



Methodenentwicklung zur Charakterisierung sporenbildender Pilz-Seedingkulturen

Becky Sommer



ibvt-Schriftenreihe

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik
der Technischen Universität Braunschweig

Herausgegeben von Prof. Dr. Christoph Wittmann

Band 60

**Cuvillier-Verlag
Göttingen, Deutschland**



Herausgeber
Prof. Dr. Christoph Wittmann
Institut für Bioverfahrenstechnik
TU Braunschweig
Gaußstraße 17, 38106 Braunschweig
www.ibvt.de

Hinweis: Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliographie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2011

© Cuvillier-Verlag Göttingen 2011
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten

Dieses Werk - oder Teile daraus - darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form - elektronisch, fotomechanisch, auf Tonträger oder sonst wie - übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2011
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-86955-851-6
ISSN 1431-7230



Methodenentwicklung zur Charakterisierung sporenbildender Pilz-Seedingkulturen

Bei der Fakultät für Maschinenbau
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde
einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)
genehmigte Dissertation

von Frau Dipl.-Biotechnol. Becky Sommer
aus Magdeburg

eingereicht am: 08.06.2011
mündliche Prüfung am: 13.07.2011

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. - Ing. Dietmar C. Hempel
1. Referent: Prof. Dr. Rainer Krull
2. Referent: Jun.-Prof. Dr. André Fleißner

2011





Danke!

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an Prof. Dr.-Ing. Dietmar C. Hempel richten, der mir die Dissertation am Institut ermöglichte und mit seiner Erfahrung und seinem unermüdlichen wissenschaftlichen Interesse sowie nützlichen Ratschlägen zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Rainer Krull, der mir sehr viel Vertrauen entgegen brachte, mich stets in meiner Arbeit unterstützte sowie für die Übernahme des Referates.

Prof. Dr. Andre Fleißner sei für die Übernahme des Koreferates sowie die wertvollen, fachspezifischen Ratschläge gedankt.

Bei der Bayer Health Care AG bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen eines industriellen Kooperationsprojektes. Besonders sei Dr. Simone Kardinahl sowie den Mitarbeitern der Abteilung für Mikrobiologie für die sehr hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die hervorragende Planung unserer Besuche gedankt.

Ebenso gilt mein großer Dank Prof. Dr. Robert Hänsch vom Institut für Pflanzenbiologie für die Einweisung in die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Nicht nur die wertvollen, fachspezifischen Ratschläge sondern auch die stets freundliche Arbeitsatmosphäre ließ mich immer wieder gern in dieses Institut kommen.

Bei Herrn Dr. Frank Ludwig vom Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik möchte ich mich für die gelungenen Elektronenmikroskop-Aufnahmen bedanken. Matthias Gehder danke ich für die stets gute Zusammenarbeit im Projekt und die Hilfe beim Korrigieren englischer Texte.

Auch möchte ich mich besonders bei René Stellmacher, Dirk Kreyenschulte und Nicole Borchert bedanken, die mich mit unermüdlichem Fleiß in meiner Forschung unterstützt haben und durch ihre Diplom- und Bachelorarbeiten einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Claudi, Katina, Yvonne, Steffi, Nicole und Flo bedanken, die nicht nur für eine großartige, kreativitätsfördernde Arbeitsatmosphäre gesorgt haben, sondern auch fleißig Korrektur gelesen haben, in jeder Situation mit Rat und Tat zur Seite standen und zu wahren Freunden geworden sind. Auch möchte ich mich bei Stefanie bedanken, die nicht nur für ständig neuen Nachschub an Mikroreaktoren sorgte, sondern auch durch die vielen fachlichen und auch freundschaftlichen Gespräche zeigte, dass wir auf einer Wellenlänge liegen. Dem gesamten Team vom Institut für Bioverfahrenstechnik danke ich herzlich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die lustigen Sport-, Spiel- und Spass-Aktionen die den erforderlichen Ausgleich brachten.

Christoph möchte ich meinen großen Dank aussprechen, für das stete Zuhören meiner Pilzphilosophien, das Korrekturlesen und einfach nur da sein.

Mein großer und besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mich immer unterstützt haben, mir die nötige Ruhe gaben, um Kraft zutanken und mir gezeigt haben, die Sicht der Dinge auch mal mit anderen Augen zu sehen.

Braunschweig, im August 2011

Becky Sommer



Methodenentwicklung zur Charakterisierung sporenbildender Pilz-Seedingkulturen

Inhalt: In Produktionsprozessen mit filamentösen Pilzen werden häufig Sporen als Starterkulturen für submerse Kultivierungen verwendet. Dabei ist es essentiell, spezifische Charakteristika der im Inokulum enthaltenen Sporen zu kennen, da diese den Erfolg und die Reproduzierbarkeit der Kultivierung beeinflussen können. Aufgrund fehlender Analysemethoden war es bislang nicht möglich, spezifische Eigenschaften von Sporen im Inokulum zu erfassen. Im Vordergrund dieser Arbeit steht daher die Etablierung von Verfahren zur Charakterisierung und Qualitätsbestimmung von Sporen in Seedingkulturen. Anhand des Modellorganismus *Aspergillus ochraceus* wird gezeigt, dass ein auf Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie basierender Lebend/Tot-Viabilitätstest zur Quantifizierung membranintakter, keimfähiger Sporen geeignet ist. Weiterhin wird dargestellt, dass der FDA-Assay die Biomasseaktivität in der Anfangsphase submerser Kultivierung erfasst und damit erste Voraussagen über den Erfolg der Kultivierung möglich sind. Zudem wird die Anwendbarkeit des Tetrazoliumsalzes MTT zur Detektion der respiratorischen Aktivität von Sporensuspensionen bestätigt. Der Polyolgehalt der Sporen korreliert mit dem Keimungspotential und kann damit ebenfalls als Qualitätsindikator von Seedingkulturen herangezogen werden. Die in dieser Arbeit etablierten Analysemethoden werden zur Identifizierung optimaler Sporulationsparameter für maximale Sporenausbeuten mit hoher Sporenqualität eingesetzt. Dabei korrelieren die Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden untereinander sowie mit dem Biomassewachstum und der Biotransformationsleistung im submersen Kultivierungsprozess.

Mit Hilfe der hier entwickelten Methoden zur Charakterisierung und Gütebestimmung von Seedingkulturen sind nun bereits vor Beginn der Kultivierung Aussagen über deren Erfolg bzw. Misserfolg möglich. Weiterhin können Rückschlüsse auf optimale Sporulationsbedingungen erhalten und zukünftig Sporensuspensionen hoher Viabilität hergestellt werden, womit ein Beitrag zur Qualitätssicherung des Kultivierungsverfahrens geleistet wird.

Suchbegriffe: *Aspergillus ochraceus*, filamentöser Pilz, Sporen, Sporulation, Qualitätssicherung, Inokulum, Viabilität

Method development for characterization of seeding cultures of spore-forming fungi

Content: In production processes with filamentous fungi, spores are often used as starting culture for submerged cultivations. As these spores strongly affect the success and reproducibility of the cultivation, knowledge of their quality characteristics is essential. Due to the lack of analytical methods it has so far not been possible to detect the specific spore characteristics of inocula. Therefore, the aim of this thesis is the establishment of screening methods for characterizing spore qualities in seeding cultures. In order to quantify viable, membrane intact spores of the model organism *Aspergillus ochraceus*, a live/dead viability assay, based on confocal laser scanning microscopy, is utilized. Furthermore, it is shown that the fluorescein diacetate (FDA) assay enables the determination of biomass activity in the early phase of submerged cultivations and thus reveals first information about the feasibility of the process. In addition, the applicability of the tetrazolium salt MTT for the detection of the respiratory activity of spore suspensions is confirmed. The concentration of carbon storage compounds in spores reveals information about the ability of germination and can therefore be used as a quality indicator of seeding cultures, respectively. The established analytical methods are used to identify optimal sporulation parameters with respect to maximum yields of viable spores. Thereby, a correlation between the results of the different characterization methods is determined. Additionally, these results correlate with biomass growth and biotransformation performance in the submerged cultivation process, whereby their applicability for determination of spore viability is confirmed. With the help of the established methods for characterization and evaluation of seeding cultures, presented in this work, the success or failure of cultivations can be pre-estimated. Furthermore by using these methods, sporulation conditions can be optimized to achieve high yields of viable spores thus contributing to the quality assurance of the production process.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*, filamentous fungi, spores, sporulation, quality assurance, seeding culture, viability

Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Maschinenbau, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Driouch, H.; Sommer, B.; Wittmann, C. (2010b). Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and Bioengineering*, 105 (6):1058-1068.

Demming, S.; Sommer, B.; Llobera, A.; Rasch, D.; Krull, R.; Büttgenbach, S. (2011). Disposable parallel poly(dimethylsiloxane) microbio reactor with integrated readout grid for germination screening of *Aspergillus ochraceus*. *Biomicrofluidics* 5 (1): 014104.

Tagungsbeiträge

B. Sommer, D. Kreyenschulte, N. Borchert, D.C. Hempel, R. Krull: Rapid screening methods for determination of seeding culture quality. (Poster) 1st European Congress on Applied Biotechnology, Berlin (September 2011)

S. Demming, J. Vila-Planas, B. Sommer, A. Edlich, M.J. Lopez-Martinez, E. Verpoorte, R. Krull, E. Franco-Lara, A. Llobera, S. Büttgenbach: Disposable PDMS microbio reactor with integrated online analytics for biotechnological screening. (Poster) DPhG-Jahrestagung, Braunschweig (Oktober 2010).

B. Sommer, M. Gehder, S. Kardinahl, D.C. Hempel, R. Krull: Charakterisierung von *Aspergillus*-Seedingkulturen. (Poster) 100. SFB 578-Kolloquium - Vom Gen zum Produkt, Haus der Wissenschaft, Braunschweig (Juni 2010)

B. Sommer, R. Stellmacher, S. Kardinahl, D.C. Hempel, R. Krull: Determination of viable spores in seeding cultures using fluorescent dyes. (Poster) GVC/DECHEMA: Bioprozess-orientiertes Anlagendesign, Nürnberg (Mai 2010)

H. Driouch, B. Sommer, C. Wittmann: Design and engineering of cellular morphology in *Aspergillus niger* for superior enzyme production. (Poster) GVC/DECHEMA: Bioprozess-orientiertes Anlagendesign, Nürnberg (Mai 2010)

B. Sommer, R. Stellmacher, S. Kardinahl, D.C. Hempel, R. Krull: Determination of viable spores in seeding cultures using fluorescent dyes. (Poster) 10th European Conference on Fungal Genetics, Leeuwenhorst, Niederlande (April 2010)

K. Bohle, B. Sommer, Y. Göcke, R. Hänsch, A. Roth, S. Kneip, P. Dersch, C. Cordes, H. Horn, D. C. Hempel.: Analysing Green Fluorescent Protein production in Biopellets of *Aspergillus niger* using laser scanning microscopy. (Poster) VAAM-Jahrestagung, Osnabrück (April 2007).



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Aktueller Stand der Forschung und Technik	5
2.1	Modellorganismus - Aspergillus ochraceus.....	5
2.2	Fortpflanzung und Wachstum filamentöser Pilze.....	7
2.2.1	Asexuelle Sporenbildung	7
2.2.2	Wachstum unter submersen Kultivierungsbedingungen.....	10
2.3	Einfluss verschiedener Parameter auf die Sporenbildung und Sporeneigenschaften.....	12
2.3.1	Einfluss der Medienzusammensetzung	12
2.3.2	Einfluss der Osmolalität	15
2.3.3	Einfluss weiterer environomischer Parameter	17
2.4	Bestimmung der Zellviabilität.....	21
2.4.1	FDA-Assay.....	21
2.4.2	MTT-Assay.....	22
2.4.3	Lebend/Tot-Viabilitätstest	23
2.4.4	Keimungspotential von Sporen	25
2.4.5	Speicherstoffe in Sporen filamentöser Pilze	26
3	Material und Methoden.....	29
3.1	Verwendeter Mikroorganismus.....	29
3.2	Chemikalien.....	29
3.3	Medien und Lösungen.....	29
3.3.1	Festmedien	29
3.3.1.1	Komplexmedien	29
3.3.1.2	Minimalmedien.....	30
3.3.2	Flüssigmedien.....	32
3.4	Stammkonservierung	32
3.5	Optimierung der Sporenernte.....	32
3.6	Sporenanzucht unter variierten Sporulationsbedingungen	33
3.6.1	Variation der Inkubationsdauer	34
3.6.2	Variation der Inkubationstemperatur.....	34
3.6.3	Variation der Lichtbedingung	34
3.6.4	Variation der Inokulumkonzentration	35
3.6.5	Variation des Salzgehaltes des Mediums	35
3.6.6	Variation der Medienzusammensetzung.....	36



3.7	<i>Charakterisierung der Seedingkulturen</i>	36
3.7.1	Bestimmung der Sporenkonzentration.....	36
3.7.2	Bestimmung der Sporenaktivität.....	37
3.7.2.1	MTT-Assay.....	37
3.7.2.2	FDA-Assay.....	38
3.7.3	Bestimmung des Keimungspotentials von Sporen	39
3.7.4	Bestimmung der Sporenbeschaffenheit.....	41
3.7.4.1	Lebend/Tot-Viabilitätstest	41
3.7.4.2	Bestimmung der Kohlenhydrat- und Polyolkonzentration	42
3.7.5	Biomassewachstum und Produktivität in submerser Kultivierung.....	43
3.7.5.1	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration.....	45
3.7.5.2	Bestimmung der Edukt- und Produktkonzentration	45
4	Ergebnisse und Diskussion	47
4.1	<i>Optimierung der Sporenernte</i>	47
4.2	<i>Methodenetablierung zur Charakterisierung von Seedingkulturen</i>	50
4.2.1	Bestimmung membranintakter Sporen mittels Lebend/Tot-Viabilitätstest	50
4.2.2	Bestimmung der Biomasseaktivität in Submerskultur mittels FDA-Assay	54
4.2.3	Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay	57
4.3	<i>Sporenbildung und Sporeneigenschaften als Funktion environomischer Parameter</i>	61
4.3.1	Sporenbildung.....	62
4.3.1.1	Einfluss der Inkubationsdauer.....	62
4.3.1.2	Einfluss der Temperatur.....	63
4.3.1.3	Einfluss der Lichtbedingung.....	64
4.3.1.4	Effekt erhöhter Salinität.....	65
4.3.1.5	Einfluss der Medienzusammensetzung	67
4.3.1.6	Einfluss der Inokulumkonzentration	76
4.3.2	Sporeneigenschaften	78
4.3.2.1	Effekt erhöhter Salinität.....	78
4.3.2.2	Einfluss der Zusammensetzung von Komplexmedien	87
4.3.2.3	Einfluss der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Minimalmedium.....	91
4.4	<i>Vergleichende Bewertung der Methoden zur Charakterisierung von Seedingkulturen</i>	100
5	Zusammenfassung und Ausblick	103
6	Abkürzungen und Symbole	107
7	Literatur	109

1 Einleitung und Zielsetzung

In der heutigen Zeit gewinnen biotechnologische Verfahren aufgrund ihrer Nachhaltigkeit zusehends an Bedeutung. Durch das Bestreben, herkömmliche chemische Prozesse durch sowohl ökologisch als auch ökonomisch wertvollere biotechnologische Verfahren zu ersetzen bzw. zu ergänzen, rückt auch die Wahl geeigneter Produktionsorganismen in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.

Filamentöse Pilze bieten aufgrund ihrer metabolischen Vielfalt und der Möglichkeit posttranslationale Modifikationen durchzuführen, ein breites Anwendungsspektrum und werden bereits in einer Vielzahl industrieller Prozesse eingesetzt. Hierzu zählen beispielsweise die Produktion von organischen Säuren, Exopolysacchariden sowie verschiedener homologer und heterologer Enzyme [Fuchs et al., 2007; Magnuson et al., 2004; Schmid, 2002; Schuster et al., 2002]. Zunehmend werden sie auch in der Arzneimittelindustrie zur Herstellung komplexer, pharmazeutisch wirksamer Substanzen verwendet. Ein bekanntes Beispiel stellt diesbezüglich die Synthese von Penicillin unter Verwendung des Pilzes *Penicillium chrysogenum* im großtechnischen Maßstab dar.

Dabei steht die fortwährende Optimierung dieser Kultivierungsprozesse im Hinblick auf hohe Raum-Zeit-Ausbeuten und der Reduktion von Nebenprodukten im Fokus vieler Untersuchungen. Für eine medizinische Produktapplikation müssen im Zuge dessen auch die Kriterien der Good-Manufacturing-Practise (GMP), was speziell die Reproduzierbarkeit des Verfahrens erfasst, erfüllt sein. Letzteres sowie die Kultivierung selbst gestalten sich jedoch aufgrund der Komplexität biologischer Systeme und vielfältiger Einflussfaktoren als diffizil, so dass die Produktausbeuten großen Schwankungen unterliegen. Insbesondere vor dem Hintergrund industrieller Kultivierungen mit Volumina von mehreren hundert Kubikmetern sind derartige Varianzen oder gar Fehlkultivierungen ökonomisch und ökologisch von großem Nachteil.

Während diesbezüglich der Effekt verschiedener Kultivierungsparameter auf die Morphologie und Produktivität in zahlreichen Forschungsprojekten eruiert wird, ist der Einfluss der Sporeneigenschaften im Inokulum auf das anschließende Verhalten im Produktionsprozess bislang wenig untersucht. Da Sporen jedoch häufig als Starterkulturen, sogenannte Inokula oder Seedingkulturen, in submersen Kultivierungen verwendet werden und damit den Ausgangspunkt des Produktionsprozesses darstellen, gewinnt dieser Forschungsaspekt zunehmend an Bedeutung.

Zudem weisen frühere Arbeiten darauf hin, dass eine erhebliche Anzahl an physiologischen Faktoren sowohl die Sporenbildung als auch die Eigenschaften der unter diesen Bedingungen gebildeten Sporen hinsichtlich Stabilität, Keimungs- oder Widerstandsfähigkeit beeinflussen können. In Versuchen mit *Talaromyces flavus* wurde beispielsweise die Quantität und Qualität der gebildeten Sporen maßgeblich durch die vorliegende

Stickstoffquelle beeinflusst [Engelkes et al., 1997]. Weiterhin konnte bei *Paecilomyces fumosoroseus* durch einen hohen Stickstoffgehalt eine gesteigerte Sporenbildung sowie eine erhöhte Proteinkonzentration ermittelt werden, woraus eine höhere Keimungsgeschwindigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Gefriertrocknung resultierten [Cliquet et al., 2005].

Der Sporulationsprozess wird darüber hinaus durch die Osmolalität des Sporulationsmediums beeinflusst. In der Literatur wird in Versuchen mit *Aspergillus nidulans* eine gesteigerte Sporenbildung durch eine 0,5 bis 1 M Salzkonzentration beschrieben [Beever et al., 1986; Han et al., 2003]. Für *A. niger* erwiesen sich für den Erhalt maximaler Sporenausbeuten geringere NaCl-Konzentrationen von 0,16 M als optimal, während für *A. flavus* durch eine erhöhte Salinität ausschließlich eine Inhibierung der Sporenbildung zu verzeichnen war [Mert et al., 1977, 1987]. Trotz unterschiedlicher Ergebnisse bezüglich der optimalen Salzkonzentration im Medium für eine maximale Sporenbildung, konnte in zahlreichen Organismen gleichermaßen unter erhöhter Osmolalität eine gesteigerte Akkumulation verschiedener Polyole, sogenannter kompatibler Solute, festgestellt werden, wobei die Konzentration der jeweiligen Polyole in Abhängigkeit von der untersuchten Mikroorganismen-Spezies variiert. In der Literatur wird gegenwärtig kontrovers über die Funktion der verschiedenen Polyole diskutiert. Neben dem Schutz vor einer Dehydratation unter hyperosmotischen Bedingungen wird angenommen, dass eine bestimmte Polyolkonzentration in Sporen das Quellverhalten dieser während der frühen Keimungsphase unterstützt [Hallsworth et al., 1994; Judet et al., 2008]. Zudem werden eine Reihe weiterer physiologischer Prozesse beschrieben, in denen Polyole als Kohlenstoffspeicher, Antioxidantien, Reduktantien und Osmolytika wesentlich involviert sind [Ruijter et al., 2003; Witteveen et al., 1995].

Insgesamt werden in der Literatur konträre Ergebnisse über die Auswirkungen des Sporulationsumwelts in Abhängigkeit vom untersuchten Mikroorganismus beschrieben. Folglich können kaum allgemeingültige Aussagen über optimale Sporulationsbedingungen getroffen werden, die ohne weiteres auf den hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* übertragen werden können.

Da vor allem für industrielle Kultivierungsmaßstäbe stetig hohe Sporenmengen benötigt werden und gleichzeitig homogene Seedingkulturen mit Sporen hoher Viabilität für reproduzierbare Produktausbeuten unerlässlich sind, sollen im Rahmen der Arbeit gebräuchliche Verfahren zur Sporenerstellung sowie die erzeugten Sporensuspensionen charakterisiert werden. Derzeit sind jedoch noch keine standardisierten Methoden zur schnellen, zuverlässigen Erfassung der Sporeneigenschaften und -qualität in Seedingkulturen Stand der Technik, die bereits vor Beginn der Kultivierung deren Erfolg oder Misserfolg indizieren.

Bisher angewandte Methoden zur Ermittlung der Sporenvitalität, wie die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (Colony Forming Units, CFU), sind mit großem Arbeits- und

Zeitaufwand verbunden. Weitere farbstoffbasierte Methoden zur Bestimmung der Zellviabilität setzen entweder sehr lange Inkubationszeiten voraus oder können bislang die melanisierten Sporenwände nicht durchdringen. Zudem treten häufig Hintergrundfluoreszenzen auf, woraus keine eindeutigen und verlässlichen Testergebnisse resultieren.

Im Vordergrund dieser Arbeit steht daher die Etablierung von Verfahren zur Charakterisierung und Qualitätsbestimmung von Sporen von *Aspergillus ochraceus*. Das Ziel besteht darin, durch die entwickelten Methoden optimale Bedingungen für eine maximale Sporenproduktion mit hoher Sporenqualität hinsichtlich des Wachstums und der Eduktumsetzung im anschließenden Kultivierungsprozess zu bestimmen.

Zur Bearbeitung dieser Aufgabenfelder soll im Rahmen der Arbeit nach einer fundamentalen Charakterisierung des Sporulationsverhaltens von *A. ochraceus* eine Optimierung der Verfahren zur Sporenerzeugung und -ernte durchgeführt werden.

