Allerdings war die Zellviabilität mit nur 40% für alle Ansätze sehr gering. Die verwendete Durchfluss-DBE gewährleistete eine stabile und effiziente Plasmaerzeugung und die antimikrobielle Wirksamkeit auf Gewebeproben konnte in Waschflüssigkeit als auch auf einem Großteil der Gewebeproben gezeigt werden. Gleichzeitig ermöglichte die Behandlung des Nabelschnurgewebes mit der Durchfluss-DBE die Gewinnung von proliferationsfähigen Zellen.

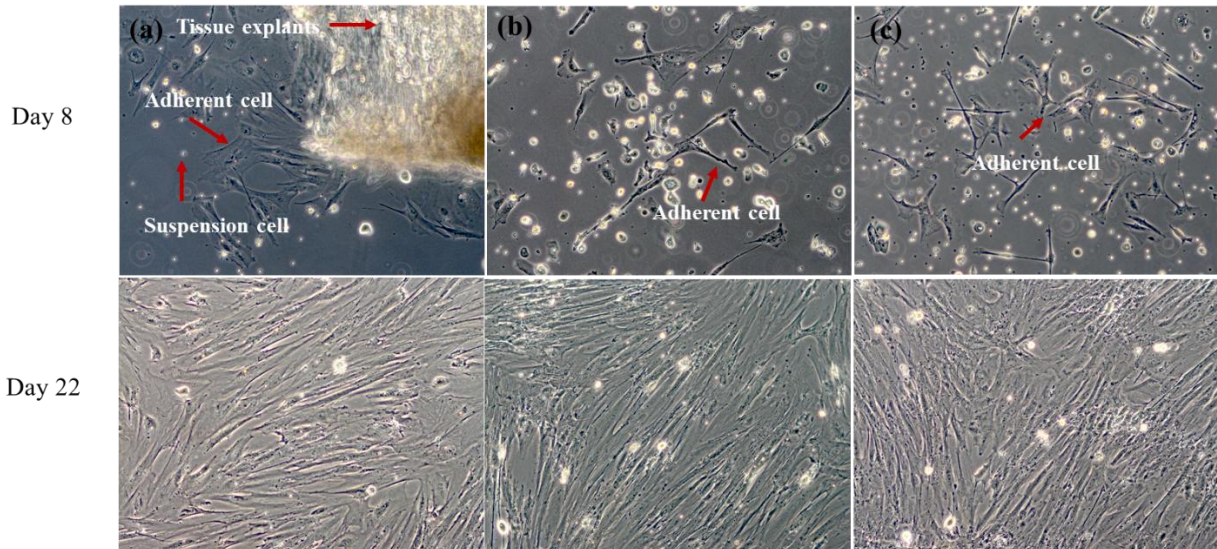


Abbildung 8. Mikroskopische Aufnahmen einer Explantatkultur von Nabelschnurgewebe nach Tag 8 (day 8) und Tag 22 (day 22). Neben dem Gewebestück sind spindelförmige adhärenente Zellen zu finden sowie nicht adhärenente Zellen. Nach 22 Tagen hat sich eine konfluente Zellkultur ausgebildet. Links: Kultur nach Spülung mit Antibiotika-Lösung, Mitte: Kultur nach einmaliger Spülung mit PTL, rechts: Kultur nach zweimaliger Spülung mit PTL. Phasenkontrastmikroskop, Vergrößerung x100

1.6. Ergebnisse Mikrowellen-Plasmaquelle (PLexc2)

Bei der vierten untersuchten Plasmaquelle handelt es sich um eine Mikrowellen-Plasmaquelle, die plasmaprozessierte Luft erzeugt, welche anschließend in einem geschlossenen Container in eine Flüssigkeit eingeleitet wird (Abbildung 9). Mit dieser Plasmaanlage können große Volumen plasmabehandelte Flüssigkeit erzeugt werden. Abbildung 9 zeigt den Aufbau im Labor.

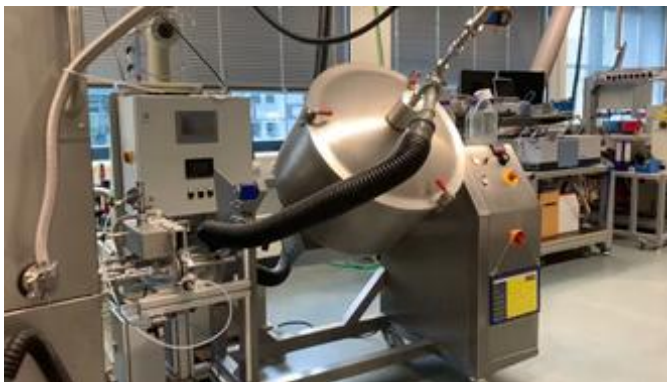


Abbildung 9. Mikrowellen Plasmaentladung zur Erzeugung einer plasmabehandelte Flüssigkeit. In der Anlage wird plasmaprozessierte Luft durch eine Flüssigkeit geleitet und gemischt. Für unsere Anwendung wurden innerhalb von 4 min 4 L Flüssigkeit behandelt.

Für unsere experimentelle Anwendung stellten wir lediglich 4 L plasmabehandelte Flüssigkeit in 4 min her. Die physikochemischen Analysen zeigten eine deutliche Absenkung des pH-Wertes auf 1,9 bis 2,01 in NaCl-Lösung und eine geringe Anreicherung mit reaktiven Stickstoffspezies (NO_2^- 6,46 mM, NO_3^- 7,03 mM). Es ist zu erwarten, dass durch die Bildung von HNO_3 und HNO_2 eine gute antimikrobielle Wirksamkeit erzielt werden kann. Aufgrund der Art der Generierung über

plasmaprozessierte Luft bleibt die Temperatur der plasmabehandelten Flüssigkeit konstant.

Die Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirksamkeit auf Nabelschnurgewebe zeigten eine effektive Reduktion der KbE. So konnten nach 5- und 10-minütiger Spülung keine KbE auf CASO-Agar und in CASO-Bouillon nachgewiesen werden. Zur Unterstützung wurde ein Schritt mit mechanischer Schüttlung aufgenommen. Allerdings war die Gewebeintegrität der Nabelschnüre ebenfalls stark beeinträchtigt, sodass im Ergebnis keine Stammzellen isoliert werden konnten.

Dem wurde begegnet, indem eine Inkubation in einer Recovery-Lösung bestehend aus Zellkulturmedium an die Plasmabehandlung angeschlossen wurde. Dadurch konnte die Zellausbeute in der anschließenden Explantatkultur deutlich verbessert werden und erreichte 11.7×10^4 Zellen /g (± 7.6) für 4h Inkubation und 7.62×10^4 Zellen /g (± 5.55) für 24h Inkubation.

In einem folgenden Schritt wurde das Protokoll weiter optimiert. Durch die Einführung einer zwischengeschalteten Ultraschallbehandlung zur Unterstützung der antimikrobiellen Wirksamkeit der plasmabehandelten Lösung wurde gleichzeitig die Zellausbeute gesteigert. So wurden im Ergebnis Zellausbeuten von 4.50×10^5 Zellen/g (± 2.22)(5 min) bzw. 2.61×10^5 Zellen/g (± 2.18)(10 min) erreicht.

Durch eine Kombination der Reinigung in plasmabehandelter Flüssigkeit mit Ultraschallbehandlung und Schüttlung konnte das Protokoll weiter optimiert werden. Der Workflow ist in Abbildung 10 dargestellt.