Weiterhin gilt es, Indikatoren zur standardisierten Qualitätskontrolle von Sporen in Seedingkulturen zu identifizieren und Methoden zur Bestimmung dieser Güteindikatoren zu etablieren. Im Rahmen der Arbeit soll insbesondere die Übertragbarkeit prokaryotischer Viabilitätsmethoden auf eukaryotische Sporen von *A. ochraceus* analysiert werden. In diesem Zusammenhang sollen sogenannte Tetrazoliumsalze zur Bestimmung der Viabilität zum Einsatz kommen. Hierbei handelt es sich um farblose Derivate, welche durch zelluläre Dehydrogenasen, wie Succinat- oder NAD(P)H-Dehydrogenasen, in stark fluoreszierendes Formazan umgewandelt werden. Aufgrund dieser Fähigkeit werden sie bereits zur Ermittlung der Zellviabilität und metabolischen Aktivität unter verschiedensten Forschungsaspekten verwendet.

Des Weiteren soll die Anwendbarkeit des Fluorescein-Diacetat (FDA)-Assays überprüft werden. Das Prinzip des FDA-Assays besteht in der hydrolytischen Spaltung des farblosen FDA durch sporeneigene Esterasen und Lipasen zu Fluorescein. Da Lipide in vielen Fällen als Speicherstoffe in Sporen vorkommen und vermutlich der Energiegewinnung im Keimungsstoffwechsel dienen, kann ein auf Enzymen des Fettstoffwechsels basierender Test ein vielversprechendes Mittel zur Bestimmung der Viabilität von Sporen darstellen.

In Produktionsprozessen mit filamentösen Pilzen besteht die Möglichkeit, über die Sporenkonzentration im Inokulum die morphologische Entwicklung der Kultur zu myzel- oder pelletförmigem Wachstum unter submersen Bedingungen zu beeinflussen. Die unterschiedlichen Morphologieformen haben wiederum verschiedene Produktivitäten zur Folge [El-Enshasy et al., 2006; Haack et al., 2006; Hille et al., 2005; Kiep, 2010; Krull et al., 2010; Papagianni, 2004]. Die Kenntnis über die absolute Sporenkonzentration im Inokulum stellt daher einen wichtigen Ansatzpunkt zur Erhaltung der Reproduzierbarkeit von Produktionsprozessen dar. Entscheidend ist dabei der Anteil intakter, keimfähiger Sporen einer Sporenprobe, der zur Biomassebildung in submerser Kultivierung beiträgt. In der

vorliegenden Arbeit soll daher ein Verfahren zur Bestimmung des Anteils lebender und defekter Sporen eruiert werden.

In biochemischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass über die Charakterisierung der cytosolischen Kohlenhydratfraktion von Pilzsporen eine Aussage über deren Keimfähigkeit möglich ist. Diesbezüglich wurde vor allem eine hohe Mannitolkonzentration in keimfähigen *Aspergillus*-Sporen gefunden. [Morozova et al., 2002; Tereshina et al., 2004]. Zudem konnte in Versuchen mit *A. oryzae* eine kontinuierliche Abnahme der Mannitolkonzentration in keimenden Sporen gemessen werden. Bevor die Spore in der Lage ist, eine externe Kohlenstoffquelle zur Keimung zu nutzen, scheint damit Mannitol als Hauptenergiespeicher zu fungieren [Corina et al., 1971; Ruijter et al., 2003; Tereshina et al., 2004; Witteveen et al., 1995]. Im Rahmen der Arbeit soll daher zusätzlich geklärt werden, inwieweit die intrasporuläre Kohlenhydrat-Zusammensetzung als Qualitätsindikator von Seedingkulturen des hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* herangezogen werden kann.

Abschließend sollen die Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsverfahren nach Anwendung auf unterschiedlich hergestellte Sporenpopulationen untereinander verglichen werden sowie in Korrelation zum Biomassewachstum und zur Produktivität des verwendeten Pilzes unter submersen Bedingungen gesetzt und damit einem *proof-of-concept* unterzogen werden. Als Applikationsprozess dient dazu die Biotransformation einer Steroid-Vorstufe durch eine regioselektive Hydroxylierungsreaktion. Dafür gilt es, den industriellen Produktionsprozess in den Labormaßstab zu übertragen, die Analysemethoden zum spezifischen Edukt-Produkt-Nachweis zu validieren und mögliche Methoden zur Bestimmung des Wachstums unter submersen Kultivierungsbedingungen zu etablieren.

Übergeordnetes Ziel ist es, durch die entwickelten Methoden sowohl das Verfahren zur Sporenerzeugung zu charakterisieren als auch optimale Parameter für eine maximale Sporenbildung mit reproduzierbarer, hoher Sporenqualität zu bestimmen. Dadurch soll die Reproduzierbarkeit des Sporulationsverfahrens gemäß GMP-Kriterien garantiert und ein wesentlicher Beitrag zur Verbesserung und Qualitätssicherung des bestehenden Kultivierungsverfahrens in Bezug auf die Produktausbeute geleistet werden.

2 Aktueller Stand der Forschung und Technik

2.1 Modellorganismus - *Aspergillus ochraceus*

Der filamentöse Pilz *Aspergillus ochraceus* wird innerhalb der Abteilung der höheren Pilze (Eumycota) den Ascomyceten, den sogenannten Schlauchpilzen, zugeordnet, die mit mehr als 20.000 Arten das größte Spektrum der Fungi umfassen. Die vegetative Wachstumsform dieser Gattung ist durch Ausbildung länglich verzweigter Hyphen gekennzeichnet, wobei durch polares Wachstum der Hyphenspitzen Substrate der Umgebung effektiv erschlossen und verstoffwechselt werden können [Carlile, 1994; Munk, 2008; Schmid, 2002].

Im Kreislauf der Natur spielen Schimmelpilze dieser Abteilung eine vielfältige Rolle. Wegen ihres anpassungsfähigen Stoffwechsels sind sie in Böden, faulender Vegetation und modrigem Getreide ubiquitär verbreitet. Sie besitzen ein ausgedehntes Substratspektrum und tragen durch ihre stoffwechselphysiologische Vielseitigkeit und ihr herausragendes Sekretionsvermögen hydrolytischer Enzyme in großem Umfang zur Remineralisierung organischen Materials im Boden bei [Fuchs et al., 2007; Munk, 2008; Ward et al., 2006].

Aufgrund ihres breiten Substratspektrums und ihrer metabolischen Vielfalt finden filamentöse Pilze seit vielen Jahren Anwendung in verschiedenen Industriezweigen der Biotechnologie, wie zum Beispiel in der Waschmittelherstellung sowie in der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie [Archer, 2000; Lubertozi et al., 2009; Papagianni, 2004]. Von der amerikanischen Food- and Drug Administration (FDA) wurden zahlreiche Pilze der *Aspergillus*-Spezies als gesundheitlich unbedenklich eingestuft, weshalb diese zur Herstellung von Produkten für die Lebensmittel- und Pharmaindustrie geeignet sind. Aus diesem Grund erlangen einige *Aspergilli* seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts zunehmend an Bedeutung als Produktionsorganismen für verschiedene Enzyme (Proteasen und Amylasen), organische Säuren (Glucon-, Itacon- und Citronensäure) und pharmazeutisch wirksame Substanzen wie Antibiotika (Cephalosporin und Penicillin) [Fuchs et al., 2007; Magnuson et al., 2004; Schmid, 2002; Schuster et al., 2002].

Vor allem durch ihre hohe Sekretionsleistung unter submersen Kultivierungsbedingungen stehen filamentöse Pilze als Wertstoffproduzenten im Fokus zahlreicher Untersuchungen, wobei die entsprechenden Produkte im Aufarbeitungsprozess ohne einen zusätzlichen Biomasseaufschluss gewonnen werden können [Conesa et al., 2001; Lubertozi et al., 2009]. Darüber hinaus bieten sie eine Reihe von Vorzügen gegenüber prokaryotischen Expressionssystemen, da sie in der Lage sind posttranslationale Modifikationen, wie die Bildung von Disulfidbrücken oder Glykosylierungen, durchzuführen, was für die biologische

und pharmakologische Aktivität und Stabilität vieler Proteine von entscheidender Bedeutung ist [Davies, 1994; Mikosch, 1995]. Ferner ist der Einsatz filamentöser Pilze aufgrund der relativ einfachen und anspruchslosen Kultivierungsanforderungen im Vergleich zu weiteren eukaryotischen Produktionssystemen, wie Säugerzellen, von Vorteil.

Der im Rahmen der Arbeit verwendete Stamm *Aspergillus ochraceus* wurde erstmalig 1877 durch seine Fähigkeit zur Produktion des Mykotoxins Ochratoxin A beschrieben, welches beim Menschen zu Nephropathie, Nierentumoren und teilweisem Gewebstod in Bereichen der Leber führen kann [Diekman et al., 1992; Hof, 2003; Samson et al., 2006]. In der Fachliteratur wird dieser filamentöse Pilz daher in den meisten Fällen unter dem Forschungsaspekt der Lebensmittelsicherheit beschrieben. Diesbezüglich wurde sein Wachstum auf getrockneten und gelagerten Lebensmitteln, wie Sojabohnen, Gewürzen, Trockenfrüchten, Nüssen, Getreide und vor allem Kaffeebohnen nachgewiesen [Ramos et al., 1998; Taniwaki et al., 2003; Van Der Merwe et al., 1965; Webster et al., 2007].

Von biotechnologischem Nutzen ist *A. ochraceus* durch seine Fähigkeit, ein komplexes Spektrum an Enzymen zu produzieren, die sowohl zum Abbau als auch zur spezifischen Modifikation verschiedener Substanzen durch Hydroxylierung, Oxidation, Hydrolyse, Veresterung, Isomerisation und Racemisierung befähigt sind [De Vries et al., 2001; Dulaney et al., 1955a; Dulaney et al., 1955b; Vezina et al., 1963]. Insbesondere die effiziente Katalyse regio- und stereoselektiver Reaktionen unter einfachen, kostengünstigen Reaktionsbedingungen ermöglicht die Modifikation von Stoffen, die auf rein chemischem Weg nicht oder nur unter hohem energetischen und sicherheitstechnischen Aufwand durchführbar sind [Kardinahl et al., 2006]. Aufgrund dieser Charakteristika wird *A. ochraceus* besonders für die Biodegradation und -transformation von Sterolen zu Steroiden genutzt. Die bekannteste industrielle Anwendung stellt diesbezüglich die stereoselektive Umwandlung von Progesteron zu 11 α -Hydroxyprogesteron durch Sporen von *A. ochraceus* dar (Abbildung 2.1) [Dulaney et al., 1955b].

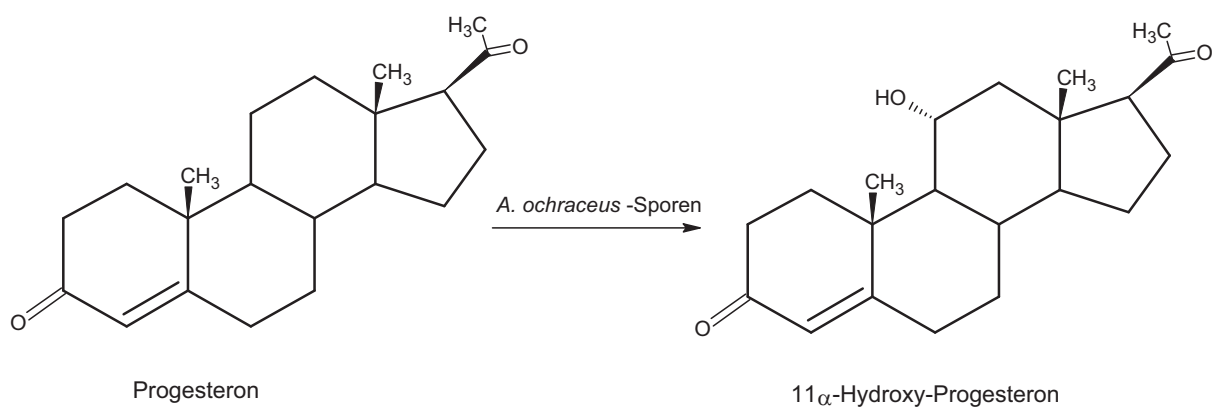


Abb. 2.1: Stereoselektive Steroidhydroxylierung von Progesteron an 11 α -Position durch *A. ochraceus* [Wolken et al., 2003].

Dabei wird die Transformation in Anwesenheit von NADPH und Sauerstoff durch die Progesteron-11 α -Monooxygenase über den Cytochrom-P450-Mechanismus katalysiert [Jayanthi et al., 1982; Schaumburg et al., 2006]. Die Reaktionsprodukte akkumulieren im Medium und können anschließend über verschiedene physikochemische Methoden isoliert werden.

Bis Mitte des letzten Jahrhunderts verlief die Herstellung von Steroidhormonen über eine rein chemische Katalyse von Gallensäure, wobei der Prozess mit insgesamt 31 Synthesestufen sehr aufwendig und unwirtschaftlich war. Durch die mikrobiologische Hydroxylierung konnte die Ausbeute gegenüber der chemischen Synthese maßgeblich gesteigert werden, womit die Herstellungskosten beispielsweise für Hydrocortison von 200 US\$ g⁻¹ auf 3,50 US\$ g⁻¹ im Jahr 1955 reduziert werden konnten [Kardinahl et al., 2006].

Mit der Erkenntnis der vielfältigen pharmakologischen Wirkung von Steroiden, unter anderem als Vitamin D, Contraceptiva, Chemotherapeutika, Entzündungs- und Ovulationshemmer, besteht auch zukünftig großes Interesse an deren Synthese und damit verbundener Optimierung des Umsetzungsprozesses. Weiterhin erweist sich *A. ochraceus* als nützlich für die Synthese und Transformation von cyclischen Kohlenhydraten, Aromaten, Pestiziden, Herbiziden und Insektiziden [Holland et al., 1999; Samanta et al., 1978; Vezina et al., 1963; Ward et al., 2006]. Dies ermöglicht eine vielfältige industrielle Anwendung in Bereichen der pharmazeutischen sowie chemischen Industrie, wodurch diese Spezies ebenfalls zunehmend an Bedeutung gewinnt.

2.2 Fortpflanzung und Wachstum filamentöser Pilze

2.2.1 Asexuelle Sporenbildung

Da filamentöse Pilze unbewegliche, heterotrophe Organismen darstellen, haben sie spezielle Methoden entwickelt, um nach Verbrauch einer Nahrungsquelle neue Habitate zu besiedeln oder ungünstige, nährstoffarme Zeiträume zu überdauern. Beide Überlebensstrategien sind mit der Bildung von Sporen verknüpft [Munk, 2008].

Die Sporenbildung filamentöser Pilze kann sowohl auf sexuellem (meiotischem) als auch asexuellem (mitotischem) Weg erfolgen. Die Spezies *A. ochraceus* vermehrt sich durch asexuelle Sporulation, weshalb sie den Fungi imperfecti (Deuteromyceten) zugeordnet wird. Die Induktion der asexuellen Fortpflanzung erfolgt dabei durch die Exposition des Myzels an einer Luft-Flüssigkeitsgrenzfläche. Dies garantiert den Sporen in der Natur dem Wind ausgesetzt und über große Distanzen verbreitet zu werden [Fuchs et al., 2007; Munk, 2008]. Andere Stimuli werden durch das Myzel selbst erzeugt. So konnten drei Kategorien von Sekundärmetaboliten ermittelt werden, die direkt oder indirekt Entwicklungsprozesse in

Fungi stimulieren. Dazu gehören Metabolite, wie Linolsäure-Derivate oder Mykotoxine sowie Pigmente (z. B. Melanin) [Calvo et al., 2002]. Des Weiteren scheinen neben den Lichtverhältnissen zahlreiche andere Parameter einen Einfluss auf den Sporulationsprozess auszuüben, auf die im Kapitel 2.3 näher eingegangen wird.

Der asexuelle Lebenszyklus kann allgemein in zwei Phasen, das Wachstum und die Reproduktion, eingeteilt werden. Die erste Phase umfasst alle Vorgänge, die an der Ausbildung des Myzels beteiligt sind, während in der zweiten Phase unter bestimmten Bedingungen einige Hyphenzellen nicht mehr weiter wachsen, sondern sich zu Konidiphoren differenzieren und schließlich Konidiosporen bilden. Um im Entwicklungsprogramm von der Hyphenentwicklung auf die Sporenbildung umzuschalten, ist die Aktion und Interaktion der Regulator-Gene *brlA*, *abaA* und *wetA* erforderlich. Diese Gene sind an der Koordination und Regulation einer Vielzahl von Genen und Faktoren beteiligt, die vor allem die Zelldifferenzierung und die intrazelluläre Kommunikation beeinflussen [Adams, 1994; Mirabito et al., 1994; Ward et al., 2006]. Der Ablauf der Sporulation ist am Beispiel von *A. nidulans* in Abbildung 2.2 dargestellt.

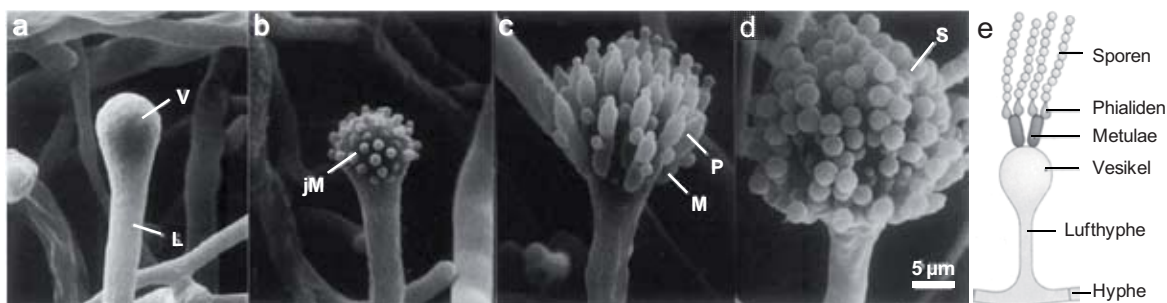


Abb. 2.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Sporenbildung von *A. nidulans*, a) Lufthyph (L) mit Vesikel (V); b) junge Metulae (jM) Knospen aus Vesikel; c) Metulae (M) und Phialiden (P) sind ausgeprägt; d) Konidiphore mit Sporen (S); e) Schema einer reifen Konidiphore [Fuchs et al., 2007; Krüger et al., 1997].

Nach Induktion der Konidiphorenentwicklung differenziert sich zunächst ein Hyphenelement zu einer dickwandigen Zelle, welche später den Fuß der Konidiphore bildet. Aus dieser wächst eine stielartige Lufthyph (L) hervor, welche, abhängig von der *Aspergillus*-Spezies, bei einer Länge von 50 - 100 µm terminal anschwillt und ein Vesikel (V) bildet (Abbildung 2.2-a). An der Oberfläche des Vesikels kommt es durch ein erstes knospenähnliches Wachstum zur Bildung von Metulaen (M), an welchen durch eine zweite Knospung Phialiden (P) entstehen (Abbildung 2.2-c). Die Phialidenspitze dehnt sich aus und es findet eine Kernteilung statt. Einer der Kerne wird über Mikrotubuli in die entstehende Spore (S) transportiert, welche anschließend durch ein Septum von der Phialide abgetrennt wird. Die Wiederholung dieses Vorgangs führt zur Bildung langer Sporenketten, die sich kontinuierlich aus der Konidiphore herausschieben, wobei die älteste Spore jeweils an der Spitze einer

Kette zu lokalisieren ist (Abbildung 2.2-d und e). Pro Konidiophore werden je nach *Aspergillus*-Spezies etwa 100.000 Sporen produziert. Nach abgeschlossener Sporulation können die entstandenen Sporen weiter reifen, wobei sie beispielsweise größer werden oder ihre Zellwand verstärkt wird [Adams et al., 1998; Mims et al., 1988; Webster et al., 2007].

Aspergillus-Sporen sind mit einem komplexen Sortiment an Nährstoffen ausgestattet, die es der Spore ermöglichen, Energie für die ersten Entwicklungsschritte der erneuten Keimung bereitzustellen. Typisch für asexuelle Sporen verschiedener *Aspergillus*-Spezies sind ein geringer Lipidanteil von etwa 2,2 % (*A. oryzae*) sowie ein hoher Kohlenhydratanteil von etwa 30 % (*A. niger*) [Feofilova et al., 1988]. Die Lipidfraktion besteht hauptsächlich aus neutralen Lipiden, wie Fettsäuren, Triglyceriden, Phospholipiden, Glycolipiden, Sterolen und Carotenoiden, die in der Zellwand der Sporen lokalisiert sind [Reisner, 1976]. Die cytosolische Kohlenhydratfraktion besteht zum überwiegenden Teil aus Polyolen (z. B. Glycerol, Erythritol, Mannitol) sowie den Zuckern Trehalose und Glucose [Morozova et al., 2002]. Neben Kohlenhydraten enthalten Sporen einen erheblichen Anteil an organischem Stickstoff, der zumeist in Form von Aminosäuren in der Spore gespeichert ist. So konnten in Sporen von *A. fumigatus* hohe Konzentrationen der Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Glycin bestimmt werden [Barreto-Bergter et al., 1981].

Charakteristisch für Sporen von *A. ochraceus* ist die ockergelb bis bräunliche Pigmentierung (vgl. Abbildung 2.3-a und b), welche dem Stamm seinen Namen gab und auf die Einlagerung von Melanin zurückzuführen ist. Weiterhin werden die Sporen dieser Spezies als kugelförmig, dünnwandig und glatt beschrieben [Reddy et al., 2010].

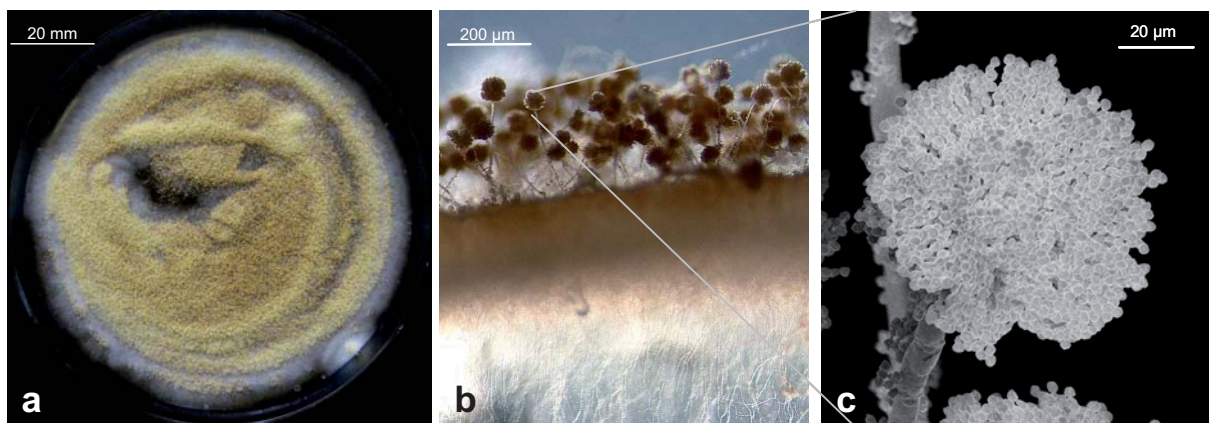


Abb. 2.3: Sporenbildung von *A. ochraceus* auf MEA-Medium (Inkubation: 5 Tage, 24 °C); a) Draufsicht eines bewachsenen Agarmediums; b) Profilansicht der Konidiophoren; c) elektronenmikroskopische Aufnahme einer reifen Konidiophore.