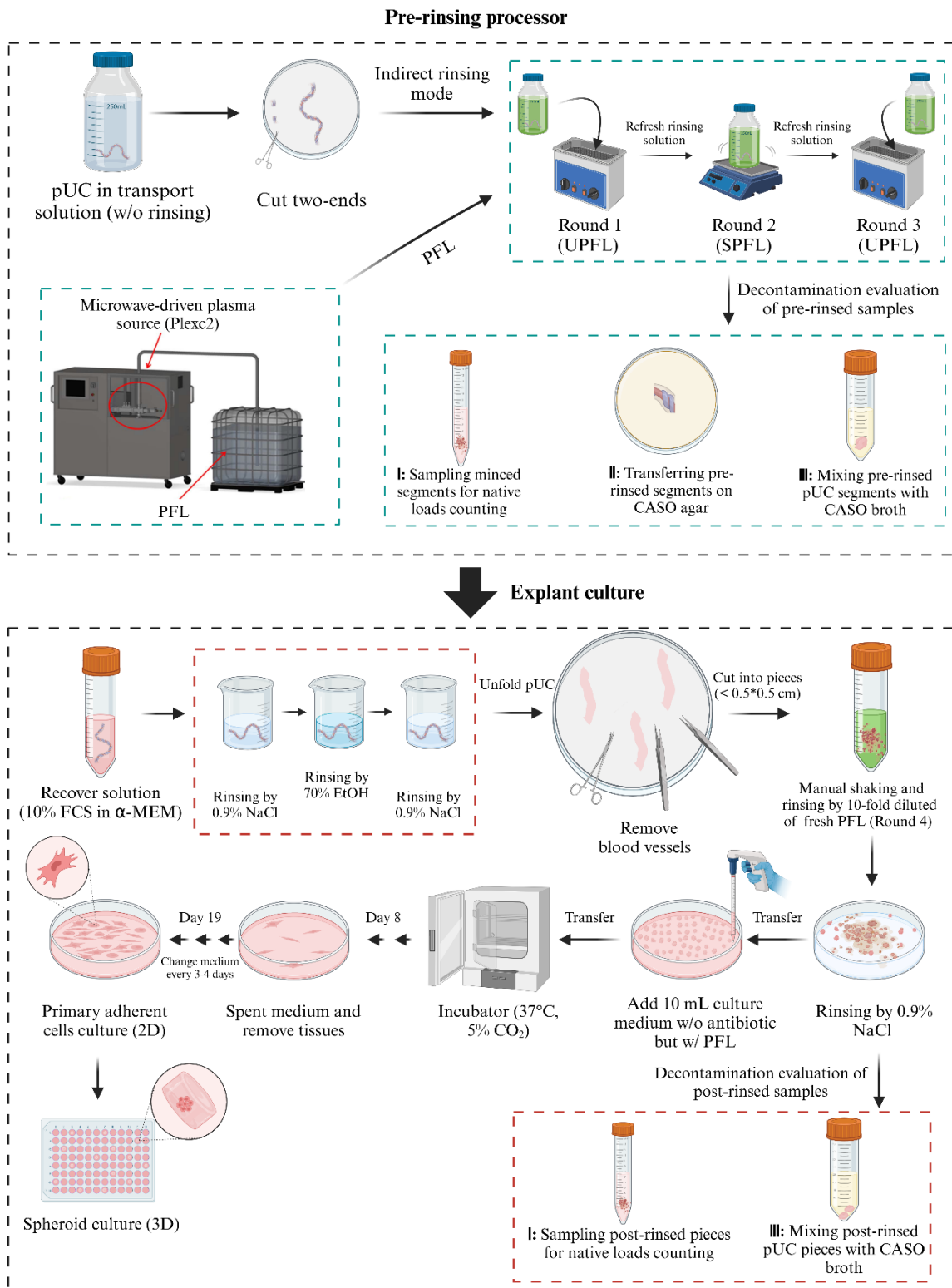


Abbildung 10. Workflow zur Dekontamination der Nabelschnurgewebe mit einer plasmabehandelten Flüssigkeit in (Mikrowellen-Plasmaanlage) in Kombination mit Ultraschallapplikation und Schüttlung (oberer Kasten). Die Explantatkultur (unterer Kasten) dient der Gewinnung der Stammzellen (2D), die anschließend in 3D Kulturen überführt wurden. Im gesamten Prozess wurden keine Antibiotika eingesetzt.