2.2.2 Wachstum unter submersen Kultivierungsbedingungen

Die Keimung von Sporen ist essentiell für den vegetativen Lebenszyklus aller filamentösen Pilze. Sie kann generell in drei Phasen unterteilt werden: Aktivierung der ruhenden Spore, isotropes Wachstum und polares Wachstum [d'Enfert, 1997].

Für die Aktivierung der ruhenden Spore und die Initiation der Keimung sind bestimmte Umweltfaktoren notwendig. Universelle Faktoren, wie die Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff, sind unabdingbar. Hinzu kommen zahlreiche weitere Faktoren, die sich von Spezies zu Spezies bezüglich ihres Einflusses stark unterscheiden. Hier sind insbesondere niedermolekulare Nährstoffe wie Zucker oder Aminosäuren und anorganische Salze zu nennen.

Ist eine Aktivierung erfolgt, beginnt zunächst das isotrope Wachstum. Die Spore schwillt durch die Aufnahme von Wasser und das Wachstum der Zellwand auf mehr als das Doppelte des ursprünglichen Volumens an. Begleitet wird dies durch die Wiederaufnahme zahlreicher metabolischer Aktivitäten, wie der Zellatmung und der Proteinbiosynthese. Insbesondere Gene, die am Aufbau von Ribosomen und an der Synthese von Aminosäuren beteiligt sind, werden zu Beginn des isotropen Wachstums stark exprimiert.

Der Übergang vom isotropen zum polaren Wachstum ist durch die Ausbildung eines Keimtriebes charakterisiert, aus dem schließlich neue vegetative Hyphen hervorgehen. Bedingung für das polare Wachstum der Hyphenspitzen ist die Ausbildung eines polaren Aktin-Cytoskeletts für den Transport sekretorischer Vesikel, die für das Spitzenwachstum benötigte Komponenten (z. B. Chitin, Enzyme) enthalten [d'Enfert, 1997; Li et al., 2006; Osheroev et al., 2001; Van Etten et al., 1983].

Die Keimung der Sporen von *A. ochraceus* unter submersen Bedingungen bis hin zur Bildung eines Hyphengeflechts ist in Abbildung 2.4 beispielhaft dargestellt.

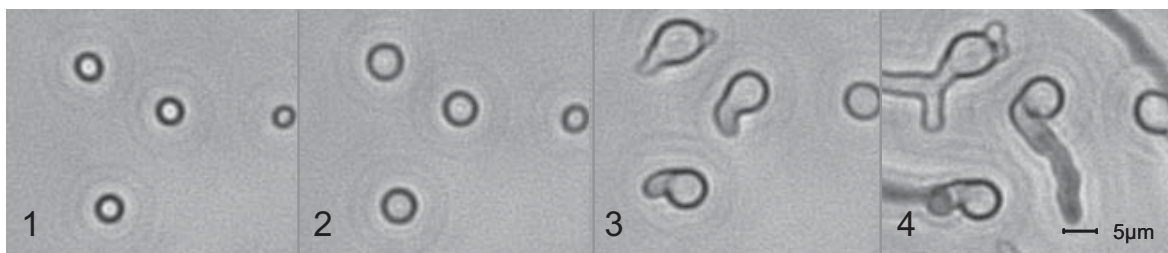


Abb. 2.4: Submerse Sporenkeimung von *A. ochraceus*; 1) Aktivierung ruhender Sporen; 2) 7 h: Isotropes Sporenwachstum; 3) 10 h: Ausbildung des Keimschlauchs; 4) 15 h: Verlängerung der Keimschläuche zum Hyphengeflecht [Demming et al., 2011].

Während der Keimung dienen bestimmte Speicherstoffe in der Spore als Nährstoffe für das Wachstum. Speicherstoffe sind für gewöhnlich Triglyceride oder Kohlenhydrate wie beispielsweise Trehalose und Mannitol [d'Enfert, 1997].

Einen weiteren Aspekt der Keimung stellt der Verlust der Hydrophobizität der Sporen dar. Diese weisen im ruhenden Zustand eine äußere Schicht aus kleinen, stäbchenförmigen, amphiphatischen Proteinaggregaten, sogenannten Hydrophobinen, auf, welche für den hydrophoben Charakter verantwortlich sind. Dieser begünstigt unter anderem eine Verbreitung der Sporen durch Luftströme, Adhäsion an Wirtszellen oder -proteine und schützt vor Chemikalien, Enzymen oder Phagozyten. Die Auskeimung der Sporen führt zum progressiven Abbau dieser Hydrophobine, so dass schließlich hydrophile Polysaccharide oder bei der Keimung sekretierte Proteine die äußere Schicht bilden. Der nun hydrophile Charakter begünstigt das Hyphenwachstum unter submersen Bedingungen [Dague et al., 2008].

Darüber hinaus wird während der Keimung Melanin abgebaut. Hierbei handelt es sich um ein dunkel gefärbtes Pigment, welches in der Zellwand von Sporen verschiedener Spezies lokalisiert ist. Analog zu den Hydrophobinen dient es dem Schutz vor Immunreaktionen des Wirts sowie vor Oxidantien und anderen antimikrobiellen Verbindungen [Nosanchuk et al., 2003]. Zusätzlich schützt Melanin den Organismus vor UV-Strahlung und ist eine essentielle Komponente für die Struktur der Zellwand [Pihet et al., 2009].

Bei fortschreitendem Wachstum entsteht ein stark verzweigtes Hyphengeflecht, das als Myzel bezeichnet wird. Unter submersen Kultivierungsbedingungen können in Abhängigkeit von den eingestellten Parametern zwei Grenzformen der Morphologie entstehen, welche unterschiedliche Produktionseigenschaften zur Folge haben. Im Allgemeinen wird hierbei das Wachstum als freies filamentöses Pilzmyzel sowie die Ausbildung von kompakten, sphärischen Partikeln, die als Pellets bezeichnet werden, unterschieden. Es ist jedoch auch die Ausbildung morphologischer Zwischenformen möglich. Zu den Parametern, die die morphologische Entwicklung wesentlich beeinflussen, zählen vor allem die Medienzusammensetzung, die Temperatur, der pH-Wert, der Leistungseintrag sowie die Eigenschaften des Inokulums. Welche Erscheinungsform letztendlich während der Kultivierung angestrebt wird, hängt vom gewünschten Produkt ab, da die Morphologie des Pilzes sowohl dessen Synthese als auch Sekretion beeinflusst [Driouch et al., 2010a; Driouch et al., 2010b; El-Enshasy et al., 1999; El-Enshasy et al., 2006; Grimm et al., 2004; Grimm et al., 2005a; Grimm et al., 2005b; Haack et al., 2006; Hille et al., 2005; Kiep, 2010; Krull et al., 2010; Papagianni, 2004].

2.3 Einfluss verschiedener Parameter auf die Sporenbildung und Sporeneigenschaften

Obwohl sich eine große Anzahl verschiedener Forschungsbereiche mit der Sporulation filamentöser Pilze beschäftigt, scheint es schwierig, generalisierte Parameter für eine reproduzierbare Sporenerstellung mit gleichbleibender Sporenqualität aufzustellen.

In zahlreichen Studien wurde das Sporulationsverhalten von Pilzen bei variablen Nährstoffangebot und verschiedenen Umweltbedingungen untersucht. Es zeigte sich, dass eine erhebliche Anzahl an physiologischen und biochemischen Prozessen die Sporulation beeinflusst, wobei speziesabhängige Unterschiede auftreten und die Mechanismen die zur Sporenbildung führen nicht in allen Fällen verstanden sind [Dahlberg et al., 1982]. Auf den Einfluss einiger Parameter wird im Folgenden näher eingegangen.

2.3.1 Einfluss der Medienzusammensetzung

Zur Kultivierung von filamentösen Pilzen können synthetische oder komplexe Nährmedien eingesetzt werden. Synthetische Medien zeichnen sich durch eine definierte und stets konstante Zusammensetzung an Nährstoffkomponenten aus. Sie werden hauptsächlich für physiologische Untersuchungen eingesetzt. In der Industrie finden aus Kostengründen komplexe Medien biologischen Ursprungs, wie Bierwürze (Malzextrakt), Obstsäfte oder Maisquellwasser, bevorzugt Anwendung. Der Nachteil dieser komplexen Substrate ist, dass ihre genaue chemische Zusammensetzung unbekannt und nur schwer reproduzierbar ist. Dabei variiert die Zusammensetzung vor allem in der Art und Menge der enthaltenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie vorliegender Makro- und Mikroelemente [Kück et al., 2009; Papagianni, 2004]. Diese Substrate beeinflussen das Hyphenwachstum, den Sporulationsprozess und die Eigenschaften der gebildeten Sporen auf unterschiedliche Weise. Im Allgemeinen wird dabei zwischen Nährstoffbedingungen unterschieden, die gutes vegetatives Wachstum fördern und jenen, die die Wachstumsrate reduzieren und so zur Sporulation führen [Dahlberg et al., 1982].

In verschiedenen *Aspergillus*-Spezies konnte festgestellt werden, dass Glucose und Glucose-ähnliche Substrate, wie Sucrose, bevorzugt zum Wachstum verstoffwechselt werden. Die meisten *Aspergilli* metabolisieren jedoch ebenso Mono-, Di- und Polysaccharide sowie eine Reihe anderer organischer Verbindungen und Säuren. Insgesamt scheint das Spektrum an Kohlenstoffquellen, welches das vegetative Wachstum begünstigt, größer zu sein, als die Anzahl der Kohlenstoffquellen, die hohe Sporulationsraten bewirken [Papagianni, 2004; Ruijter et al., 1997]. In Versuchen mit *Talaromyces flavus* (anamorph: *Penicillium dangeardii*) wurde durch Medienzusätze wie Mono- oder Polysaccharide vor allem das vegetative Hyphenwachstum gesteigert, aber weniger Sporen erhalten. Dagegen

wurden die größten Sporenmengen auf Medien mit Oligosacchariden als Hauptkohlenstoffquelle gebildet. Insbesondere Lactose-, Glycerol- und Arbutin-haltige Medien scheinen eine ausgiebige Sporulation zu begünstigen. Es zeigte sich weiterhin, dass einige Kohlenstoffquellen (z. B. Cellobiose) sowohl ein ausgeprägtes Hyphenwachstum, als auch eine ausgiebige Sporulation verursachen [Engelkes et al., 1997].

Aspergilli können als Stickstoffquelle sowohl organische (z. B. Harnstoff und Aminosäuren) als auch anorganische Ammonium- und Nitratverbindungen verwenden. Nitrat wird dabei zu Ammonium reduziert und unter anderem in die Aminosäuren Glutamat und Glutamin eingebunden, die anschließend als primäre Stickstoffquellen fungieren. Purine und andere Aminosäuren können zwar ebenso von *Aspergillus* verwertet werden, sie dienen dem Pilz aber vornehmlich als sekundäre Stickstoffquellen [Krappmann et al., 2005].

Studien mit *T. flavus* ergaben, dass Medien ohne Stickstoffquelle zu einer mäßigen Sporenproduktion führen, jedoch kein bzw. geringfügiges vegetatives Hyphenwachstum induzieren. Nach Zugabe einer Stickstoffquelle stieg nicht nur das vegetative Wachstum signifikant an, sondern auch die Menge der gebildeten Sporen [Engelkes et al., 1997].

In weiteren Versuchen mit *Paecilomyces fumosoroseus* konnte eine Korrelation zwischen Stickstoffgehalt im Sporulationsmedium und Proteingehalt der darauf gebildeten Sporen festgestellt werden. So wurde auf Substraten mit hohen Casaminsäure-Konzentrationen eine gesteigerte Sporenbildung sowie eine erhöhte Proteinkonzentration ermittelt, woraus eine höhere Keimungsgeschwindigkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Gefriertrocknung resultierten [Cliquet et al., 2005]. Das Vorliegen einer Stickstoffquelle scheint damit für das Hyphenwachstum von essentieller Bedeutung zu sein und auch die Quantität und Qualität der gebildeten Sporen maßgeblich zu beeinflussen [Engelkes et al., 1997]. Weiterhin zeigte sich in Versuchen mit *A. flavus*, *A. nidulans* und *Coniothyrium minitans*, dass organische Stickstoffquellen (wie Asparagin) zwar das vegetative Wachstum fördern, die Sporulation jedoch inhibieren. Vor allem bei hohen Harnstoffkonzentrationen im Medium wurde eine geringere Sporenproduktion detektiert. Dagegen wurde bei Verwendung anorganischer Stickstoffquellen, wie Ammonium- und Natriumnitrat, die Sporenbildung gesteigert [Han et al., 2003; Olutiola, 1976; Ooijkaas et al., 1999]. In den Untersuchungen wurde jedoch auf weitere physikochemische Veränderungen des Mediums, wie z. B. die Erhöhung des pH-Wertes durch die Zugabe von Ammoniumnitrat, nicht näher eingegangen, so dass der beobachtete Effekt möglicherweise nicht direkt auf den Zusatz dieser Stickstoffquellen zurückzuführen ist.

Auch in *T. flavus* ließen sich durch Verwendung verschiedener Stickstoffquellen unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum und die Sporulation feststellen. Eine intensive Sporenbildung fand hier jedoch vor allem auf organischen Verbindungen wie Harnsäure, Tyrosin und Hypoxanthin statt [Engelkes et al., 1997]. Die gegensätzlichen

Ergebnisse können durch die Verwendung verschiedener Modellorganismen und folglich speziesabhängige Unterschiede begründet werden.

Die Sporenbildung und -güte wird ebenfalls durch Aminosäure-haltige Zusätze im Agarmedium beeinflusst. Grover (1964) publizierte, dass *A. flavus* Stickstoff aus Aminosäuren leichter verwerten kann, als aus einer Nitrat-, Nitrit-, oder Ammonium-haltigen Stickstoffquelle. Zudem konnte eine gesteigerte Sporenproduktion auf Glycin-, Leucin- und Methionin-haltigen Agarmedien bestimmt werden. Sporen, die auf Medien ohne β -Alanin, Glycin, DL-Leucin, DL-Methionin oder L-Tryptophan angezogen wurden, zeigten dagegen eine mangelhafte Keimfähigkeit. Die Kombination dieser Aminosäuren hatte keinen additiven Effekt zur Folge, vielmehr kommt jeder Aminosäure unabhängig voneinander eine bedeutende Rolle zu [Grover, 1964]. Damit scheint eine komplexe Anzahl von Aminosäuren im Medium essentiell zu sein, um eine effektive Sporenbildung zu initiieren. Pepton, Hefeextrakt oder Caseinhydrolysate enthalten verschiedenste Aminosäuren und stellen in diesem Zusammenhang geeignete Komponenten für Komplexmedien dar.

Weiterhin verweisen einige Studien darauf, dass ein ausgewogenes Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis das Hyphenwachstum und den Vorgang der Sporenbildung in Ascomyceten begünstigt [Elson et al., 1998; Engelkes et al., 1997; Han et al., 2003; Jackson et al., 1992; Schisler et al., 1991]. So wurde beispielsweise in Versuchen mit *T. flavus* eine gesteigerte Sporenproduktion mit steigendem C:N-Verhältnis im Medium beobachtet. Der Effekt des Verhältnisses auf das Wachstum und die Sporenbildung ist jedoch von der eingesetzten Stickstoffquelle abhängig [Engelkes et al., 1997].

In weiteren Arbeiten mit *Colletotrichum truncatum* führte ein Kohlenhydratüberschuss im Medium zu Hyphen mit höheren Lipidgehalten. Bei anschließender Initiation der Sporulation durch Nährstofflimitierung konnte durch die in den Hyphen gespeicherten Lipide eine gesteigerte Sporenbildung erreicht werden [Jackson et al., 1992]. Insgesamt werden in der Literatur konträre Aussagen über das optimale C:N-Verhältnis hinsichtlich maximaler Sporenbildung und -güte beschrieben, was auf speziesabhängige Unterschiede zurückgeführt werden kann.

An der Induktion der Sporenbildung ist eine Vielzahl von Enzymen beteiligt, die durch Metallionen und Kofaktoren reguliert und modifiziert werden. Beispielsweise codiert das an der Initiation der Sporulation beteiligte *brlA*-Gen für ein Zinkfinger-Protein, welches ohne eine entsprechende Zinkquelle nicht gebildet werden kann [Mirabito et al., 1994]. Daher wird vermutet, dass der Sporulationsprozess ebenfalls durch die im Medium enthaltenen Spurenelemente, wie $MnCl_2$, $ZnSO_4$ oder $FeCl_3$, beeinflusst wird [González et al., 2008; Mazas et al., 2009; Ooijkaas et al., 1999].

Unter diesem Aspekt wurde für *Coniothyrium minitans* durch Zugabe verschiedener Spurenelemente, wie Phosphat, Calcium und Magnesium, die Sporenproduktion gesteigert.

In weiteren Versuchen konnten gravierende Auswirkungen auf die Eigenschaften der gebildeten Sporen beobachtet werden. So zeigte sich beispielsweise in Studien mit prokaryotischen Sporen von *Bacillus cereus*, dass die Mineralstoffbestandteile des Sporulationsmediums die Hitzeresistenz der darauf gebildeten Sporen beeinflussen. In den Versuchen führte vor allem eine erhöhte Phosphatkonzentration im Medium zu Sporen, die sich resistenter gegenüber Hitze erwiesen [González et al., 2008; Mazas et al., 2009; Ooijkaas et al., 1999].

Während in einigen Studien positive Effekte durch den Zusatz von Spurenelementen erzielt werden konnten, wird in anderen Publikationen eine hohe Sporenausbeute durch Abwesenheit von Mikro- und Makroelementen, folglich unter limitierenden Bedingungen, beschrieben [Chen et al., 2005].

Insgesamt wurden verschiedene Auswirkungen der Nährstoffe in Abhängigkeit vom untersuchten Mikroorganismus dokumentiert. Inwieweit die Medienkomponenten die Sporenbildung und vor allem die Sporeneigenschaften von *A. ochraceus* beeinflussen, wurde bisher nicht beschrieben und stellt damit einen interessanten Untersuchungsaspekt dar.

2.3.2 Einfluss der Osmolalität

Der Prozess der Sporenbildung sowie die Eigenschaften der gebildeten Sporen werden unter anderem durch die Osmolalität des Sporulationsmediums beeinflusst. Die Osmolalität ist dabei definiert als die Anzahl osmotisch aktiver Teilchen pro Kilogramm in einem Lösungsmittel und somit ein Maß für den osmotischen Druck [Yancey et al., 1982]. Eine erhöhte Osmolalität kann einerseits durch den Zusatz verschiedener Osmolyte (z. B. NaCl, KCl, Sucrose) zum Sporulationsmedium oder andererseits in Verbindung mit hohen Umgebungstemperaturen und daraus resultierenden niedrigen Wassergehalten auftreten.

Der Einfluss des Salzgehalts und der damit verbundenen Osmolalität auf das Wachstum und die Reproduktion wurde bereits anhand einiger Spezies untersucht [Beever et al., 1986; Dichtl et al., 1997; Han et al., 2002, 2003; Hohmann, 2002; Judet et al., 2008; Kelavkar et al., 1993; Loshon et al., 2006; Managbanag et al., 2002; Mert et al., 1977, 1987; Murguia et al., 1996; Ramirez et al., 2004; Ramos et al., 1998, 1999; Redkar et al., 1995; Ruijter et al., 2003; Ruzal et al., 1998; Seidl et al., 2004; Siderius et al., 1997; Tovar-Rojo et al., 2003; Webb et al., 2007; Witteveen et al., 1995].

In Versuchen mit verschiedenen Chlorid-Salzen (KCl, NaCl, MgCl₂), die dem Agarmedium in variierenden Konzentrationen zugesetzt wurden, konnte für *A. nidulans* nachgewiesen werden, dass eine 0,5 bis 1 M Salzkonzentration, die Sporenbildung fördert. Bei Salzkonzentrationen > 2 M verschlechterte sich hingegen die Sporenproduktion zunehmend und

das vegetative Wachstum wurde inhibiert [Beever et al., 1986; Han et al., 2003]. In Studien mit *A. niger* konnte eine maximale Sporenbildung durch 0,16 M NaCl-Zusatz zum Medium erreicht werden, während für ein optimales vegetatives Wachstum eine NaCl-Konzentration von 0,5 M von Vorteil war [Mert et al., 1977]. Für *A. flavus* wurde ausschließlich eine Inhibierung der Sporulation durch eine erhöhte Salinität beobachtet [Mert et al., 1987]. Der toxische Effekt hoher Osmolalitäten wird in verschiedenen Publikationen beschrieben und äußert sich in der Hemmung enzymatischer Reaktionen und der Beeinträchtigung der korrekten Proteinfaltung. Zudem wird vermutlich die Bildung genregulationspezifischer Faktoren inhibiert, was zu einer mangelnden Expression von Sporulationsgenen führt [Adler et al., 1982; Dichtl et al., 1997; Hohmann, 2002; Murguia et al., 1996; Ruzal et al., 1998].

Um in der Natur unter extremem osmotischem Druck zu überleben, haben Mikroorganismen verschiedene Adaptationsmechanismen entwickelt. Die Synthese und intrazelluläre Akkumulation spezieller osmotischer Verbindungen stellt dabei eine häufig zu beobachtende Methode dar, die von vielen Mikroorganismen zur Anpassung an osmotischen Stress genutzt wird. So konnten sowohl in Zellen verschiedener *Bacillus*-Spezies als auch in *S. cerevisiae* und zahlreichen *Aspergilli* größere Mengen verschiedener Zucker und Polyole nachgewiesen werden [Davis et al., 2000; Han et al., 2002; Hefnawy, 2001; Hohmann, 2002; Jennings, 1985, 1995; Kelavkar et al., 1993; Nesci et al., 2004; Pfyffer et al., 1990; Ramirez et al., 2004; Ramos et al., 1998, 1999; Redkar et al., 1995; Ruijter et al., 2003; Tovar-Rojo et al., 2003; Webb et al., 2007; Witteveen et al., 1995]. Diese Stoffe gehören der Gruppe der kompatiblen Solute an, welche bei osmotischem Stress dazu dienen, die intrazelluläre Osmolalität an die Umgebung anzupassen, und so dem drohenden Wasserverlust entgegenzuwirken. In diesem Zusammenhang konnten nicht nur in *S. cerevisiae* sondern auch in *Aspergillus*-Spezies entsprechende osmoregulatorische Gene identifiziert werden, die die Synthese kompatibler Solute induzieren und kontrollieren [Han et al., 2002; Whitmarsh et al., 2000; Yoshida et al., 1997].

Als wichtigste kompatible Solute werden unter anderem die Polyole Glycerol, Erythritol, Arabitol und D-Mannitol sowie das Disaccharid Trehalose genannt [Blomberg et al., 1992; Han et al., 2002; Hohmann, 2002]. Die Konzentration der jeweiligen Verbindungen unter osmotischem Stress variiert jedoch in Abhängigkeit von der untersuchten Mikroorganismen-Spezies, so dass keine Aussagen über die Akkumulation eines allgemein favorisierten Polyols getroffen werden können. In *S. cerevisiae* wurden beispielsweise erhöhte Konzentrationen an Trehalose gemessen [Posas et al., 2000; Rep et al., 2000]. Für *A. nidulans* und *A. niger* konnte dagegen die gesteigerte Synthese von Erythritol sowie in *Fusarium graminearum* von Arabitol nachgewiesen werden [Beever et al., 1986; Ramirez et al., 2004; Redkar et al., 1995; Witteveen et al., 1995]. Andere filamentöse Pilze wie *A. repens*, *A. flavus* und *A. ochraceus* akkumulieren unter osmotischem Stress eine Kombination verschiedener Polyole [Kelavkar et al., 1993; Mellon et al., 2002; Ramos et al., 1999]. Der Vorteil liegt hier vermutlich in der Reduktion der Toxizität, die aus der erhöhten

Akkumulation von nur einer Komponente resultieren kann [Davis et al., 2000]. Insgesamt scheint jedoch sowohl in *S. cerevisiae* als auch in verschiedenen filamentösen Pilzen vor allem der Syntheseweg zur Produktion von Glycerol hochreguliert zu sein [Beever et al., 1986; Hallsworth et al., 1994; Managbanag et al., 2002; Posas et al., 2000; Ramos et al., 1999; Redkar et al., 1995; Rep et al., 2000; Witteveen et al., 1995].

Neben dem Schutz vor einer Dehydratation unter hyperosmotischen Bedingungen wird angenommen, dass eine bestimmte Polyolkonzentration in Sporen das Quellverhalten dieser während der frühen Keimungsphase unterstützt, da aufgrund der höheren intrazellulären Osmolalität ein höherer Wassergradient zwischen umgebendem Medium und Sporeinnerem vorliegt. Durch das resultierende schnellere Einströmen von Wasser in die Spore können metabolische Aktivitäten, wie die Zellatmung oder Proteinbiosynthese, schneller wieder aufgenommen werden und die Keimungsprozesse beschleunigt ablaufen [Hallsworth et al., 1994; Judet et al., 2008].

Ähnliche Effekte wurden für Zucker wie Trehalose und Saccharose beschrieben. Ihre Fähigkeit die Keimung und das Wachstum unter osmotischem Stress zu unterstützen, ist im Vergleich zu den genannten Polyolen jedoch geringer [Harman et al., 1991; Pascual et al., 2003]. Vielmehr konnte eine hohe Trehalosekonzentration mit steigender Hitzeresistenz assoziiert werden. Vermutlich schützt Trehalose cytoplasmatische Enzyme vor einer Hitze-Deaktivierung [Hallsworth et al., 1994; Managbanag et al., 2002].

Auch für Mannitol ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, inwieweit es als Osmoregulator fungiert. Obwohl der Anteil dieses Polyhydroxyalkohols in den Zellen filamentöser Pilze überwiegt, ändert sich der intrazelluläre Mannitolgehalt beispielsweise in *A. nidulans* nur geringfügig in Folge hyperosmotischer Bedingungen [Beever et al., 1986]. In weiteren Studien wurde jedoch festgestellt, dass Mannitol neben Trehalose eine wichtige Rolle als Kohlenstoffspeicher, Antioxidant und Reduktant zukommt [Corina et al., 1971; Jennings, 1995; Ruijter et al., 2003; Smirnov et al., 1989; Witteveen et al., 1995].

2.3.3 Einfluss weiterer environomischer Parameter

Zusätzlich zur Nährstoffkomposition wird die Entwicklung von filamentösen Pilzen der Gattung *Aspergillus* durch Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur und pH-Wert sowie durch die Inokulumkonzentration beeinflusst. Diese Faktoren beeinträchtigen die morphologische Differenzierung der Hyphen zu Konidiophoren, indem sie spezielle Signalkaskaden induzieren, welche die Sporulation beeinflussen [Han et al., 2003; Mirabito et al., 1994; Ward et al., 2006].

Lichteinfluss

Ascomyceten sind grundsätzlich in der Lage unterschiedliche Lichtqualitäten wahrzunehmen [Corrochano, 2007; Hill, 1976; Mooney et al., 1990]. Dieses auch als *photo sensing* bezeichnete Phänomen ist auf das Vorliegen verschiedener Photorezeptoren zurückzuführen. Das Repertoire dieser Photorezeptoren und der daraus resultierende Photoeffekt scheinen zwischen den verschiedenen Gattungen der Ascomyceten stark zu variieren. So konnte für *A. nidulans* nachgewiesen werden, dass insbesondere eine Bestrahlung mit Infrarotlicht bei einer Wellenlänge von 780 nm die asexuelle Sporulation positiv beeinflusst, während in *Alternaria tomato* UV-Licht (380 nm) zu einer verstärkten Sporenproduktion führt [Corrochano, 2007].

Weiterhin scheinen die Lichtverhältnisse neben stimulatorischen auch inhibitorische Effekte auf den Sporulationsprozess auszuüben. So inhibiert beispielsweise bei *A. tomato* die Bestrahlung mit blauem Licht (450 nm) die Sporenbildung [Corrochano, 2007]. Im Gegensatz dazu wird bei *A. oryzae* die Sporulation durch weißes Licht (430, 550, 610 nm) und rotes Licht (610 nm) gehemmt [Hatakeyama et al., 2007].

Je nach Spezies beeinflusst nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die Abwesenheit von Licht die Pilzentwicklung. Die Sporenbildung in Dunkelheit erfolgt in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Kohlenhydratquelle. Untersuchungen mit *Hypocrea atroviridis* weisen darauf hin, dass nur bestimmte Kohlenhydrate (z. B. Lactose und Polyole) und organische Säuren (z. B. Glucuronsäure) die Sporenbildung in Dunkelheit induzieren. Es wird vermutet, dass diese Kohlenhydratquellen eine niedrige Wachstums- und Stoffwechselrate zur Folge haben. Folglich gerät der Pilz in einen limitierten Zustand, welcher in Kombination mit Dunkelheit die Sporulation induziert [Friedl et al., 2008].

Die Fähigkeit Hell- und Dunkelphasen zu unterscheiden, erlaubt filamentösen Pilzen auf den Tag-Nacht-Rhythmus zu reagieren. In Versuchen mit *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, dass der Sporulationsprozess filamentöser Pilze dem circadianen Rhythmus folgt und etwa alle 24 Stunden Sporen gebildet werden [Liu et al., 2006]. Insgesamt variiert der Einfluss der Lichtbedingung von Spezies zu Spezies und lässt sich schwer charakterisieren, da eine Vielzahl an Photorezeptoren und anderen Regulatoren in die Reaktionskaskade involviert sind.

Einfluss der Temperatur

Da *Aspergilli* unterschiedlichste Habitate und Klimazonen besiedeln und damit sehr schwankenden Bedingungen ausgesetzt sind, verfügen sie über ein breites Temperaturspektrum, innerhalb dessen Wachstum möglich ist. Die meisten biotechnologisch interessanten *Aspergilli* sind mesophil, d. h. sie können bei minimal 6 °C und maximal 50 °C

wachsen, wobei ein Temperaturbereich zwischen 15 und 40 °C als optimal gilt [Küick et al., 2009].

Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Bildung und Viabilität von *A. niger* Sporen zeigen, dass die für den Organismus optimale Wachstumstemperatur unter Submersbedingungen meist auch das Optimum für dessen Sporulationsprozess darstellt [Bapat et al., 2003]. So wurden maximale Sporenbildungsraten bei 30 °C bestimmt, was in etwa dem Temperaturoptimum für das vegetative Hyphenwachstum von *A. niger* entspricht. Für den hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus*, konnte auf Malzextrakt-Medium ein Wachstumsbereich zwischen 8 bis 37 °C mit einem Temperaturoptimum zwischen 24 bis 30 °C ermittelt werden [Abdel-Hadi et al., 2009; Suárez-Quiroz et al., 2004].

In Versuchen mit Sporen von *Bacillus subtilis* wurde deutlich, dass die Sporulationstemperatur sowohl die Sporenstruktur als auch deren Eigenschaften beeinflussen kann. Unter höheren Temperaturen gebildete Sporen wiesen einen deutlich verringerten Wassergehalt auf, woraus eine erhöhte Resistenz gegenüber feuchter Hitze resultierte. Ferner waren die Sporen widerstandsfähiger gegenüber verschiedenen Chemikalien wie H₂O₂ oder Formaldehyd, was auf die temperaturbedingte Änderung der Sporenhülle durch einen höheren Anteil quervernetzter Muraminsäuren zurückgeführt werden kann [Melly et al., 2002].

Einfluss der Inokulumkonzentration

Die Konzentration des Inokulums hat einen direkten Effekt auf das Wachstum filamentöser Pilze. Gegenstand bisheriger Untersuchungen war insbesondere der Einfluss des Volumens bzw. der Inokulumkonzentration auf das Aggregationsverhalten, die Morphologie sowie die Produktbildung im submersen Kultivierungsprozess [Grimm et al., 2004; Kiep, 2010; Papagianni et al., 2006; Sautour et al., 2003; Sharma et al., 1980; Tucker et al., 1994; Xu et al., 2000]. In Versuchen mit *P. chrysogenum* und *A. niger* wurde bei niedrigen Sporenkonzentrationen zu Kultivierungsbeginn eine verlängerte lag-Phase beobachtet. Ebenso zeigte sich beim Start mit sehr hohen Sporenkonzentrationen ($> 10^7$ Sporen mL⁻¹) aufgrund einer deutlichen Inhibierung der Sporenkeimung ein verzögertes Wachstum unter submersen Bedingungen. Zudem scheint die Konzentration des Inokulums sowohl die Aktivität des Metabolismus als auch die Differenzierung der Hyphen zu beeinflussen [Grimm et al., 2004; Kiep, 2010; Sautour et al., 2003].

Über die Auswirkung der Inokulumkonzentration auf die Sporenbildung auf Festmedien ist bisher wenig in der Literatur beschrieben. In Versuchen mit *A. parasiticus* konnte jedoch bei der Beobachtung des Sporulationsverhaltens ein deutlicher Einfluss der Inokulumkonzentration auf die Differenzierung der Hyphen festgestellt werden. Unter

konstanten Umgebungsbedingungen bildeten sich aus Kulturen, die aus niedrigen Inokulumkonzentrationen ($< 10^3$ Sporen mL^{-1}) hervorgingen, selbst nach langer Inkubationszeit kaum Konidiophoren, wohingegen Kulturen aus Inokula höherer Konzentration (10^4 - 10^6 Sporen mL^{-1}) wesentlich schneller und reichlicher Sporen bildeten [Sharma et al., 1980]. Aktuelle Ergebnisse lassen in diesem Zusammenhang auf regulatorische Netzwerke schließen, welche, ähnlich dem Quorum-Sensing bei Prokaryoten, in Abhängigkeit von der Sporendichte Zell-Zell-Interaktionen kontrollieren und so die Sporulation fördern oder hemmen. In diversen Fungi wurden bereits interzelluläre Effektorsubstanzen nachgewiesen, die ab einer bestimmten Zelldichte sekretiert werden und das vegetative Wachstum und die Konidiophorbildung sowie das Keimungsverhalten und die morphologische Entwicklung filamentöser Pilze unter submersen Bedingungen beeinflussen können [Hogan, 2006].

Einfluss der Sporulationsdauer und des Sporenalters

Untersuchungen mit verschiedenen *Aspergillus*-Arten zeigen, dass der Einfluss der Sporulationsdauer bzw. des Sporenalters stark von der jeweiligen Spezies abhängt [Dantigny et al., 2009]. So ergaben beispielsweise Inokula mit *A. niger*-Sporen, die nach neun bis elf Tagen Inkubation geerntet wurden, eine deutlich geringere Citrat-Produktion, als Sporen mit einer Sporulationsdauer von drei bis sieben Tagen. Zusätzlich bildeten jüngere Sporen mehr Biomasse und wiesen einen höheren Substratverbrauch auf [Fernandez Vergano et al., 1996].

Auch Sporen des filamentösen Pilzes *A. fumigatus* keimten unter submersen Bedingungen nach einer Sporulationsdauer von fünf Tagen besser aus, als nach elf Tagen.

Dessen ungeachtet wurden für *A. flavus* keine Unterschiede im Keimungspotential alter und junger Sporen detektiert [Araujo et al., 2004]. Durch weitere Experimente konnte jedoch der Trend bestätigt werden, dass die Keimungsgeschwindigkeit mit zunehmender Sporulationsdauer abnimmt [Dantigny et al., 2009].

Untersuchungen zur Auswirkung des Sporenalters auf die Widerstandsfähigkeit von Sporen lieferten zum Teil konträre Ergebnisse. So nahm die Resistenz gegenüber feuchter Hitze bei *A. parasiticus*-Sporen mit zunehmendem Alter ab, während bei *A. flavus* kein derartiger Effekt beobachtet werden konnte [Doyle et al., 1975]. Im Gegensatz dazu wurde eine Korrelation zwischen Hitzeresistenz und Alter der Sporen bei *Talaromyces macrosporus* nachgewiesen [Dijksterhuis et al., 2004].

2.4 Bestimmung der Zellviabilität

2.4.1 FDA-Assay

Die Fähigkeit, Ester zu hydrolysieren, ist unter saprophytischen Bakterien und Pilzen weit verbreitet. Enzyme, wie Lipasen, Esterasen und Proteasen, die zur Esterhydrolyse fähig sind, kommen in großen Mengen als freie oder membrangebundene Enzyme in mikrobiellen Zellen vor. Daher gilt die Bestimmung der Aktivität dieser Enzyme als gebräuchliche Methode, um die Zellaktivität zu quantifizieren [Adam et al., 2001; Schnurer et al., 1982; Stubberfield et al., 1990]. In diesem Zusammenhang wird der Fluorescein-Diacetat-Assay (FDA-Assay) vor allem zur Messung der mikrobiellen Aktivität von Umweltproben, beispielsweise von Böden, eingesetzt [Green et al., 2006]. Aber auch im Bereich der klinisch-diagnostischen Mikrobiologie und Lebensmittelkontrolle findet dieses Verfahren Anwendung [Chastain et al., 1990].

Das Prinzip des FDA-Assays besteht in der hydrolytischen Spaltung des farblosen Substrates Fluorescein-Diacetat (FDA) zu gelb-fluoreszierendem Fluorescein durch zelleigene Esterasen und Lipasen [Stubberfield et al., 1990]. Dabei diffundiert FDA durch seinen unpolaren, lipophilen Charakter leicht in die Zelle hinein, in der es anschließend durch Bindung an intrazelluläre Enzyme hydrolysiert wird. Das entstehende Fluorescein-Molekül ist polar und kann nur schlecht aus der Zelle ausgeschleust werden. Infolgedessen übersteigt die Fluorescein-Bildungsrate dessen Exportrate, was zur intrazellulären Akkumulation von Fluorescein führt. Die Intensität des Fluoresceins dient schließlich als Maß für die Aktivität der untersuchten Probe und kann fluorometrisch ermittelt werden. Eine Beschädigung von Zellen verhindert jedoch diese intrazelluläre Aufkonzentrierung, so dass nur intakte Zellen fluoreszieren [Rotman et al., 1966]. Abbildung 2.5 zeigt schematisch die ablaufende Reaktion.

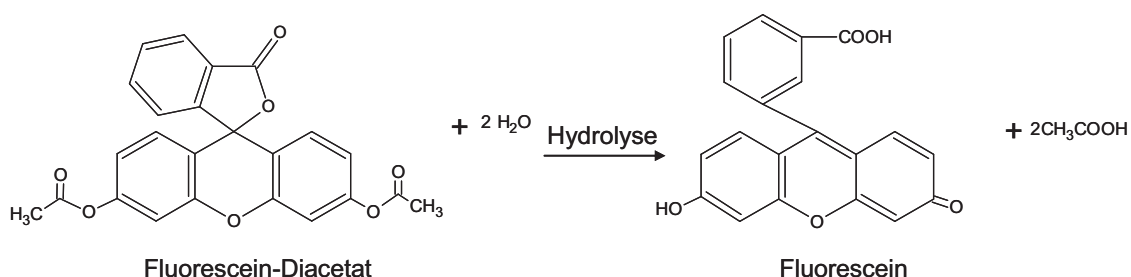


Abb. 2.5: Enzymatische Umwandlung von FDA zu Fluorescein [Adam et al., 2001].

Lipide kommen in vielen Fällen als Speicherstoffe in Sporen vor und dienen unter anderem der Energiegewinnung im Keimungsstoffwechsel. So wurden beispielsweise in keimenden Sporen eine Veränderung der Lipidzusammensetzung und ein Anstieg der Konzentration an Phospholipiden nachgewiesen. Aus diesem Grund kann ein auf Enzymen des Fettstoffwechsels basierender Test ein vielversprechendes Mittel zur Bestimmung der

Viabilität von Sporen darstellen. Zudem konnte mit Hilfe dieses Tests ein linearer Zusammenhang zwischen produziertem Fluorescein und der Zelldichte festgestellt werden und ermöglichte sogar die Differenzierung zwischen toten und lebenden Sporen [Chastain et al., 1990; Morozova et al., 2002]. In weiteren Arbeiten zeigte ein Vergleich von Ergebnissen des FDA-Assays mit Parametern wie der Respirationsrate und dem ATP-Gehalt eine gute Korrelation [Schnurer et al., 1982; Stubberfield et al., 1990; Yang et al., 1995]. Hinzu kommt, dass der Test schnell und einfach durchzuführen ist und FDA in den angewandten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf die Zellen besitzt. Zudem ist bei Mikroorganismen die Fähigkeit zur FDA-Hydrolyse aufgrund der Unspezifität weit verbreitet und damit eine Anwendbarkeit bei vielen filamentösen Pilzen denkbar [Schnurer et al., 1982].

2.4.2 MTT-Assay

Tetrazoliumsalze sind farblose Derivate, welche durch reduzierende Systeme in stark fluoreszierendes Formazan umgewandelt werden. Zu solchen reduzierenden Systemen gehören unter anderem zelluläre Dehydrogenasen wie Succinat- oder NAD(P)H-Dehydrogenasen [Smith et al., 1997]. Aufgrund dieser Fähigkeit werden sie unter verschiedensten Forschungsaspekten zur Ermittlung der Zellviabilität, der metabolischen Aktivität, als Indikator für oxidative Reaktionen sowie zur Detektion und Lokalisation von intrazellulären Reduktasen verwendet [Benau et al., 1990; Liu et al., 1997; Marshall et al., 1995; Prochaska et al., 1988; Satoh et al., 1996; Shearman, 1996; Stellmach et al., 1987].

Im Rahmen von Arzneimittelempfindlichkeitsprüfungen werden Tetrazoliumsalze unter anderem als Indikator für Zellredox-Aktivitäten eingesetzt [Raut et al., 2008]. Zudem ermöglicht ihr Einsatz die Bestimmung viabler bakterieller Zellen, wodurch die vielfache Anwendung der Tetrazolium-Assays zur Detektion mikrobieller Kontaminationen in Nahrungsmitteln begründet ist [Beloti et al., 1999; Rodriguez et al., 1992]. Des Weiteren werden Tetrazolium-Assays zur Erforschung bakterieller Proliferation und mikrobieller Sensibilität genutzt [Tsukatani et al., 2008; Tunney et al., 2004].

Grundsätzlich werden zwei Arten von Tetrazoliumsalzen unterschieden. Die erste Gruppe umfasst Tetrazoliumderivate, wie 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid (**MTT**), 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid (**INT**), 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (**CTC**) und 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid (**TTC**), welche vorwiegend Formazan-Kristalle bilden. Sie besitzen eine positive Ladung und werden als membranpermeabel beschrieben [Berridge et al., 2005].

Tetrazoliumsalze der zweiten Gruppe, wie Natrium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-Tetrazoliumsalz (**XTT**), Natrium-5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazoliumsalz (**WST-1**) und Dinatrium-2,29-dibenzothiazolyl-5,59-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylephenyl]-3,39-(3,39-dimethoxy-4,49-

biphenylene)-ditetrazoliumsalz (**WST-5**) bilden dagegen wasserlösliches Formazan. Sie sind negativ geladen und damit nicht membranpermeabel. Diese Derivate werden hauptsächlich in Kombination mit Elektronenakzeptoren verwendet, welche die Reduktionsreaktion stimulieren [Tachon et al., 2009].

Der Prozess der intrazellulären Reduktion von MTT, INT, CTC und TTC wurde vielfach untersucht [Bernas et al., 1999, 2000, 2002, 2004; Berridge et al., 1993, 2005]. Im Allgemeinen wird das lösliche und nicht oder nur schwach fluoreszierende Tetrazoliumsalz in die Zellen aufgenommen und durch Succinat- oder NAD(P)H-Dehydrogenasen zu unlöslichem, stark fluoreszierenden Formazan reduziert. Das Formazan, welches in Form von Kristallen in aktiven Zellen akkumuliert, kann schließlich durch Fluoreszenz-basierte Verfahren detektiert werden. Dabei kann die ermittelte Fluoreszenzintensität als direktes Maß für die Zellaktivität angesehen werden.

Die Anwendbarkeit des Tetrazoliumsalzes MTT auf Pilzsporen wurde bereits anhand verschiedener Spezies überprüft. Stentelaire et al. (2001) gelang es eine Durchführung für *Penicillium digitatum* zu etablieren, die es ermöglicht die Viabilität eines Sporensatzes zu erfassen. Zudem wurde festgestellt, dass die Ergebnisse des MTT-Assays gut mit den sogenannten koloniebildenden Einheiten (CFU) korrelieren. Darüber hinaus wurde anhand von *A. niger* und *Metarhizium flavoviride* die Übertragbarkeit dieser Methode auf andere Spezies untersucht und ebenso über die CFU-Bestimmung verifiziert, wobei die Enzymaktivitäten sich als stark speziesabhängig erwiesen [Stentelaire et al., 2001]. Damit stellt sich die Frage, wie aussagekräftig die erhaltenen Ergebnisse sind, da die zur Validierung und Verifizierung genutzte CFU-Bestimmung selbst einige Fehlerquellen aufweist und eine exakte Bestimmung der Viabilität erschwert. In dieser Arbeit soll daher die Anwendbarkeit des Assays auf den hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* anhand weiterer Methoden und verschiedener Sporenproben überprüft werden.