Im Ergebnis konnte eine komplette und anhaltende Dekontamination der Nabelschnüre erreicht werden, die auch in der sehr sensitiven Anzucht in CASO-Bouillon kein mikrobielles Wachstum anzeigte. Die Zellausbeute nach der Explantatkultur betrug 5.45×10^5 Zellen/g (± 1.94) für 5 min und 1.14×10^5 Zellen/g (\pm

1.33) für 10 min Behandlung, was dem Niveau der positiven Kontrolle entspricht (5.78×10^5 cells/g (± 2.95) isoliert mit Antibiotikazusatz).

Um die Funktionalität der Zellen initial zu beurteilen, wurden die isolierten Zellen in eine 3D-Zellkultur überführt und zur Bildung von Sphäroidstrukturen angeregt. Nach 3 bis 5 Tagen waren deutliche runde Sphäroide erkennbar, die sich hinsichtlich ihres Durchmessers nicht von den Kontrollen unterschieden (1.8×10^2 (± 0.41) und 1.74×10^2 (± 0.26) μm). Die Kontrollzellen wurden mit Antibiotikälösung behandelt (Abbildung 11).

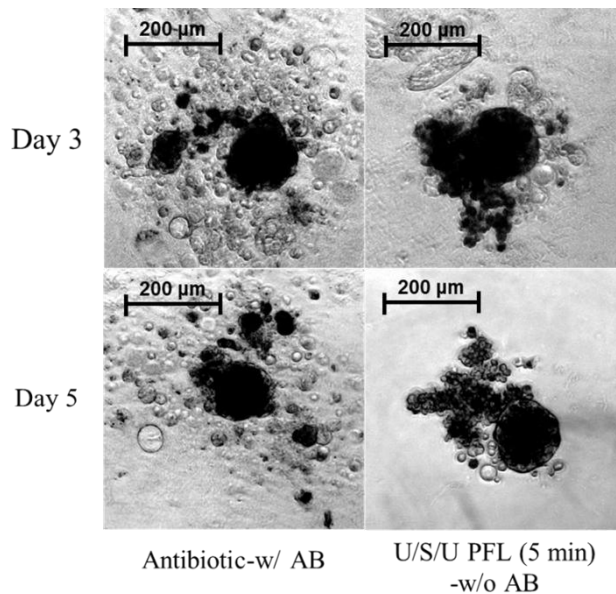


Abbildung 11. 3D-Kultur der isolierten Stammzellen am Tag 3 und Tag 5. Sphäroidbildung ist als kreisrunde Formierung zu erkennen. Nicht alle Zellen schließen sich dem Zellverbund an.

1.7. Vergleichende Zusammenstellung der Leistungsfähigkeit der Plasmaquellen

Im Folgenden sind für alle verwendeten Plasmaquellen die genutzten Parameter (Volumen, Behandlungszeit, Behandlungsart) sowie resultierende Temperatur und Applikationsmöglichkeit zusammengefasst.

Tabelle 3. Zusammenstellung der verwendeten Plasmaquellen und deren wichtigste Leistungseigenschaften im Sinne der Verwendung für die Dekontamination von Gewebe

Plasma- quelle	Entladungstyp	Behandeltes Medium	Behandlungs- Volumen/Zeit	Gewebe		pH	Applikation		Bemerkung
				direkt + indirekt -	T (°C)		möglich ✓ nicht möglich x		
wINPlas	Funknentladung (4 pins)	0.9% NaCl	500 mL, 30 min	-	< 40 °C	5.66→2.35	✓		
		0.9% NaCl	500 mL, 30 min	+	> 50 °C		x	T zu hoch	
wINPlas XXL	Funknentladung (20 pins)	0.9% NaCl	6 L, 10 min	-	RT	7.31→4.52	✓		
		0.9% NaCl	6 L, 20 min	-	RT	7.31→3.35	✓		
		0.9% NaCl	6 L, 30 min	-	RT	7.31→3.04	✓		
		0.9% NaCl	6 L, 60 min	-	RT	7.31→2.63	✓		
		0.9% NaCl	6 L, 60 min	+	RT		x	Mögliche Kontamination des Systems	
Durchfluss- DBE	DBE	0.9% NaCl	3 L, 30 min at high power	+	< 40 °C	5.66→3.47	✓		
		0.9% NaCl	500 mL, 15 min at high power	-	< 60 °C	5.66→3.01	✓		
		0.9% NaCl	500 mL, 30 min at low power	+	< 40 °C	5.66→3.74	✓		
Plexc2	Mikrowelle	0.9% NaCl	4 L, 4 min at a volume flow rate of 63 slm	-	RT	5.66→1.99	✓	Keine direkte Behandlung von Gewebe möglich	