2.4.3 Lebend/Tot-Viabilitätstest

Insbesondere für prokaryotische Organismen gibt es zahlreiche Viabilitätstests, die sich verschiedener Farbstoffe und so auch verschiedener Eigenschaften der Organismen bedienen. Dabei stützen sich die meisten Assays auf die veränderte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei der Farbstoffe nur in Zellen mit defekter Zellmembran aufgenommen werden können. Diese Art der Viabilitätsbestimmung wird unter anderem durch den Einsatz des „LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit“ (Invitrogen) realisiert. Bisher wurde diese Methode vorwiegend zur Detektion lebender und toter bakterieller Zellen eingesetzt [Baena-Ruano et al., 2006; Quéric et al., 2004; Welkos et al., 2004].

Das LIVE/DEAD[®] Viability Kit setzt sich aus zwei DNA-interkalierenden Farbstoffen, SYTO 9 Green und Propidiumiodid (PI), zusammen, welche sich durch ihre spektralen Eigenschaften und in ihrer Fähigkeit, membranintakte Zellen zu durchdringen, unterscheiden. Während SYTO 9 Green sowohl intakte als auch defekte Membranen penetriert und damit alle Zellen anfärbt, kann PI nur Zellen mit defekter Membran durchdringen und anfärben. Durch Kombination beider Farbstoffe ergibt sich der Vorteil, dass beide Substanzen bei identischer Anregungswellenlänge (480 nm) unterschiedliches Licht emittieren. SYTO 9 Green emittiert Licht der Wellenlänge 500 nm und lässt alle Zellen damit grün erscheinen, während PI längerwelliges Licht mit 635 nm emittiert, so dass membrandefekte Zellen rot fluoreszieren. Die Detektion der Fluoreszenz kann unter anderem durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM), aber auch mittels Fluoreszenzspektroskopie oder Durchflusszytometrie erfolgen [Invitrogen, 2004]. Da in toten Zellen sowohl SYTO 9 Green als auch PI in die DNA interkalieren, kann es zur Fluoreszenzüberlagerung durch beide Farbstoffe kommen, wodurch die Zellen gelblich/orange erscheinen. Durch die korrekte Konzentrationseinstellung der Farbstoffe mit einem PI-Überschuss kann dies jedoch vermieden werden. Auf diese Weise kann PI durch seine höhere Affinität zur DNA den Farbstoff SYTO 9 Green verdrängen. Die Verdrängung ist allerdings nicht vollständig, so dass Doppelfärbungen und damit Fluoreszenzüberlagerungen dennoch möglich sind [Stocks, 2004].

Da das LIVE/DEAD[®] Viability Kit ursprünglich für die Anwendung an Prokaryoten entwickelt wurde, sind Untersuchungen zur Übertragbarkeit des Tests auf Sporen filamentöser Pilze von großem Interesse. In Versuchen mit *Colletotrichum gloeosporioides* und *Leptosphaeria maculans*, die zu den Ascomyceten zählen, konnte eine Anwendbarkeit bestätigt werden, wobei eine klare Unterscheidung lebender (grün) und toter Sporen (rot) möglich war (vgl. Abbildung 2.6) [Chen et al., 2002].

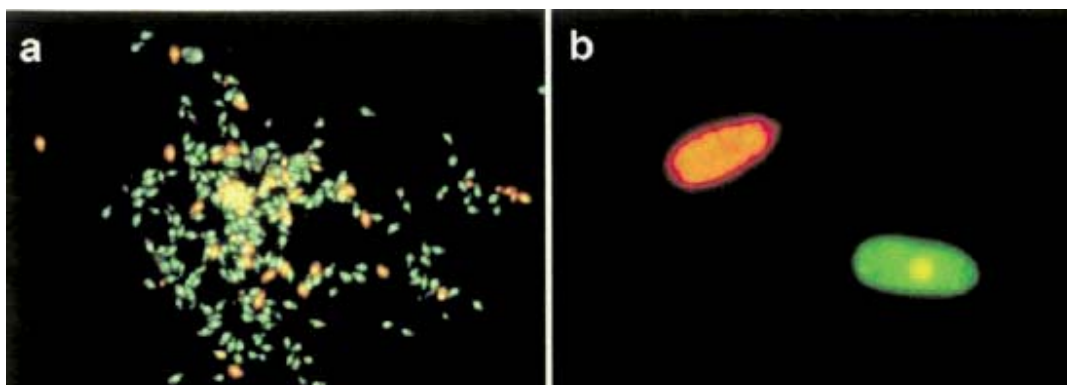


Abb. 2.6: Mittels LIVE/DEAD[®] Viability Kit angefärbte Sporen von (a) *Leptosphaeria maculans* bzw. (b) *Colletotrichum gloeosporioides*. Tote Sporen erscheinen rot, lebende Sporen fluoreszieren grün [Chen et al., 2002].

2.4.4 Keimungspotential von Sporen

Die Keimung von Sporen ist essentiell für den vegetativen Lebenszyklus aller filamentösen Pilze. Sie stellt den ersten Schritt des Wachstumsprozesses dieser Organismen dar, weshalb die Keimfähigkeit, auch Keimungspotential genannt, häufig als Indikator zur Bestimmung der Viabilität von Sporen verwendet wird.

Ranal et al. (2006) stellt die in der Literatur definierten Messgrößen für die Bewertung der Keimung gegenüber. Unter diesen verschiedenen Indikatoren scheint die Keimfähigkeit ein gängiger qualitativer Parameter, welcher auf einer binären Antwort (gekeimt/nicht gekeimt) basiert und häufig in ein quantitatives Attribut (Einheit in Prozent) umgewandelt wird [Ranal et al., 2006].

Bislang wurde die Sporenkeimung vorwiegend auf Agarmedien oder in Flüssigkultur in Flaschen oder Mikrotiterplatten untersucht [Abdel-Rahim et al., 1985; Araujo et al., 2004; Pardo et al., 2005; Paul et al., 1993; Porcel et al., 2006]. Seit kurzem können auch Mikroreaktor-Systeme (vgl. Abbildung 2.7) zur Bestimmung des Keimungspotentials unter submersen Kultivierungsbedingungen eingesetzt werden [Demming et al., 2011]. Dabei handelt es sich um Reaktionssysteme im Mikrolitermaßstab, die aus Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt werden. Charakteristisch ist die optische Transparenz des PDMS, die für die Mikroskopie unabdingbar ist, sowie die gute Gasdurchlässigkeit zur Sauerstoffversorgung der Sporen [Zanzotto et al., 2004].

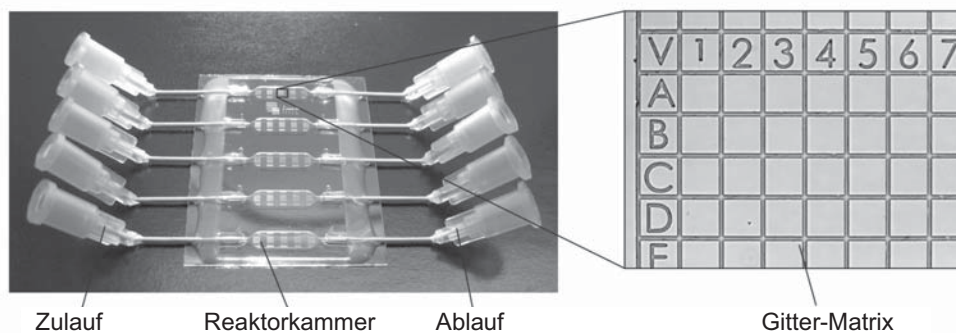


Abb. 2.7: Mikroreaktor-System (21 x 39 mm²) mit 5 parallel angeordneten Reaktor-Kammern (Füllvolumen: 9 µL) und integrierter Gitter-Matrix [Demming et al., 2011].

Die Untersuchung der Sporenkeimung im oben abgebildeten Mikroreaktor-System weist entscheidende Vorteile auf [Demming et al., 2011]:

- die Inkubation findet unter submersen Bedingungen, wie sie auch im eigentlichen Produktionsprozess vorliegen, statt,
- die Eigenschaften des PDMS gewährleisten eine ausreichende Sauerstoffversorgung sowie eine nicht-invasive Bildaufnahme während des Keimungsprozesses,

- die parallele Anordnung fünf unabhängiger Reaktorkammern auf einem System ermöglicht 5-fach-Bestimmungen bzw. die simultane Untersuchung fünf verschiedener Sporenproben,
- die integrierte Gitter-Matrix erleichtert die Fokussierung der Sporen in der Reaktorkammer für bildanalytische Auswertungen,
- durch niedrige Material- und Herstellungskosten können Mikroreaktoren als Einmalartikel verwendet werden.

Die Mikroreaktoren bilden somit eine einfache und kostengünstige Alternative zur Bestimmung der Keimungsfähigkeit von Sporen auf Agarmedium oder in Mikrotiterplatten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen diese Mikroreaktor-Systeme parallel zu den Methoden zur Sporencharakterisierung eingesetzt werden und einen Anhaltspunkt bezüglich der Viabilität der Sporenproben geben.

2.4.5 Speicherstoffe in Sporen filamentöser Pilze

Sporen der *Aspergillus*-Spezies sind grundsätzlich mit einer Vielfalt an Nährstoffen ausgestattet, die die Spore dazu befähigen, Energie und Metabolite für die ersten Entwicklungsschritte der erneuten Keimung bereitzustellen.

Asexuell gebildete Sporen verschiedener *Aspergilli* enthalten neben organischem Stickstoff einen geringen Lipid- sowie einen hohen Kohlenhydratanteil. Die cytosolische Kohlenhydratfraktion besteht dabei hauptsächlich aus Polyolen (z. B. Mannitol, Erythritol, Glycerol) und Zuckern (z. B. Trehalose, Glucose), wobei die Konzentration der jeweiligen Polyole von den Umgebungsbedingungen und der Entwicklungsphase abhängig ist [Morozova et al., 2002; Ruijter et al., 2003]. In vielen filamentösen Pilzen der *Aspergillus*-Spezies überwiegt jedoch der Anteil des Polyols Mannitol. Für *A. niger*-Sporen konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass Mannitol bis zu 15 % der gesamten Biotrockenmasse ausmacht [Lewis et al., 1967; Morozova et al., 2002; Witteveen et al., 1995]. In zahlreichen Publikationen wird über die Funktion dieses Polyhydroxyalkohols diskutiert [Diano et al., 2006; Ruijter et al., 2004; Solomon et al., 2006, 2007; Tereshina et al., 2004; Voegelé et al., 2005; Witteveen et al., 1995]. Wie bereits im Kapitel 2.3.2 beschrieben, werden Polyole vermehrt unter hyperosmotischen Bedingungen gebildet, um die intrazelluläre Osmolalität der Umgebung anzupassen, und so dem drohenden Wasserverlust entgegenzuwirken. Darüber hinaus scheint eine bestimmte Konzentration an Polyolen in den Sporen das Quellverhalten dieser während der frühen Keimungsphase zu unterstützen [Hallsworth et al., 1994; Judet et al., 2008]. Inwieweit Mannitol als Osmoregulator fungiert, konnte bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden. In biochemischen

Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass keimfähige *Aspergillus*-Sporen höhere Konzentrationen an Mannitol enthalten. Der Vergleich zwischen der chemischen Zusammensetzung von Sporen, die zur Keimung befähigt sind, und Sporen, die ihre Fähigkeit zur Keimung verloren haben, zeigte, dass über eine Charakterisierung der cytosolischen Kohlenhydratfraktion von Sporen eine Aussage über die Fähigkeit zur Keimung möglich ist [Morozova et al., 2002; Tereshina et al., 2004]. In weiteren Versuchen mit *A. oryzae* wurde eine kontinuierliche Abnahme der Mannitolkonzentration in der keimenden Spore gemessen, wobei Mannitol über das Enzym Mannitol-Dehydrogenase zu Fructose umgesetzt wird. Bevor die Spore in der Lage ist, eine externe Kohlenstoffquelle zur Keimung zu nutzen, scheint Mannitol als Hauptenergiespeicher für die endogene Respiration zu fungieren [Corina et al., 1971; d'Enfert, 1997; Jennings, 1995; Morozova et al., 2002; Ruijter et al., 2003; Smirnov et al., 1989; Witteveen et al., 1995].

Es wird deutlich, dass Mannitol eine wichtige Rolle als Kohlenstoffverbindung in Sporen filamentöser Pilze zukommt. Zudem werden eine Reihe weiterer physiologischer Funktionen beschrieben, in denen Mannitol als Antioxidant, Reduktant und Osmolytikum wesentlich involviert ist [Ruijter et al., 2004; Witteveen et al., 1995]. Ferner weisen Untersuchungen mit *A. niger* darauf hin, dass Mannitol die Widerstandskraft der Sporen gegen Zellschäden und Stressbedingungen erhöht und der Mannitolgehalt vermutlich die Viabilität von Sporen widerspiegelt [Ruijter et al., 2003; Tereshina et al., 2004]. Damit stellt sich die Frage, inwieweit die Mannitolkonzentration als Qualitätsindikator von Seedingkulturen herangezogen werden kann. Diesbezüglich liegen nach bisherigem Kenntnisstand jedoch keine aussagekräftigen Ergebnisse vor. Hierzu soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.



3 Material und Methoden

3.1 Verwendeter Mikroorganismus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich der Stamm *Aspergillus ochraceus* Wilhelm (DSMZ-Nr. 63304) verwendet. Der filamentöse Pilz wurde in Kryotrockenkultur von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

3.2 Chemikalien

Bacto Malt Extract™ (Malzextrakt) wurde von Becton, Dickinson and Company (Le Pont de Claix, Frankreich) bezogen. Norandrostendion (Nor-AD) und 11- α -OH-Norandrostendion (Nor-OH-AD) sowie Maisquellwasser wurden von Bayer HealthCare Pharmaceuticals (Bergkamen) bereitgestellt. Alle weiteren Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.3 Medien und Lösungen

3.3.1 Festmedien

Zur Sporenanzucht wurden sowohl Komplex- als auch Minimalmedien verwendet, deren Zusammensetzungen in Tabelle 3.1 bis 3.4 aufgeführt sind. Der pH-Wert der Medien wurde mittels HCl bzw. NaOH auf 5,5 eingestellt und das Medium anschließend für 30 min bei 121 °C autoklaviert.

3.3.1.1 Komplexmedien

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Komplexmedien zur Sporenanzucht.

Medium	Substanz	Endkonzentration
PDA	Kartoffel-Dextrose-Agar	39,0 g L ⁻¹
	Uridin	1,0 g L ⁻¹
	Agar	5,0 g L ⁻¹
CYA [Atlas, 1993]	Sucrose	30,0 g L ⁻¹
	Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
	K ₂ HPO ₄	1,0 g L ⁻¹
	Agar	20,0 g L ⁻¹
	Czapek-Konzentrat	10,0 mL
	NaNO ₃	30,0 g L ⁻¹
	KCl	5,0 g L ⁻¹
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	5,0 g L ⁻¹
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g L ⁻¹
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g L ⁻¹
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,1 g L ⁻¹	

Tab.3.1: Zusammensetzung der Komplexmedien zur Sporenanzucht (Fortsetzung).

Medium	Substanz	Endkonzentration [g L ⁻¹]
YESA [Atlas, 1993]	Sucrose	20,0
	Hefeextrakt	4,0
	K ₂ HPO ₄	1,0
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,5
	Agar	20,0
YPGA [Atlas, 1993]	Glucose-Monohydrat	22,0
	NaCl	20,0
	Sojapepton	10,0
	Hefeextrakt	10,0
	Agar	20,0
MY40GA [Atlas, 1993]	Glucose-Monohydrat	440,0
	Malzextrakt	12,0
	Hefeextrakt	3,0
	Agar	20,0
MEA¹	Malzextrakt	30,0
	Sojapepton	3,0
	Agar	15,0
MEA-B	Malzextrakt	30,0
	Sojapepton	3,0
	Agar	20,0
MEA-C	Malzextrakt	50,0
	Sojapepton	3,0
	Agar	20,0
MEA-D	Malzextrakt	50,0
	Agar	20,0
MQWA-A	Maisquellwasser	10,0
	Agar	20,0
MQWA-B	Maisquellwasser	10,0
	Sojapepton	12,5
	Agar	20,0
MQWA-C	Maisquellwasser	50,0
	Agar	20,0

¹ Zur Variation des Agaranteils wurden dem MEA-Medium Agar-konzentrationen von 10 bis 40 g zugesetzt. Zur Veränderung der Salinität im MEA-Medium wurden verschiedene Konzentrationen an NaCl (0,5 bis 4 M) zugefügt (vgl. Kapitel 3.6.5).

3.3.1.2 Minimalmedien

Um den Einfluss verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen auf die Sporenbildung zu untersuchen, wurde ein Minimalmedium verwendet, welches entweder variierende Kohlenstoffquellen oder unterschiedliche Stickstoffverbindungen enthielt. Die Zusammensetzungen der Medien sind in Tabelle 3.2 bis 3.4 dargestellt.

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Minimalmedien mit variierender C-Quelle.

1000	mL	Medienkomponenten
2,0	mL	1M MgSO ₄ -Lösung
20,0	mL	ASPA-Lösung (siehe Tab. 3.4)
1,0	mL	Spurenelement-Lösung (siehe Tab. 3.4)
15,0	g	Agar
3,0	g	NaNO ₃
4,0	g	C-Anteil

Folgende alleinige Kohlenstoffquellen wurden jeweils zur Sporenanzucht getestet: Arabinose, Arbutin, Cellobiose, Cellulose, Citronensäure, Fructose, Galactose, Glucose, Glycerol, Lactose, Maltose, Mannose, Mellibiose, Natrium-Acetat, Stärke, Sucrose, Xylose, α -Ketoglutarat.

Tab. 3.3: Zusammensetzung der Minimalmedien mit variierender N-Quelle.

1000	mL	Medienkomponenten
2,0	mL	1M MgSO ₄ -Lösung
20,0	mL	ASPA-Lösung (siehe Tab. 3.4)
1,0	mL	Spurenelement-Lösung (siehe Tab. 3.4)
15,0	g	Agar
10,0	g	Glucose
0,5	g	N-Anteil

Als alleinige Stickstoffquelle wurden Ammoniumnitrat, Ammoniumoxalat, Ammoniumsulfat, Harnsäure, Harnstoff, Kaliumnitrat, Natriumnitrat, N-Methyl-D-Glucamin, Xanthin, α -Aminobuttersäure, Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Glutamin, Glutamat, Glycin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Isoleucin, Prolin, Serin, Threonin oder Valin eingesetzt. Da Glutamin und Asparagin während des Autoklavierprozesses zersetzt werden, wurden diese Substanzen nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Lösung dem Minimalmedium zugegeben.

Tab. 3.4: Zusammensetzung der Medienzusätze.

Medienzusatz	Konzentration [g L ⁻¹]	Bestandteile
1 M MgSO₄	246,50	MgSO ₄ · 7H ₂ O
ASPA-Lösung Lagerung: 4 °C	26,11 74,85	KCl KH ₂ PO ₄ → pH 5,5; autoklavieren (30 min, 121 °C)
Spurenelement-Lösung Lagerung: 4 °C	10,00 4,40 1,01 0,32 1,00 0,32 1,47 0,22	EDTA ZnSO ₄ · 7H ₂ O MnCl ₂ · 4H ₂ O CuSO ₄ · 5H ₂ O FeSO ₄ · 7H ₂ O CoCl ₂ · 6H ₂ O CaCl ₂ · 2H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O → pH 4,0; sterilfiltrieren

Die C-Quelle wurde jeweils getrennt von den anderen Medienbestandteilen autoklaviert. Dabei wurde das noch hinzuzufügende Volumen der Nährmedienzusätze (Tab. 3.4) berücksichtigt. Die autoklavierten Medienbestandteile wurden anschließend unter sterilen Bedingungen zusammen gegeben.

3.3.2 Flüssigmedien

Die Kultivierungsmedien wurden nach den in Tabelle 3.5 angegebenen Protokollen angesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde mittels HCl bzw. NaOH auf pH 5,5 eingestellt und das Medium anschließend für 30 min bei 121 °C autoklaviert.

Tab. 3.5: Verwendete Komplexmedien zur Kultivierung.

Medium	Substanz	Endkonzentration [g L ⁻¹]
MQW	Maisquellwasser	10,0
	Sojapepton	12,5
ME	Malzextrakt	30,0
	Sojapepton	3,0




3.4 Stammkonservierung

Die von der DSMZ bezogene Kryotrockenkultur von *A. ochraceus* wurde zunächst in 5 mL ME-Medium (Tab. 3.5) resuspendiert. Zur Herstellung der ersten Generation wurden jeweils 150 µL dieser Suspension auf MEA-Medium (Tab. 3.1) in Dunkelheit bei 30 °C (B 6760, Heraeus, Hanau) inkubiert. Nach 5 Tagen wurden die Sporen mit je 10 mL 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung geerntet und über einen Miracloth[®]-Filter (Porendurchmesser 20 µm, Calbiochem, La Jolla CA, US) filtriert. Die erhaltene Sporensuspension wurde mit identischem Volumen 30 %-iger (v/v) Glycerinlösung versetzt (Endkonzentration an Glycerin: 15 % v/v) und in Aliquots zu je 1 mL in Kryogefäße überführt. Nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff wurden die Stockkulturen bei -80 °C gelagert. Ausgehend von diesen Stammkulturen wurden zunächst Vorkulturen der zweiten Generation auf MEA-Medium hergestellt, mit der schließlich die verschiedenen Sporensätze der dritten Generation angezogen wurden. Mit diesem Vorgehen konnte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Viabilitäts-eingeschränkte Kryo-Sporen ausgeschlossen werden.

3.5 Optimierung der Sporenernte

Zur Optimierung der Herstellung der Sporensuspension galt es zunächst, den Einfluss verschiedener Erntemethoden hinsichtlich der erzielten Sporenausbeute zu untersuchen. Zur Sporenanzucht wurden jeweils 1,5 mL einer Sporensuspension der zweiten Generation mit einer Konzentration von $2,8 \cdot 10^6$ Sporen mL⁻¹ auf MEA-Medium in Petrischalen (Durchmesser 145 mm, Höhe: 20 mm, Greiner Bio One, Solingen) bzw. in 1 L-Erlenmeyerkolben für 8 Tage bei 24 °C (Certomat[®] BS-1, Sartorius, Göttingen) inkubiert. Die Sporenernte erfolgte in 25 mL 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung nach den in Tabelle 3.6 dargestellten Varianten.

Tab. 3.6: Übersicht der verwendeten Erntemethoden.

Erntemethode	
<p><u>A) Abernten mit Spatel von Agarplatte</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ernte mittels Drahtspatel in 25 mL 0,9 %-iger NaCl-Lösung • Erntefläche ca. 130 cm² 	
<p><u>B) Filtervariante</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Überführung des Filters in steriles Gefäß mit 25 mL 0,9 %-iger NaCl-Lösung und 10 g Glaskugeln (Ø 3 mm) • Schütteldauer: 20 min; Schüttelintensität: 100 min⁻¹ • Erntefläche ca. 130 cm² 	
<p><u>C) Abernten mit Glasperlen im 1 L-Erlenmeyerkolben (3 Schikanen)¹</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Sporenernte in 25 mL 0,9 %-iger NaCl-Lösung • Ø Glasperlen: 0,5 bis 6 mm; Glaskugelmenge: 10 bis 20 g • Schütteldauer: 20 bis 60 min; Schüttelintensität: 100 min⁻¹ • Erntefläche ca. 130 cm² 	

¹ Zusätzlich erfolgte die Sporenernte im Kolben mittels Tween versetzter NaCl-Lösung (Endkonzentration an Tween: 0,1 bis 0,5 % v/v).

3.6 Sporeanzucht unter variierten Sporulationsbedingungen

Zur Sporeanzucht wurden je nach Versuch unterschiedliche Agarmedien auf eine Höhe von 1,2-1,5 cm in sterile 1 L-Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen gegossen. Anschließend wurden die Agaroberflächen mit jeweils 1,5 mL Sporensuspension (zweite Generation) beimpft, wobei, wenn nicht anders beschrieben, eine Sporenkonzentration von $2,8 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt wurde. Dies entspricht einer Sporendichte von 320 Sporen mm⁻² Agaroberfläche. Um den Einfluss verschiedener Parameter auf die Sporenbildung und -güte zu analysieren, wurden verschiedene Bedingungen zur Sporeanzucht eingestellt (vgl. Abbildung 3.1). Nach der Optimierung des Sporenernte-Verfahrens (vgl. Kapitel 3.5) wurden pro Kolben bzw. 130 cm² Erntefläche 15 g Glasperlen (Ø 5 mm) in 25 mL steriler 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung verwendet. Zur Abscherung der Sporen von der Agaroberfläche wurden die Kolben für 20 min bei 100 min⁻¹ (Certomat® IS, Auslenkung 50 mm, Sartorius, Göttingen) geschüttelt. Nach Filtration über einen Miracloth-Filter (Porendurchmesser 20 µm, Calbiochem, La Jolla CA, US) wurde die Konzentration der erhaltenen Sporensuspension durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt (vgl. Kapitel 3.7.1).

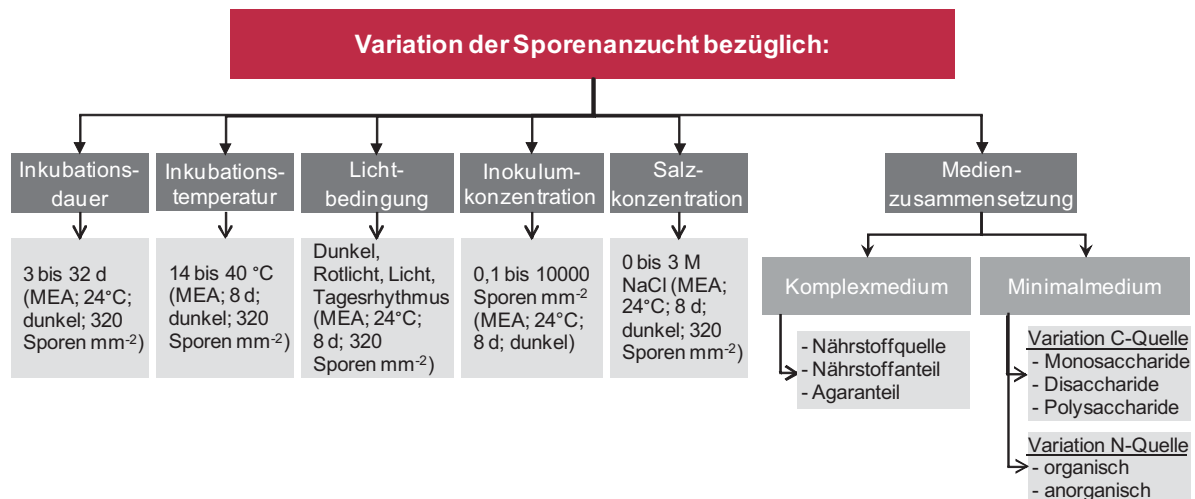


Abb. 3.1: Schema der Versuche zur Sporenanzucht unter verschiedenen Bedingungen.

3.6.1 Variation der Inkubationsdauer

Für die Untersuchung des Einflusses der Inkubationsdauer auf die Sporulation wurden 1,5 mL Sporensuspension mit einer Sporenkonzentration von $2,8 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (zweite Generation) zum Beimpfen des MEA-Mediums verwendet. Alle Proben wurden in Dunkelheit bei 24 °C inkubiert. Die Sporen wurden nach 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 16, 20, 28 und 32 Tagen, wie unter 3.6 beschrieben, mittels Glasperlen geerntet. Anschließend wurden die erzielten Sporenkonzentrationen der einzelnen Ansätze über die Messung der optischen Dichte bestimmt.

3.6.2 Variation der Inkubationstemperatur

Die Abhängigkeit der Sporulation von der Umgebungstemperatur wurde durch Inkubation der Versuchsansätze auf MEA-Medium bei Temperaturen zwischen 14 °C und 40 °C (in Abständen von 3 °C) untersucht. Dabei wurden die Ansätze wie unter 3.6 beschrieben beimpft und bei den jeweiligen Temperaturen in Dunkelheit inkubiert. Nach 8 Tagen erfolgte die Sporenernte und die Bestimmung der Sporenkonzentration der bei verschiedenen Temperaturen inkubierten Ansätze.

3.6.3 Variation der Lichtbedingung

Zur Untersuchung der Sporenbildung in Abhängigkeit von der Lichtbedingung wurde MEA-Medium, wie unter 3.6 beschrieben, mit Sporen beimpft und bei verschiedenen Lichtbedingungen (siehe Tabelle 3.7) bei 24 °C inkubiert. Neben den Ansätzen in Dunkelheit und bei Rotlicht (780 nm, Infraphil HP 1510, 100 W, Philips, Amsterdam, Niederlande) wurde der Einfluss ständiger und tagesrhythmischer Bestrahlung mit künstlichem Licht (570 bis 690 nm) untersucht. Die Sporen wurden nach 8 Tagen geerntet und die Konzentration der verschiedenen Ansätze bestimmt.

Tab. 3.7: Variation der Lichtbedingung und Dauer pro Tag.

Lichtbedingungen	Dauer [h d ⁻¹]
Dunkelheit	24
Rotlicht	24
Licht	24
Tagesrhythmus (Licht)	9

3.6.4 Variation der Inokulumkonzentration

Um den Einfluss der Inokulumkonzentration auf die Sporenbildung zu untersuchen, wurde MEA-Medium in sterile 1 L-Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurde die Agaroberfläche der einzelnen Versuchsansätze mit Inokulumdichten von 0,1 bis 10⁴ Sporen mm⁻² beimpft. Dafür wurden 1,5 mL Sporensuspension auf den Medien verteilt, wobei zuvor verschiedene Inokulumkonzentrationen (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ und 10⁸ Sporen mL⁻¹) in 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung eingestellt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 24 °C unter Lichtausschluss. Die Sporen wurden nach 8 Tagen, wie unter 3.6 beschrieben, geerntet und die Sporenkonzentration bestimmt.

3.6.5 Variation des Salzgehaltes des Mediums

Um den Einfluss der Salinität des Agarmediums auf die Sporenbildung zu untersuchen, wurden dem MEA-Medium verschiedene Konzentrationen an NaCl (0,5 M bis 3 M) beigelegt. Nach Beimpfen der verschiedenen Ansätze, wie unter 3.6 beschrieben, und 8-tägiger Inkubation bei 24 °C in Dunkelheit, erfolgte die Sporenernte und die Bestimmung der Sporenkonzentration. Zur Ermittlung der Osmolalität der Medien wurden diese ohne den Zusatz von Agar hergestellt. Anschließend wurden 50 µL der verschiedenen Medienansätze mittels Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) analysiert. Tabelle 3.8 zeigt die Osmolalitäten der verschiedenen Medien.

Tab. 3.8: Osmolalität der verschiedenen Medien ohne Agaranteil.

Medium	Osmolalität [mosmol kg ⁻¹]
MEA	100
MEA+0,5 M NaCl	1042
MEA+1,0 M NaCl	1956
MEA+1,5 M NaCl	2880
MEA+2,0 M NaCl	3820
MEA+2,5 M NaCl	4730
MEA+3,0 M NaCl	5640

3.6.6 Variation der Medienzusammensetzung

Sporenbildung auf Komplexmedium

Zunächst wurde in Vorversuchen die Sporenbildung auf verschiedenen komplexen Agarmedien untersucht. Um den Einfluss der verschiedenen Zusätze des MEA-Mediums auf die Sporenbildung zu analysieren, wurden variierende Zusammensetzungen des Komplexmediums bezüglich Agar-, Nährstoffquelle und -gehalt getestet. Die genauen Zusammensetzungen der verschiedenen Komplexmedien sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Die Versuchsdurchführung zur Sporenanzucht erfolgte wie unter 3.6 beschrieben bei 24 °C unter Lichtausschluss. Die Sporen wurden nach 8 Tagen geerntet und die Konzentration der verschiedenen Ansätze bestimmt.

Sporenbildung auf Minimalmedium

Um für die Sporenbildung bevorzugte Nährstoffquellen aufzudecken, wurden verschiedene Mono-, Di- und Polysaccharide sowie organische und anorganische Stickstoffquellen zur Sporenanzucht im Agarmedium eingesetzt. Als Basismedium wurde ein Minimalmedium verwendet, welches entweder eine variierende Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle (C:N-Verhältnis 8:1) enthielt. Dazu wurde der jeweilige C- bzw. N-Anteil der Quelle berechnet und die Substanz für einen absoluten C-Anteil von 4 g L⁻¹ und einen absoluten N-Anteil von 0,5 g L⁻¹ entsprechend eingewogen.

Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener C-Quellen kam stets NaNO₃ zum Einsatz (Tab. 3.2). Bei der Variation der N-Quelle wurde Glucose als C-Quelle eingesetzt (Tab. 3.3). Da Glucose als primäre C-Quelle den Katabolismus anderer im Medium enthaltener C-Verbindungen weitestgehend reprimiert, kann eine Metabolisierung der eingesetzten organischen N-Quellen (Aminosäuren) als C-Quelle nahezu ausgeschlossen werden [Ruijter et al., 1997]. Ein möglicher Einfluss durch das höhere tatsächliche C:N-Verhältnis in diesen Medien wird in der Diskussion berücksichtigt.

Die Versuchsdurchführung zur Sporenanzucht erfolgte wie unter 3.6 beschrieben in Dunkelheit. Die Sporen wurden nach 8 und 11 Tagen geerntet und die Konzentration der verschiedenen Ansätze bestimmt.

3.7 Charakterisierung der Seedingkulturen

3.7.1 Bestimmung der Sporenkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Sporen erfolgte über die Messung der Optischen Dichte mittels Photometer (SmartSpec™ 3000, Bio-RAD, Laboratories, Hercules, USA). Um eine Korrelation zwischen Absorption und Sporenkonzentration aufzustellen, wurden Verdünnungen verschiedener Sporensuspensionen von 1:10 bis 1:50 in 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung mittels Thoma-Zählkammer (Thoma; 0,0025 mm²; Tiefe: 0,1 mm; Blaubrand®, Brand, Wertheim) ausgezählt und die Absorption der jeweiligen Verdünnungen bei einer Wellenlänge von 600 nm aufgenommen (vgl. Abb. 3.2).

Die Regression der Messpunkte ergibt eine Steigung von $2,0 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Berechnung der Sporenkonzentration aus den gemessenen Absorptionswerten herangezogen wurde.

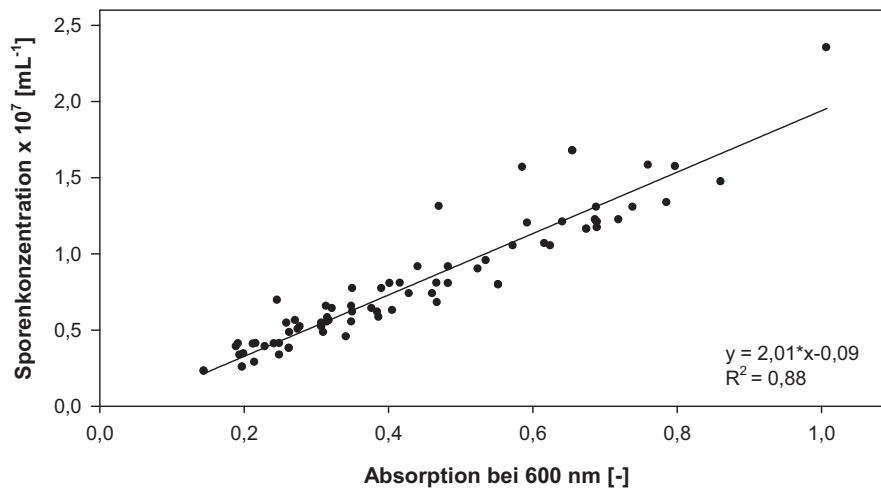


Abb. 3.2: Korrelation zwischen Sporenkonzentration und Absorption bei 600 nm.

3.7.2 Bestimmung der Sporenaktivität

3.7.2.1 MTT-Assay

Zur Ermittlung der respiratorischen Aktivität einer Probe wurden verschiedene Vorversuche zur Etablierung und Optimierung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays durchgeführt. Der Nachweis der Aktivität beruht dabei auf der enzymatischen Reduktion des farblosen MTT zu stark fluoreszierendem MTT-Formazan, welches photometrisch bei 560 nm nachgewiesen werden kann.

Zur Bestimmung einer geeigneten Reaktionslösung wurden Sporen in 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung sowie in 60 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) auf die Umsetzung von MTT zu MTT-Formazan getestet. Gleichzeitig erfolgte eine Variation der eingesetzten Sporenkonzentration im Bereich von 10^7 bis $2 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} , um Aussagen über die für den Assay minimal benötigte bzw. optimale Sporenkonzentration treffen zu können. Als Negativkontrolle dienten autoklavierte Sporen (30 min, 121°C).

Zur Überprüfung der Detektierbarkeit sowohl aktiver als auch inaktiver Seedingkulturen wurden tote und lebende Sporen in definierten Verhältnissen miteinander vermischt und auf ihre respiratorische Aktivität getestet. Das Verfahren zur Validierung des MTT-Assays wurde mit unterschiedlich abgetöteten Sporen (a: Hitzebehandlung bei 121 °C, 30 min; b: UV-Licht-Behandlung bei 254 nm, 1 h) durchgeführt. Die vollständige Inaktivierung der Sporen wurde durch Ausstreichen auf MEA-Medium sowie mittels Lebend/Tot-Viabilitätstest (vgl. Kapitel 3.7.4.1) überprüft.

Nach der Optimierung und Validierung des Assays erfolgte die Vermessung der verschiedenen Sporenproben. Dazu wurden die in 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung suspendierten Sporen für 10 min bei 13.000 min^{-1} (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sporensediment im gleichen Volumen 60 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) resuspendiert. Die Konzentration der Sporensuspension wurde erneut durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt, wobei als Blindwert Phosphatpuffer verwendet wurde.

Pro Ansatz wurden 250 μL der MTT-Lösung (7 g L^{-1} in 60 mM Phosphatpuffer, pH 7,6) in einem 2 mL-Reaktionsgefäß für 10 min bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Thermoblock TB1, Biometra, Göttingen) vortemperiert. Daraufhin wurden 250 μL der Sporensuspension, welche zuvor mittels Phosphatpuffer auf eine Konzentration von $10^8 \text{ Sporen mL}^{-1}$ eingestellt wurde, hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μL 1 M HCl abgestoppt. Um überschüssiges MTT abzutrennen, wurden die Proben für 10 min bei 5.000 min^{-1} und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Extraktion des MTT-Formazans aus den Sporen erfolgte durch Zugabe von 2 mL 2-Propanol und anschließendem leichten Vermischen. Um die Vollständigkeit der Extraktion zu gewährleisten, wurden die Proben für weitere 10 min bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 800 min^{-1} im Schüttelblock (MHL 20, HLC, Bovenden) inkubiert. Zur Abtrennung fester Bestandteile wurde im Anschluss 5 min bei 5.000 min^{-1} und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Je 1 mL des Überstands wurde in eine Küvette überführt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm vermessen. Als Blindwert diente 2-Propanol. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch unspezifische Reaktionen der Sporen zu vermeiden, wurde ein Kontrollansatz vermessen, der ausschließlich Sporen in Phosphatpuffer ohne MTT enthielt. Anschließend wurde dieser Ansatz analog der Proben weiter aufgearbeitet. Der OD-Wert der Kontrolle wurde von den OD-Werten der Proben subtrahiert. Pro Ansatz wurden drei biologische und jeweils drei technische Replikate vermessen.

3.7.2.2 FDA-Assay

Der Fluorescein-Diacetat (FDA)-Assay dient der Ermittlung der enzymatischen Aktivität einer Probe. Dabei wird Fluorescein-Diacetat in die Zellen aufgenommen und durch Proteasen, Lipasen und Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert. Die Fluoreszenzintensität kann schließlich fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm gemessen werden.

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität keimender Sporen unter submersen Bedingungen wurden basierend auf der Methode von Adam und Duncan (2001), in Vorversuchen zunächst die optimale FDA-Konzentration, Inkubationszeit und Methode zur Extraktion des Fluoresceins untersucht [Adam et al., 2001]. Um maximale Fluoreszenzen zu erhalten, wurden neben der Variation der Wellenlänge des Emissionsfilters (510 nm und 538 nm) unterschiedliche Resuspensionslösungen verwendet. Dazu wurden sowohl 60 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) mit und ohne Zusatz von 150 mM NaCl, KCl oder MgCl_2 als auch 0,9 und 2 %-ige (w/v) NaCl-Lösungen auf ihre Anwendbarkeit als Resuspensionslösung

überprüft. Als Inokulum dienten Sporen, die nach 8 Tagen Inkubation bei 24 °C auf MEA-Medium angezogen wurden.

Zur Bestimmung der Biomasseaktivität in den ersten Stunden submerser Kultivierungen wurden 30 mL ME-Medium (Tab. 3.5) in 100 mL-Erlenmeyerkolben (3 Schikanen) mit einer Sporenkonzentration von 10^6 mL^{-1} beimpft und bei 24 °C und 130 min^{-1} in Dunkelheit inkubiert. Die Probenahme erfolgte nach 0, 3, 6 und 10 h in Doppelbestimmung. Je Ansatz wurden 2 mL Probe entnommen und 3 min bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert. Das Zellsediment wurde nach Verwerfen des Überstands in 1 mL 60 mM Phosphatpuffer resuspendiert und mit 10 μL FDA-Lösung (2 g L^{-1} in Aceton) versetzt. Nach leichtem Homogenisieren erfolgte die Inkubation für 30 min bei 30 °C und 800 min^{-1} im Schüttelblock. Nach Zugabe von 1 mL Chloroform:Methanol (v/v 2:1) und anschließendem Homogenisieren wurde die Probe 5 min bei 13.000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Aus der oberen wässrigen Phase wurden 100 μL in eine schwarze 96-Well-Platte (F96 MicroWell™ Plates, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) überführt und die relative Fluoreszenzintensität mittels Fluorometer (Fluoroskan-Ascent 100-240 V, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 538 nm als 4-fach Bestimmung vermessen. Vor jedem Messschritt wurden die Proben bei 540 min^{-1} für 3 s geschüttelt. Die ermittelte relative Fluoreszenzintensität (dargestellt als relative Fluoreszenz Einheit RFU) ist ein Maß für die enzymatische Aktivität der keimenden Sporen und dokumentiert, aufgetragen gegen die Inkubationszeit, den Verlauf der Sporenaktivität in der frühen Phase submerser Kultivierung. Um die Eigenfluoreszenz der Sporen und des ME-Mediums sowie die Selbsthydrolyse von FDA zu berücksichtigen, wurden zwei Kontrollansätze gewählt: Ein Ansatz enthielt ausschließlich $2 \cdot 10^6$ Sporen in 1 mL Phosphatpuffer und wurde ohne FDA inkubiert. Ein weiterer Ansatz enthielt 2 mL ME-Medium, jedoch keine Sporen und wurde auf die gleiche Weise wie die Proben mit FDA inkubiert. Dieser zweite Blindwert diente sowohl der Bestimmung der Fluoreszenz von ME-Medium und FDA als auch der Ermittlung der aus möglichen Wechselwirkungen zwischen Medium und FDA resultierenden Fluoreszenz. Zur Auswertung wurden die RFU-Mittelwerte der 4-fach-Bestimmung abzüglich der Blindwerte gegen die Kultivierungszeit aufgetragen.

3.7.3 Bestimmung des Keimungspotentials von Sporen

Zur Bestimmung des Sporenkeimungspotentials wurden Mikroreaktor-Systeme (Volumen = 9 μL , Institut für Mikrotechnik, TU Braunschweig) mit integrierter Gitter-Struktur verwendet. Diese wurden mittels tiefen- und softlithographischer Verfahren, durch Abformung eines Polymers (Poly(dimethylsiloxan), Sylgard® 184 Elastomer Kit, Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) mit einem formgebenden Master aus SU-8 (MicroChem. Corp., Newton, MA, USA) hergestellt und nach einer Sauerstoff-Plasmaaktivierung auf einen Glasträger gebondet [Demming et al., 2011].