1.8. Begleitende Untersuchungen mit analogen chemischen Tests

Da die antimikrobielle Wirksamkeit und eine gute Zellausbeute mit den untersuchten Plasmasystemen bereits sehr gut realisiert werden konnte, wurde das AP4.5 verändert. Auf die Untersuchung einer weiteren, wahrscheinlich weniger potenten Plasmaquelle (geplant war ein Plasmajet) wurde zugunsten von Simulationsexperimenten verzichtet. Diese analogen chemischen Tests sollen die Wirksamkeit der chemischen Spezies für diese spezielle Anwendung nachstellen und unterschiedliche Kompositionen von chemischen Spezies auf die antimikrobielle Wirksamkeit und die Gewebeverträglichkeit untersuchen. Basierend auf den zuvor beschriebenen unterschiedlichen Plasmaquellenkonfigurationen unterschieden sich die chemischen Komponenten in plasmabehandelten Flüssigkeiten und damit auch deren Wirksamkeit gegen Mikroorganismen. Um ein besseres Verständnis für diese Prozesse zu erlangen, wurden analoge chemische Tests zur Bewertung der produzierten Konzentration primär langlebiger Spezies (NO₂- und H₂O₂) durchgeführt.

Dazu wurden 3 Testlösungen mit NaNO₂- und H₂O₂-Lösungen mit jeweils unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 4). K₂HPO₄ und H₃ Citrat wurden der H₂O₂-Lösung zugegeben, um einen definierten pH-Wert zu gewährleisten. Der Ausgangs-pH-Wert nach dem Mischen der Lösungen betrug 4,0.

Tabelle 4. Zusammensetzung der Testlösungen mit variablen Konzentrationen H₂O₂ und NO₂ bei gleichem pH-Wert von 4.

	[H ₂ O ₂] (mM)	[NO ₂ ⁻] (mM)	[K ₂ HPO ₄] (mM)	[C ₆ H ₈ O ₇] (mM)
Sol #1	120	60	25	50
Sol #2	200	100	50	100
Sol #3	400	200	100	150

Im Ergebnis zeigte sich, dass auf CASO-Agar für alle Proben nach dem Spülen mit den verschiedenen chemischen Lösungen (Sol #1, Sol#2, Sol#3) keine kultivierbaren Kolonien in der Spüllösung nachweisbar waren. Jedoch konnte bis auf die mit Lösung #3 gewaschenen Gewebeproben mikrobielle Besiedlung nachgewiesen werden, wenn Gewebestückchen auf CASO-Agar inkubiert wurde. Dieses Ergebnis wurde mit der sensitiveren Anzucht in CASO-Bouillon bestätigt. Auch mit dieser sensitiveren Nachweismethode zeigte sich, dass die Bakterienlast eliminiert werden konnte, wenn die entsprechend hohen Konzentrationen an H₂O₂ und NO₂ bei dem passenden pH-Wert verwendet wurden.

Weiterhin sollten auch aus diesen Gewebeproben Stammzellen isoliert werden. Im Ergebnis zeigte sich, dass keine anhaftenden Zellen beobachtet werden konnten, nachdem die Proben mit Lösung #3 gespült wurden. Obwohl die Kulturzeit verlängert wurde. Ausschließlich Lösung #3 wurde für die Zellkultivierung verwendet, da bei den anderen Lösungen Bakterienwachstum festgestellt wurde.