Zum Befüllen des Mikroreaktors wurden Kanülen (100 Stericon, Ø 0,08 x 25 mm, Braun, Melsungen) beidseitig in die schmalen Zuläufe der Kammern geschoben und mit einer Silikonkautschukverbindung (692-542, RS Components, Gmünd, Österreich) abgedichtet. Zur Bestimmung des Sporenkeimungspotentials wurden 5 mL ME-Medium (Tab. 3.5) sterilfiltriert (Minisart, Porengröße 0,2 µm, Sartorius, Göttingen) und mit einer Sporenkonzentration von $1 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ beimpft. Nach Desinfektion der Reaktorkammern für 2 min mit 70 %-igem Ethanol, wurden diese zunächst mit ME-Medium und schließlich mit 100 µL inokuliertem Medium befüllt. Die Kanülen wurden über Luer-Lock-Verbindungen (Novodirect GmbH, Kehl) und Schläuche mit einem mit Medium gefüllten Gefäß verbunden. Der hydrostatische Druck, der sich durch den Flüssigkeitsstand in dem Gefäß aufbaut, verhindert die Austrocknung und Blasenbildung im Mikroreaktor während der Kultivierung. Das Mikroreaktor-System wurde anschließend unter dem Mikroskop (Axioscop, Zeiss, Jena) positioniert. Abbildung 3.3 zeigt den schematischen Aufbau des Versuchesstandes.

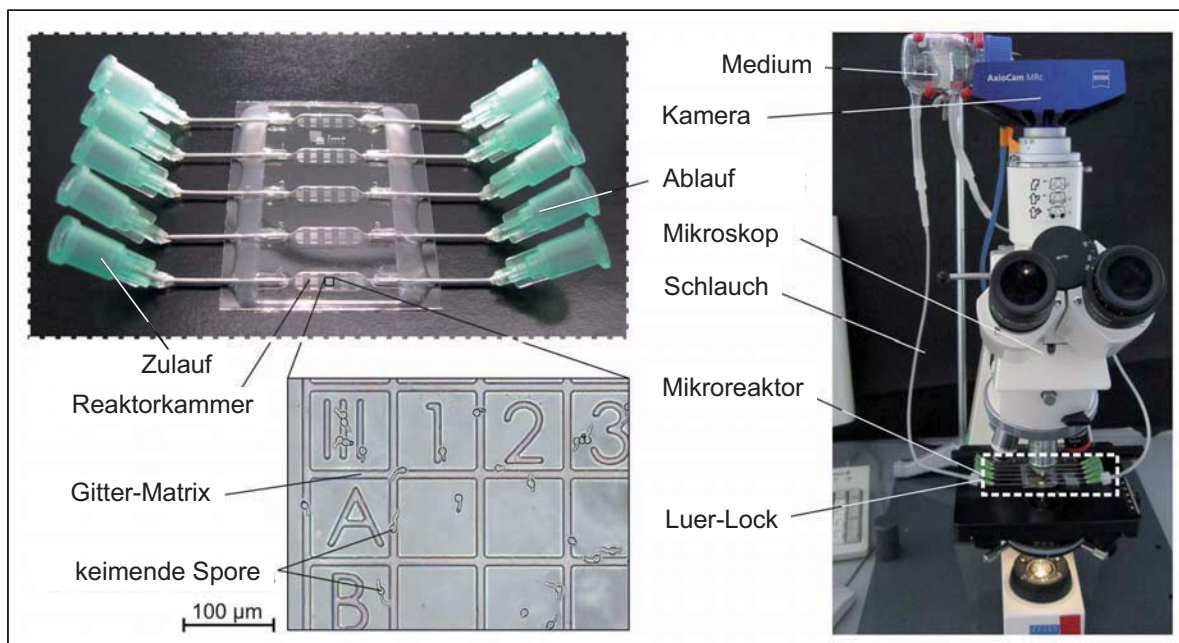


Abb. 3.3: Mikoreaktor-System mit 5 parallelen Reaktorkammern und eine vergrößerte Aufnahme der Gitter-Matrix mit keimenden Sporen (links), Aufbau des Versuchesstandes für die Aufnahme der Sporenkeimung (rechts) [Demming et al., 2011].

Während der Kultivierung wurde die Temperatur im Mikroreaktor konstant auf 24 °C eingestellt und in einstündigen Abständen mittels integrierter Mikroskopkamera (Axioscop MRC, Zeiss, Jena) bei 20-facher Vergrößerung eine Bildreihe der keimenden Sporen aufgenommen. Zur Auswertung wurde der prozentuale Anteil ausgekeimter Sporen zur Gesamtsporenzahl im Mikroreaktor über der Kultivierungszeit aufgetragen.

3.7.4 Bestimmung der Sporenbeschaffenheit

3.7.4.1 Lebend/Tot-Viabilitätstest

Das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) ermöglicht durch die unterschiedlichen Fluoreszenz-Eigenschaften der Farbstoffe SYTO 9 Green und Propidiumiodid (PI) eine optische Differenzierung intakter und defekter Zellen anhand ihrer Membranintegrität. Während SYTO 9 Green alle Membranen passieren kann und alle Zellen im konfokalen Laser Scanning Mikroskop (CLSM) grün erscheinen lässt, kann PI nur defekte Membranen durchdringen und diese Zellen rot anfärben.

Um eine Übertragbarkeit des Assays auf Sporen von *A. ochraceus* zu untersuchen, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Dabei fand unter anderem eine Variation der Farbstoffkonzentration sowie der Inkubationsdauer und -temperatur statt. Gleichzeitig erfolgte eine Variation der eingesetzten Sporenkonzentration, um Aussagen über die für den Assay minimal benötigte bzw. optimale Sporenkonzentration treffen zu können.

Der Test wurde schließlich nach folgendem Protokoll durchgeführt: Zunächst wurden identische Volumina an SYTO 9 Green (3,34 mM) und PI (20 mM) frisch vor jeder Versuchsreihe miteinander vermischt. Zuvor wurden die zu untersuchenden Proben mit 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung auf eine Sporenkonzentration von $5 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt. Im nächsten Schritt wurden 3 μL des Reaktionsgemisches (SYTO 9 Green und PI) zu jeweils 1 mL Sporensuspension gegeben und 10 min bei Raumtemperatur, dunkel und unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Schließlich wurden 10 μL einer Probe mittels CLSM (Laser Scanning System LSM 510, Zeiss, Jena) mikroskopiert. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte bei einer Wellenlänge von 480 nm. Pro Versuchsansatz wurden zwei biologische Replikate vermessen, wobei jeweils 10 Bildausschnitte (230 bis 300 Sporen) aufgenommen wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Volocity-Bildanalyse-Software (Volocity 4.1.0.179, Perkin Elmer, Waltham MA, USA), wobei die Gesamtanzahl der Sporen pro Bild sowie die Anzahl der membrandefekten Sporen (rot) bei inaktivem SYTO 9 Green-Fluoreszenzkanal bestimmt wurden. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde der prozentuale Anteil membranintakter bzw. -defekter Sporen zur Gesamtsporenanzahl gewählt. Die Einstellungen des CLSM bzw. der Volocity-Bildanalyse-Software sind in Tabelle 3.9 und 3.10 dargestellt.

Tab. 3.9: CLSM-Einstellungen zur Bestimmung der Sporenbeschaffenheit.

Objektiv:	40x/1,20 W Korr-Objektiv
Laser:	Argon (5,3 A)
Detektor:	Meta-Detektor
Exzitation:	488 nm
Emissionsfilter:	PI (rot): 590-635; SYTO 9 (grün): 500-530
Pinhole:	PI (rot): 82 μm ; SYTO 9 (grün): 70 μm
Aufnahme:	Aufnahmegeschwindigkeit: 7 s Aufnahmezeit: 15,73 s
Scan mode:	Plane, 8 bit
Stack size:	1024 x 1024 x 1 (225 μm x 0,22 μm x 0 μm)
Scaling:	0,22 μm x 0,22 μm x 1,00 μm

Tab. 3.10: Volocity-Bildanalyse-Einstellungen zur Bestimmung der Sporenbeschaffenheit.

Parameter	Einstellung
Rot-Fluoreszenzkanal	
Find objects by % intensity:	Lower: 30; Upper: 100
Separate touching objects:	Object size guide: 1 μm^2
Exclude objects by size:	< 5 μm^2
Grün-Fluoreszenzkanal	
Find objects by % intensity:	Lower: 10; Upper: 100
Separate touching objects:	Object size guide: 1 μm^2
Exclude objects by size:	< 5 μm^2

3.7.4.2 Bestimmung der Kohlenhydrat- und Polyolkonzentration

Die Kohlenhydrat- und Polyolkonzentration in den Sporen wurde mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bestimmt. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wurden die zu untersuchenden Sporenproben auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} in 0,9 %-iger NaCl-Lösung eingestellt. Nach Zentrifugation der einzelnen Ansätze für 3 min bei 13.000 min^{-1} wurde der Überstand entfernt und das Sporenpellet im gleichen Volumen steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde jeweils 1 mL Sporensuspension 10 min bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und für 5 min bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 5 min bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert. Im Anschluss wurden je 500 μL des erhaltenen Überstandes in HPLC-Vials überführt und chromatographisch vermessen. Um den Gehalt an Kohlenhydraten und Polyolen zu bestimmen, kamen zwei HPLC-Systeme (ELITE LaChrom™, Merck-Hitachi, Darmstadt) zum Einsatz. Die technischen Daten und Betriebsparameter der verwendeten HPLC-Anlagen sowie die jeweiligen Retentionszeiten der Zucker und Polyole sind in Tabelle 3.11 bis 3.13 aufgelistet.

Tab. 3.11: Technische Daten der verwendeten HPLC-Anlagen.

	HPLC-Anlage 1	HPLC-Anlage 2
Vorsäule:	Varian Metacarb 87C Guard (50 mm x 4,6 mm) ¹	Micro-Guard Cation-H Cartridge (30 mm x 4,6 mm) ²
Trennsäule:	Varian Metacarb 87C (300 mm x 7,8 mm) ¹	Bio-RAD Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) ²
Pumpe:	L-2130, isokratisch; LaChrom ELITE	L-2130, isokratisch; LaChrom ELITE
Detektor:	RI-Detektor L-2490; LaChrom ELITE	RI-Detektor L-2490, UV-Detektor L-2400 (210 nm); LaChrom ELITE
Säulenofen:	L-2350; LaChrom ELITE	L-2350; LaChrom ELITE
Autosampler:	L-2200; LaChrom ELITE	L-2200; LaChrom ELITE

¹ Varian, Santa Clara, USA; ² Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Tab. 3.12: Betriebsparameter der verwendeten HPLC-Anlagen.

	HPLC-Anlage 1	HPLC-Anlage 2
Temperatur:	85 und 50 °C	45 °C
Laufmittel:	steriles deionisiertes Wasser	12,5 mM H ₂ SO ₄
Flussrate:	0,6 mL min ⁻¹	0,5 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen:	20 µL	20 µL

Tab. 3.13: Retentionszeiten der gemessenen Zucker und Polyole.

Substanz	HPLC-Anlage 1		HPLC-Anlage 2
	Retentionszeit [min] 85 °C	Retentionszeit [min] 50 °C	Retentionszeit [min] 45 °C
Trehalose	8,8	14,7	9,2
Glucose	10,6	17,2	10,7
Fructose	13,0	24,2	11,9
Erythritol	15,3	27,4	13,8
Glycerol	16,0	28,8	15,8
Mannitol	16,6	32,5	11,8
Sorbitol	19,9	39,0	12,3

Die Bestimmung der Konzentration der zu analysierenden Substanzen erfolgte über die Berechnung der Peakfläche mit Hilfe der Auswertesoftware EZChrom Elite. Dafür wurden zunächst Standardlösungen bekannter Konzentration im Bereich von 0,01 bis 0,5 g L⁻¹ vermessen.

3.7.5 Biomassewachstum und Produktivität in submerser Kultivierung

Zur Charakterisierung des Wachstums und der Produktivität der verschiedenen hergestellten Sporenproben, wurden diese unter submersen Bedingungen in MQW-Medium (Tab. 3.5) kultiviert. Die Bestimmung der Produktivität erfolgte anhand der spezifischen Hydroxylierung der Steroid-Vorstufe Norandrostendion (Nor-AD) zu 11- α -OH-Norandrostendion (Nor-OH-AD). Dazu galt es zunächst, den industriellen Produktionsprozess in den Labor-Maßstab zu übertragen, die Analysemethoden zum spezifischen Edukt-Produkt-Nachweis zu validieren und mögliche Methoden zur Bestimmung des Wachstums unter submersen Kultivierungsbedingungen zu etablieren.

Für das *scale-down* des Produktionsprozesses wurden zunächst Vorversuche im 100 mL-Schüttelkolben durchgeführt. Nach Variation verschiedener Kultivierungsparameter (Schüttelfrequenz: 100 bis 180 min⁻¹; Start-pH des Flüssigmediums: pH 3,5, pH 5,5 und pH 7,5; Inokulumkonzentration: 10⁴ bis 10⁸ Sporen mL⁻¹) ergaben sich optimale Kultivierungsbedingungen mit hohem Biomassewachstum in MQW-Medium mit einem Start-pH-Wert von 5,5 und bei einer Schüttelfrequenz von 130 min⁻¹. Weiterhin erwies sich eine Inokulumkonzentration von 10⁶ Sporen mL⁻¹ als optimal, um Probenahmen in allen Wachstumsphasen und innerhalb des zeitlichen Versuchsrahmens zu ermöglichen.

Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Wildtypstamm von *A. ochraceus* wies keine geschlossene Edukt-Produkt-Bilanz der Biotransformation von Nor-AD auf. In Abbildung 3.4 wird die Bildung eines Nebenproduktes bestätigt, wobei es sich dabei um eine dem Produkt strukturell sehr ähnliche Verbindung, vermutlich 6- β -11- α -OH-Norandrostendion, handelt. Um die gesamte Transformationsleistung des Stammes zu berücksichtigen, wird in der vorliegenden Arbeit an Stelle der Produkt- und Nebenproduktbildung der relative Eduktumsatz dargestellt.

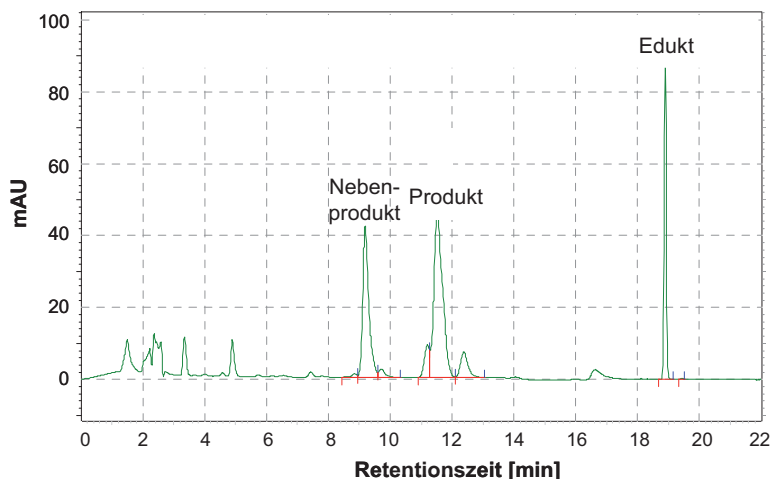


Abb. 3.4: Beispielhaftes HPLC-Chromatogramm einer Probe nach 58 h Kultivierung (MQW-Medium; 24 °C; 130 min⁻¹; Dunkelheit).

Für die Untersuchung des Wachstums und der Produktivität der verschiedenen hergestellten Sporenproben wurde eine Eduktkonzentration von 2 g L⁻¹ im Kultivierungsmedium eingestellt. Dafür wurden zunächst 1 g Nor-AD in 6 mL Dimethylformamid (DMF) gelöst und anschließend langsam unter Rühren zu 494 mL MQW-Medium hinzugegeben. Nach Inokulation des Kultivierungsmediums mit 1·10⁶ Sporen mL⁻¹ wurden je 30 mL in sterile 100 mL-Erlenmeyerkolben (mit 3 Schikanen) verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 130 min⁻¹ und 24 °C. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und für 2 min bei 13.500 min⁻¹ mittels Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen) dispergiert. Vor und nach dem Dispergieren wurde der pH-Wert der Kulturbrühe gemessen. Zur Bestimmung der Edukt- bzw. Produktkonzentration wurden je 5 mL der dispergierten Probe unter Rühren in 50 mL-Zentrifugenröhrchen mit 15 mL Methanol:Essigsäure (v/v 99:1) überführt und bis zur Weiterverarbeitung (vgl. Kapitel 3.7.5.2) bei -20 °C gelagert. Die verbleibenden 20 mL der Probe dienten der Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) (vgl. Kapitel 3.7.5.1).

3.7.5.1 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration

Zur Untersuchung des Wachstums von *A. ochraceus* während der submersen Kultivierung wurde die BTM-Konzentration gravimetrisch bestimmt. Dafür wurden zunächst Rundfilter (Filter Discs, Grade 389, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) für 24 h bei 105 °C (UT 6420, Heraeus, Hanau) getrocknet. Nach 2-stündigem Abkühlen der Filter im Exsikkator (Duran, Mainz), wurde das Leergewicht mit einer Feinwaage (CD 225 D, Sartorius, Göttingen) ermittelt.

Zur Bestimmung der BTM wurden je 10 mL der aufgeschlossenen Probe unter Rühren entnommen und über einen vorbereiteten Filter bei angelegtem Vakuum filtriert. Nach Trocknung der beladenen Filter für 2 Tage bei 105 °C und 2-stündigem Abkühlen im Exsikkator wurden die Filter ausgewogen und die BTM-Konzentration aus der Gewichts Differenz zwischen beladenen und leeren Filtern bezogen auf 1 L Kulturmedium berechnet.

Im Gegensatz zum Produkt (Nor-OH-AD) kristallisiert das Edukt (Nor-AD) bereits in geringen Konzentrationen im MQW-Medium aus, so dass vor allem die Anfangs-BTM-Werte in submerser Kultivierung über den tatsächlichen BTM-Konzentrationen liegen.

In Vorversuchen wurde daher zunächst bei verschiedenen eingestellten Eduktkonzentrationen ($0,2 - 2 \text{ g L}^{-1}$) im MQW-Medium jeweils die gelöste Eduktkonzentration, die tatsächliche Eduktgesamtkonzentration sowie die auskristallisierte Eduktmasse bestimmt. Für alle Ansätze ergab sich eine gelöste Eduktkonzentration von $0,27 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$. Die Berechnung des auskristallisierten Eduktanteils pro Probe erfolgte durch Subtraktion der gelösten Eduktkonzentration von der tatsächlichen Eduktgesamtkonzentration. Anschließend wurde dieser Wert von der jeweils ermittelten BTM-Konzentration abgezogen und damit die tatsächliche BTM-Konzentration berechnet.

3.7.5.2 Bestimmung der Edukt- und Produktkonzentration

Die Nor-AD- und Nor-OH-AD-Konzentration wurde chromatographisch bestimmt. Hierzu wurden die bei -20 °C gelagerten Proben kurz vor der Messung aufgearbeitet. Nach 15-minütiger Behandlung im Ultraschallbad wurden je 2 mL Probe entnommen und 5 min bei 13.000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 500 μL mit 1350 μL Methanol:Essigsäure (v/v 99:1) verdünnt und erneut für 1 min bei 13.000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Abschließend wurden je Probe 500 μL des Überstandes in Vials überführt, diese mit geschlossenen Septen versehen und die Edukt- bzw. Produktkonzentration mittels HPLC-System (ELITE LaChromTM, Merck-Hitachi, Darmstadt) unmittelbar bestimmt.

Die Nor-AD- und Nor-OH-AD-Konzentration der Proben wurde durch die gleichzeitige Vermessung einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen im Bereich von $0,1 - 0,5 \text{ g L}^{-1}$ ermittelt. Zur Herstellung der Standardlösung wurden die verschiedenen Konzentrationen in einem Methanol:Essigsäure:Wasser (v/v/v 89:1:10)-Gemisch gelöst. Die technischen Daten der HPLC-Anlage sowie die Betriebsparameter sind in Tabelle 3.14 aufgelistet. In Tabelle 3.15 ist der für die Quantifizierung von Edukt und Produkt angewandte Gradient der Laufmittel aufgeführt.

Tab. 3.14: Technische Daten und Betriebsparameter der Edukt- und Produkt-HPLC.

Technische Daten	
Vorsäule:	Hypersil ODS (50 mm x 4,6 mm) ³
Trennsäule:	Hypersil ODS (250 mm x 4,6 mm) ³
Pumpe:	L-2130, Hochdruckgradientensystem; LaChrom ELITE
Detektor:	Diodenarray- Detektor L-2455; LaChrom ELITE
Säulenofen:	L-2350; LaChrom ELITE
Autosampler:	L-2200; LaChrom ELITE
Betriebsparameter	
Temperatur:	40 °C
Laufmittel:	steriles deionisiertes Wasser (75 %), Acetonitril (25 %)
Flussrate:	1,5 mL min ⁻¹
Injektionsvolumen:	5 µL

³ Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA

Tab. 3.15: Zeitlicher Gradientenverlauf der verwendeten Laufmittel für die Auftrennung von Edukt und Produkt.

Zeit [min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0	75	25
10	75	25
16	40	60
20	40	60
21	75	25

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Optimierung der Sporenernte

In Produktionsprozessen mit filamentösen Pilzen besteht die Möglichkeit, über die Sporenkonzentration im Inokulum die morphologische Entwicklung der Kultur zu myzel- oder pelletförmigen Wachstum unter submersen Bedingungen zu beeinflussen. Die unterschiedlichen Morphologieformen haben wiederum verschiedene Produktivitäten zur Folge, da diese sowohl die Synthese als auch die Sekretion des Produktes beeinflussen. [El-Enshasy et al., 2006; Haack et al., 2006; Hille et al., 2005; Kiep, 2010; Krull et al., 2010; Papagianni, 2004]. Dementsprechend ist es wichtig, die Kultivierung mit konstanten Sporenkonzentrationen im Inokulum zu starten, um die Reproduzierbarkeit von Produktionsprozessen aufrechtzuerhalten.

Um stetig ausreichend hohe Sporenkonzentrationen vor allem für große Kultivierungsmaßstäbe im industriellen Bereich mit Kultivierungsvolumina von mehreren hundert Kubikmetern, zu erhalten, stand in diesem Versuchsteil die Verbesserung der Erntemethode im Vordergrund. Weiterhin galt es, die Praktikabilität der verschiedenen Erntemethoden bezüglich der Übertragbarkeit in die industrielle Anwendung zu optimieren. Ziel war es schließlich, eine standardisierte Sporenerntemethode mit gleichbleibender oder erhöhter Sporenkonzentration zu entwickeln. Dazu wurden verschiedene Erntemethoden, wie bereits in Kapitel 3.5 beschrieben, hinsichtlich der erzielbaren Sporenausbeute untersucht (vgl. Abbildung 4.1 und 4.2).