Insgesamt zeigen die analogen chemischen Tests deutlich, dass eine hohe Konzentration an reaktiven Spezies vorteilhaft für die Dekontaminationswirkung ist. Jedoch haben die Zellkultivierungsversuche offenbart, dass diese hohe Konzentration schädlich für die Zellen des Gewebes sein kann. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der gleichzeitigen Optimierung mehrerer Parameter sowie die Besonderheit bei dem Einsatz von Plasmatechnologie für diese Anwendung.

2. wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

Dem Projekt standen im Förderzeitraum insgesamt 257.297,97 € zur Verfügung. Die zur Verfügung gestellten Mittel wurden vollumfänglich ausgeschöpft und sachgerecht im Sinne der Projektziele eingesetzt. Die Mittelverwendung verteilt sich im Wesentlichen auf die folgenden Hauptpositionen:

Personalkosten, Verbrauchsmaterial und Dienstreisen.

Der größte Teil der Fördermittel entfiel auf den Bereich Personal. Dies spiegelt den arbeitsintensiven Charakter des Vorhabens wider, bei dem umsetzungsbezogene Forschungsaufgaben durch qualifiziertes Personal zu bewältigen waren. Die Personalkosten umfassen die Vergütung von Projektmitarbeitenden gemäß den im Antrag zugrunde gelegten Entgeltgruppen und Arbeitszeiten. Sie machten den wesentlichen Anteil der Gesamtausgaben aus.

Ein weiterer Posten im Mittelabruf war der Erwerb von Verbrauchsmaterialien, die im Rahmen der Projektdurchführung erforderlich waren. Für die Veröffentlichung einer Publikation unter open-access-Bedingungen wurden ebenfalls Projektmittel eingesetzt.

Ein Teil der Mittel wurde für Dienstreisen verwendet. Diese dienten insbesondere der Teilnahme an projektbezogenen Veranstaltungen, Abstimmungsterminen mit Projektpartnern sowie der Ergebnisverbreitung im Rahmen von Fachkonferenzen:

- 10. International Conference on Plasma Medicine (ICPM10), Portorož/Portorose, Slovenia, 8.-15. September 2024 und
- 10. International Scientific Conference on Cultured Meat (ISCCM10), Maastricht, Niederlande, 17.-19. November 2024

Die Reisen trugen wesentlich zur fachlichen Vernetzung und Verankerung des Projekts bei.

3. die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die durchgeführten Arbeiten und damit verbundenen Ausgaben entsprechen den im Projektantrag dargestellten Vorhaben. Sie waren für die Erfüllung der Vorhabenziele notwendig. Die im Vorhaben erzielten Ergebnisse und die bei der Bearbeitung gewonnenen Methodenkenntnisse liefern einen wichtigen Beitrag zur Forschung zu zellbasierten Lebensmitteln insgesamt und zu zellbasiertem Fleisch im Besonderen. Ohne die bereitgestellte Förderung hätten die Arbeiten nicht durchgeführt werden können.

4. der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft - im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Ergebnisse sind von großem Nutzen für den Herstellungsprozess von kultiviertem Fleisch und zellbasierten Lebensmitteln allgemein. Es konnte im Projektverlauf gezeigt werden, dass mit plasmabehandelten Flüssigkeiten Gewebeproben dekontaminiert werden können ohne die Gewebeintegrität zu schädigen. Damit bietet dieses Verfahren ein Alleinstellungsmerkmal gegenüber bestehenden Prozessen, die auf dem Einsatz von Antibiotika basieren. Dieses Verfahren könnte auch für andere Anwendungen in der Herstellung von Zellprodukten oder für medizinische Applikationen von Interesse sein, beispielsweise beim Tissue Engineering.

Ein hohes Verwertungspotenzial ergibt sich daraus, dass das Gesamtkonzept von Anfang an auf hohe Qualität im Sinn von „Clean Meat“ ausgerichtet war. Dazu gehört, dass wir ohne toxische Substanzen oder gentechnische Verfahren auskommen können und die Problembereiche Antibiotika und FKS/teure Medien adressiert haben. Somit sind mit einer Reduktion der Herstellungskosten und Erhöhung der Akzeptanz möglicher Produkte bei potentiellen Nutzern in der Industrie und Konsumenten zu rechnen.

Durch die Erschließung dieser neuen Anwendung für die Plasmatechnologie werden weitere Forschungsaktivitäten zu zellbasiertem Fleisch geplant.

5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Das Thema zellbasiertes Fleisch ist zurzeit sehr innovativ und entwickelt sich rasant. Neben den Entwicklungen zu kultiviertem Fleisch sind auch Entwicklungen zu kultiviertem Fisch und Seafood auf dem Vormarsch. Dies ist deutlich an der zunehmenden Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen in den letzten Jahren (2019: 7 vs. 2024: 151) und den gestiegenen Patentanmeldungen (2019: ca. 40 vs. 2023: 190) zu erkennen (Good Food Institute (GFI) 2024 State of the industry report / Cultivated meat, seafood and ingredients).

Konkrete Fortschritte zur Nutzung von Plasmatechnologie bei der Gewinnung von Ausgangszellen oder in der Herstellung von zell-basiertem Fleisch bei Dritten, die Einfluss auf Inhalt oder Nutzung von Projektergebnissen hätten, sind uns nicht bekannt.

6. Veröffentlichungen

Publikationen:

1. Pogoda, Alexander, Pan, Yuanyuan, Röntgen, Monika & Hasse, Sybille (2024). Plasma-Functionalized Liquids for Decontamination of Viable Tissues: A Comparative Approach. *Int J Mol Sci*, 25(19). <https://doi.org/10.3390/ijms251910791>
2. Zum Zeitpunkt der Berichterstellung ist eine weitere wissenschaftliche Publikation in Arbeit: Pan, Yuanyuan, Pogoda, Alexander, Röntgen, Monika, Kolb, Jürgen F., Hasse, Sybille mit dem Arbeitstitel „Enhanced decontamination efficiency on umbilical cord tissue by combining plasma-functionalized liquid and ultrasound: An innovative antibiotic-free process for cultivated meat production“, die Ergebnisse des Projektes beinhaltet.

Vorträge:

Pogoda, Alexander*, Pan, Yuanyuan, Hasse, Sybille:
Plasma-mediated decontamination of animal tissue samples: a novel approach towards antibiotic-free applications auf der 10. International Conference on Plasma Medicine (ICPM10), Portorož/Portorose, Slovenia, 8.-15. September 2024

Posterpräsentationen:

Pan, Yuanyuan*, Pogoda, Alexander, Kolb, Jürgen F., Röntgen, Monika, Hasse, Sybille: *Potential application of plasma-functionalized liquid for tissue decontamination* auf der 10. International Scientific Conference on Cultured Meat (ISCCM10), Maastricht, Niederlande, 17.-19. November 2024

*Konferenzteilnehmer/in

Pressemitteilungen:

Im Projektzeitraum gab es einige Pressemitteilungen und Berichte in Zeitschriften:

<https://lebensmittelpraxis.de/industrie-aktuell/43436-wissenschaftler-prognose-zellkultivierte-fleischprodukte-moeglicherweise-2035-auf-dem-markt.html>

<https://www.tageskarte.io/politik/detail/cellzero-meat-bund-foerdert-forschung-an-laborfleisch.html>

<https://biooekonomie.de/nachrichten/neues-aus-der-biooekonomie/mit-stammzellen-aus-nabelschnurblut-fleisch-produzieren>

<https://www.zeit.de/news/2023-01/09/millionenfoerderung-fuer-laborfleischforschung-cellzero-meat>

<https://vegconomist.de/kultiviertes-fleisch-zellkultur-biotechnologie/kultiviertes-fleisch/cellzero-meat-kultiviertes-fleisch/>

<https://circular-technology.com/forschungskonsortium-fuer-zellbasiertes-fleisch/>

Ostsee-Zeitung am 02.03.2023 „Forscher arbeiten am Schnitzel aus dem Labor“