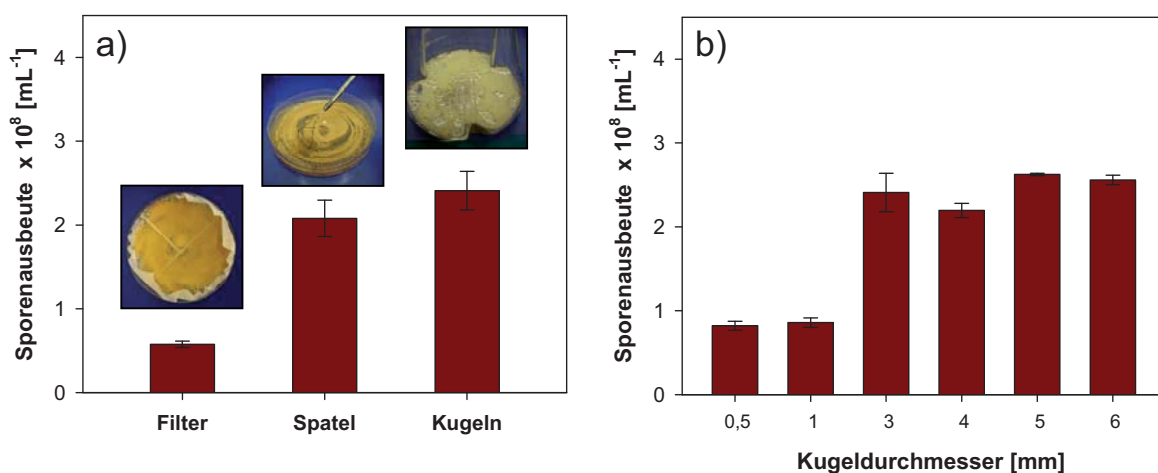


Abb. 4.1: (a) Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Erntemethode mit Filter, Spatel oder Glas- kugeln im Kolben ($\text{Ø} = 3 \text{ mm}$, 10 g, 20 min). (b) Sporenausbeute bei der Ernte im Kolben in Abhängigkeit vom Kugeldurchmesser ($\text{Ø} = 0,5 - 6 \text{ mm}$, 10 g, 20 min).

Abbildung 4.1-a) zeigt deutlich, dass die Sporenanzucht mit Hilfe eines auf der Agaroberfläche präparierten Filtertuches und anschließendem Ernten durch Abschütteln der Sporen vom Filter in 0,9%-ige NaCl-Lösung die geringste Sporenkonzentration von $5,8 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$ erzielte. Im Gegensatz dazu wurden die höchsten Sporenausbeuten durch die Ernte mittels Spatel oder Glaskugeln im Kolben erreicht, wobei sich Letzteres in der Handhabung als praktikabler erwies und eine leicht höhere Sporenkonzentration von $2,1 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ erbrachte. Das Ernteverfahren mit Glaskugeln stellt damit eine vielversprechende Alternative zur Spatelvariante dar. In weiteren Versuchen wurde daher überprüft, inwieweit sich die Sporenkonzentration durch Einsatz verschiedener Kugeldurchmesser steigern lässt (Abbildung 4.1-b). Hier konnten mit Kugelgrößen von 3 bis 6 mm hohe Sporenmengen von durchschnittlich $2,4 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ gewonnen werden, während Kugeldurchmesser von 0,5 bis 1 mm zur Sporenernte ungeeignet scheinen.

Anschließend galt es, die optimale Glaskugelmenge zu ermitteln (Abbildung 4.2-a). Durch die Steigerung von 10 auf 15 g Glaskugeln pro 130 cm^2 Erntefläche wurden für Kugeldurchmesser von 3 bis 5 mm deutlich höhere Sporenausbeuten von etwa 40 % erzielt. Eine weitere Erhöhung der Kugelmenge auf 20 g ließ hingegen einen abnehmenden Trend bezüglich der Sporenausbeute erkennen.

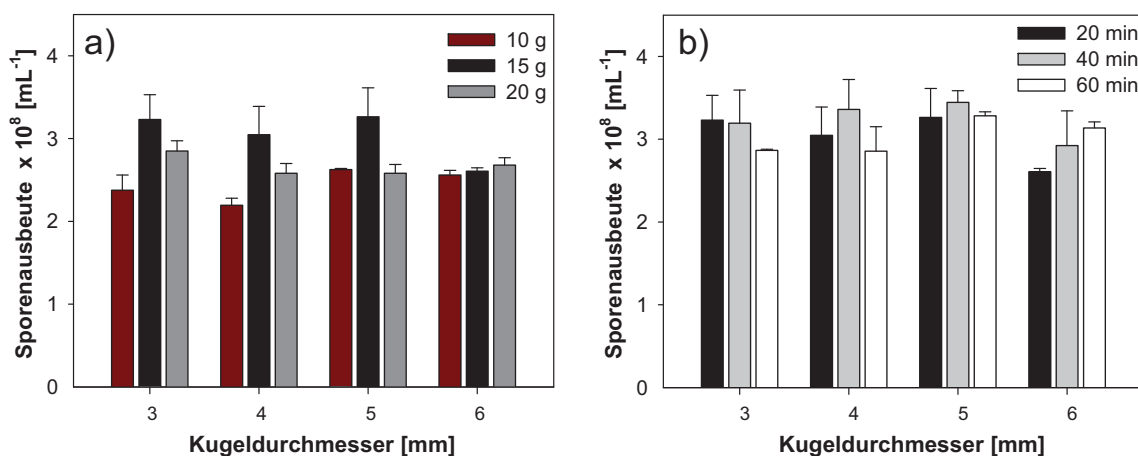


Abb. 4.2: Sporenausbeute nach Ernte mit Glaskugeln im Kolben in Abhängigkeit von (a) der Kugelmasse (10 - 20 g, $\varnothing = 3 - 6 \text{ mm}$, 20 min), (b) der Schütteldauer (20 - 60 min, $\varnothing = 3 - 6 \text{ mm}$, 15 g).

Um ein vollständiges Ablösen der Sporen von der Agaroberfläche zu ermöglichen, wurde auch der Effekt der Schütteldauer (bei gleichbleibender Schüttelfrequenz von 100 min^{-1} und -amplitude von 50 mm) untersucht (Abbildung 4.2-b). Hier ließen sich durch die Verlängerung der mechanischen Beanspruchung von 20 auf 60 min für alle eingesetzten Glaskugelgrößen keine signifikant höheren Sporenausbeuten erzielen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass durch eine längere mechanische Beanspruchung der Sporen deren Stabilität und Qualität negativ beeinflusst wird.

Insgesamt stellt das Abernten im Kolben mit 15 g Glaskugeln pro 130 cm^2 Erntefläche bei einer Schütteldauer von 20 min sowie einer Schüttelintensität von 100 min^{-1} die optimale

Erntemethode dar. Bezüglich der Kugelgröße ergaben sich für Durchmesser von 3 bis 5 mm die höchsten Sporenausbeuten, wobei zwischen den einzelnen Kugelgrößen keine gravierenden Differenzen in den erzielten Sporenkonzentrationen gemessen wurden. 5 mm-Glaskugeln erwiesen sich in der Handhabung jedoch praktikabler, so dass diese Kugelgröße letztendlich zur Sporenernte verwendet wurde.

Da die Sporenoberfläche durch die in ihrer Zellwand eingelagerten Hydrophobine nach außen einen hydrophoben Charakter aufweist [Dague et al., 2008; Stringer et al., 1995], wurde in weiteren Versuchen überprüft, inwieweit mit Tween versetzter NaCl-Lösung die Ernte durch ein verbessertes Lösungsverhalten der Sporen gesteigert werden kann.

In Abbildung 4.3-a) sind die erzielten Sporenausbeuten in Abhängigkeit vom Tweenanteil in der Ernte-Lösung dargestellt. Das Abernten der Sporen erfolgte wie bereits beschrieben durch den Einsatz von 15 g Glaskugeln mit 5 mm Durchmesser für 20 min.

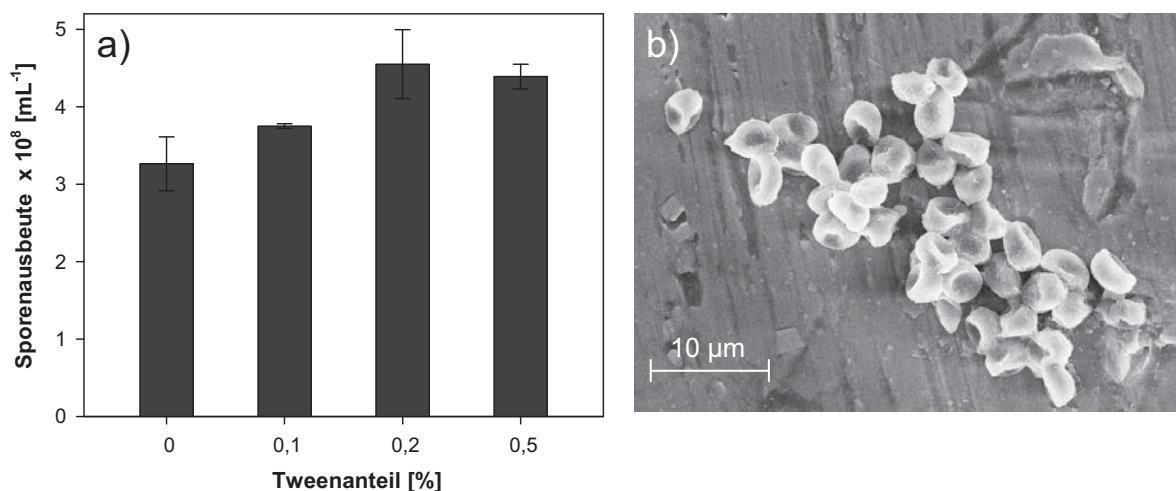


Abb. 4.3: (a) Sporenausbeute in Abhängigkeit vom Tweenanteil (v/v) in der Ernte-Lösung, (b) elektronenmikroskopische Aufnahme von *A. ochraceus*-Sporen nach Ernte mit 0,5 %-igem (v/v) Tweenanteil in der Ernte-Lösung [Stellmacher, 2009].

Die Ergebnisse zeigen, dass die Sporenausbeute durch einen 0,2 %-igen (v/v) Tweenanteil in der NaCl-Lösung von $3,3 \cdot 10^8$ auf $4,5 \cdot 10^8$ Sporen mL⁻¹ gesteigert werden konnte. In nachfolgenden mikroskopischen Untersuchungen wurde jedoch deutlich, dass die Sporen nach dem Ernten mit Tween versetzten NaCl-Lösungen vorwiegend als Aggregate vorlagen (Abbildung 4.3-b). Dadurch wurde eine genaue Konzentrationsbestimmung der geernteten Sporensuspension erschwert. Ferner können aus der vermehrten Sporenaggregation Verzögerungen im Keimungsverhalten der Sporen aufgrund von Autoregulationsprozessen resultieren, so dass in der anschließenden submersen Kultivierung unterschiedliche Morphologieausprägungen und damit variierende Produktivitäten auftreten können. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, erfolgte die Sporenernte im Rahmen dieser Arbeit daher ohne den Zusatz von Tween 80 in der Ernte-Lösung.

4.2 Methodenetablierung zur Charakterisierung von Seedingkulturen

Aufgrund der Komplexität biologischer Systeme gestaltet sich die Reproduzierbarkeit von Produktionsverfahren sowie der Kultivierung selbst bis heute als diffizil. Während diesbezüglich in zahlreichen Projekten der Einfluss verschiedener Kultivierungsparameter auf die Morphologie und Produktivität erforscht wird, sind die Auswirkungen der Sporeneigenschaften im Inokulum auf das Verhalten im Produktionsprozess bisher wenig untersucht. Da Sporen jedoch häufig als Starterkulturen (Inokula) in submersen Kultivierungen verwendet werden und damit den Ausgangspunkt des Produktionsprozesses darstellen, rückt dieser Forschungsaspekt zunehmend in den Fokus der Wissenschaft.

Aktuell ist in der Literatur nur wenig über zuverlässige Verfahren zur schnellen Detektion der Sporenviabilität bzw. -qualität beschrieben. Eine bislang vielfach angewandte Methode stellt die Bestimmung der sogenannten koloniebildenden Einheiten (Colony Forming Units, CFU) dar, deren Durchführung mit großem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist. Zudem wird über die CFU-Bestimmung nur der Anteil viabler Sporen detektiert, welcher auf Festmedium, also unter atmosphärischen Bedingungen, zur Keimung befähigt ist, so dass die ermittelten Viabilitäten von den tatsächlichen im submersen Kultivierungsprozess abweichen können.

In früheren Studien wurde auch der Einsatz farbstoffbasierter Methoden zur Bestimmung der Sporenaktivität untersucht. Nachteile dieser Viabilitätstests stellen jedoch zum einen lange Inkubationszeiten dar, zum anderen können viele der bisher genutzten Farbstoffe nur schwer die festen Zellwände der melanisierten Sporen durchdringen oder weisen hohe Hintergrundfluoreszenzen auf [Dhingra et al., 1995]. Es existieren jedoch zahlreiche Methoden zur schnellen Bestimmung der Viabilität von Bakterienzellen. Die vorliegende Arbeit stellt im Folgenden die Überprüfung der Anwendbarkeit sowie die Etablierung einiger bakterieller Aktivitätstests für Sporen des filamentösen Pilzes *A. ochraceus* dar.

4.2.1 Bestimmung membranintakter Sporen mittels Lebend/Tot-Viabilitätstest

In der Fachliteratur werden eine Reihe farbstoffbasierter Verfahren zur Bestimmung lebender und toter bakterieller Zellen beschrieben. Die meisten Viabilitätstests stützen sich dabei auf die erhöhte Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen, bei der Farbstoffe, für die die Zellmembran normalerweise nicht durchlässig ist, im Zuge dessen in die Zellen eindringen.

Diese Art der Viabilitätsbestimmung wird unter anderem durch den Einsatz des LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) realisiert. Bisher wurde diese Methode vorwiegend zur Detektion lebender und toter bakterieller Zellen eingesetzt [Baena-Ruano et al., 2006; Quéric et al., 2004; Welkos et al., 2004]. In phytopathologischen

Studien mit *Colletotrichum gloeosporioides*, *Leptosphaeria maculans* und *Alternaria brassicae* konnte erstmalig auch eine Anwendbarkeit zur Unterscheidung lebender und toter Sporen nachgewiesen werden [Chen et al., 2002].

Das LIVE/DEAD® Viability Kit setzt sich aus zwei DNA-interkalierenden Farbstoffen, SYTO 9 Green und Propidiumiodid (PI), zusammen, die sich in ihren spektralen Eigenschaften und ihrer Fähigkeit membranintakte Zellen zu durchdringen, unterscheiden. Während SYTO 9 Green sowohl die Membran toter als auch lebender Zellen durchdringt, kann PI nur die perforierte Zellmembran von toten Zellen penetrieren. Durch Kombination beider Farbstoffe fluoreszieren lebende Zellen grün, tote hingegen rot. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt häufig mittels Durchflusszytometrie oder konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) [Invitrogen, 2004]. Die Anwendbarkeit beider Analysemethoden wurde im Rahmen der Arbeit überprüft.

Um eine Übertragbarkeit des Assays auf Sporen des hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Vorversuche durchgeführt. Dabei fand unter anderem eine Variation der Farbstoffkonzentration sowie der Inkubationsdauer und -temperatur statt. Gleichzeitig wurden unterschiedliche Sporenkonzentrationen eingesetzt, um Aussagen über die für den Assay optimale Sporenkonzentration treffen zu können. Als Negativkontrollen wurden sowohl Sporen nach Behandlung mit Hitze (121 °C, 30 min) als auch UV-Licht (254 nm, 1 h) eingesetzt, um eine Abhängigkeit der Membrandurchlässigkeit von der Art der Abtötung der Sporen auszuschließen. Die Inaktivität und Keimungsunfähigkeit dieser Sporen wurde durch Ausstreichen auf MEA-Medium bestätigt.

In Abbildung 4.4 sind CLSM-Aufnahmen angefärbter *A. ochraceus*-Sporen sowie die jeweiligen Durchlichtaufnahmen zur Erfassung der Gesamtsporenzahl dargestellt.

Da in membrandefekten Sporen sowohl SYTO 9 Green als auch PI mit der DNA interagieren, ergibt sich eine Fluoreszenzüberlagerung durch beide Farbstoffe, so dass defekte Sporen gelblich/orange fluoreszieren (Abbildung 4.4-1a, 2a, 3a). Durch die Bildanalyse-Software (LSM Image Browser-Software, Zeiss, Jena) kann dieser Effekt jedoch bei der Auswertung durch Inaktivierung des Fluoreszenzkanals von SYTO 9 Green ausgeblendet werden, wodurch membrandefekte Sporen komplett rot angefärbt erscheinen (Abbildung 4.4-1b, 2b, 3b). Im Gegensatz dazu ist bei intakten Sporen nur die äußere Membran als roter Ring abgebildet, da PI die Membranen nicht passieren kann und sich lediglich an der Außenhülle anlagert (Abbildung 4.4-1b). Damit ist über die CLSM eine schnelle und eindeutige optische Erfassung membranintakter bzw. -defekter *A. ochraceus*-Sporen möglich.

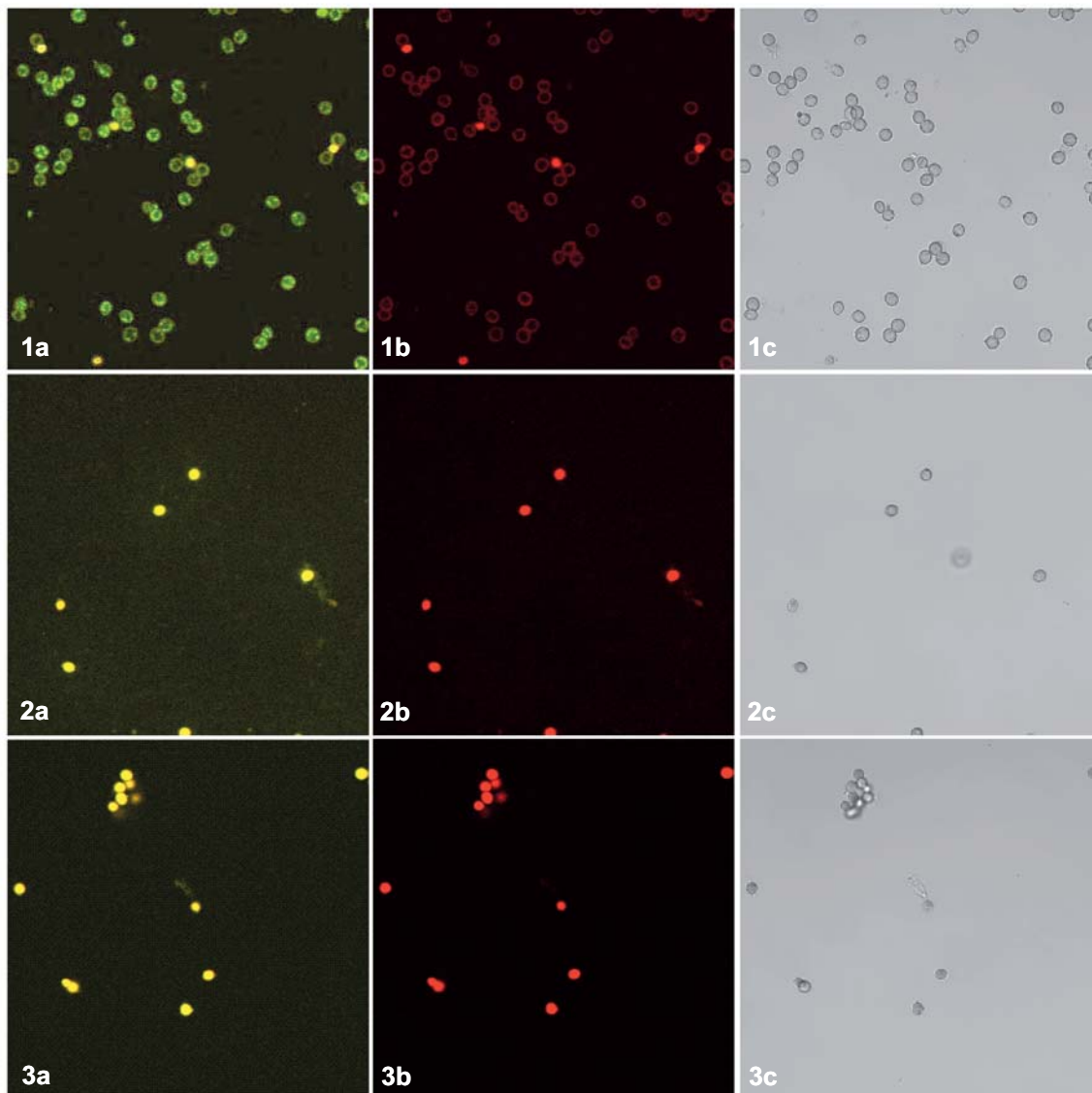


Abb. 4.4: Fluoreszenzaufnahmen von *A. ochraceus*-Sporen nach Anfärben mit SYTO 9 Green und PI, (1) beispielhafte Sporensuspension von *A. ochraceus*, (2) hitzegetötete *A. ochraceus*-Sporen (121 °C, 30 min), (3) durch UV-Licht getötete *A. ochraceus*-Sporen (254 nm, 1 h), (a) aktive Fluoreszenzkanäle für SYTO 9 Green und PI (b) Ausblendung des SYTO 9 Green Fluoreszenzkanals, (c) Durchlichtaufnahme nach Ausblendung der Fluoreszenzkanäle.

Zur Validierung der Anwendbarkeit des Lebend/Tot-Assays wurde in weiteren Versuchen überprüft, ob ein linearer Zusammenhang zwischen dem theoretischen Anteil lebender Sporen und dem mittels LIVE/DEAD® Viability Kit gemessenen Anteil intakter Sporen besteht. Hierzu wurden lebende und tote Sporen zu definierten Anteilen miteinander vermischt und der jeweilige tatsächliche Anteil membranintakter Sporen zur Gesamtsporenanzahl mittels CLSM bestimmt. Die Auswertung erfolgte dabei mit Hilfe der Volocity-Bildanalyse-Software (Volocity 4.1.0.179, Perkin Elmer, Waltham MA, USA). Zudem wurde das Keimungs- und Wachstumsverhalten dieser Versuchansätze unter submersen

Bedingungen im Mikroreaktor sowie im Schüttelkolben untersucht. Die Anwenbarkeit des Mikroreaktor-Systems zur Bestimmung des Keimungspotentials wurde bereits in früheren Arbeiten bestätigt [Demming et al., 2011].

In Abbildung 4.5 sind die theoretisch erwarteten Anteile lebender Sporen nach Mischung mit (a) hitzegetöteten und (b) UV-Licht getöteten Sporen über den tatsächlich gemessenen Anteilen membranintakter Sporen aufgetragen.

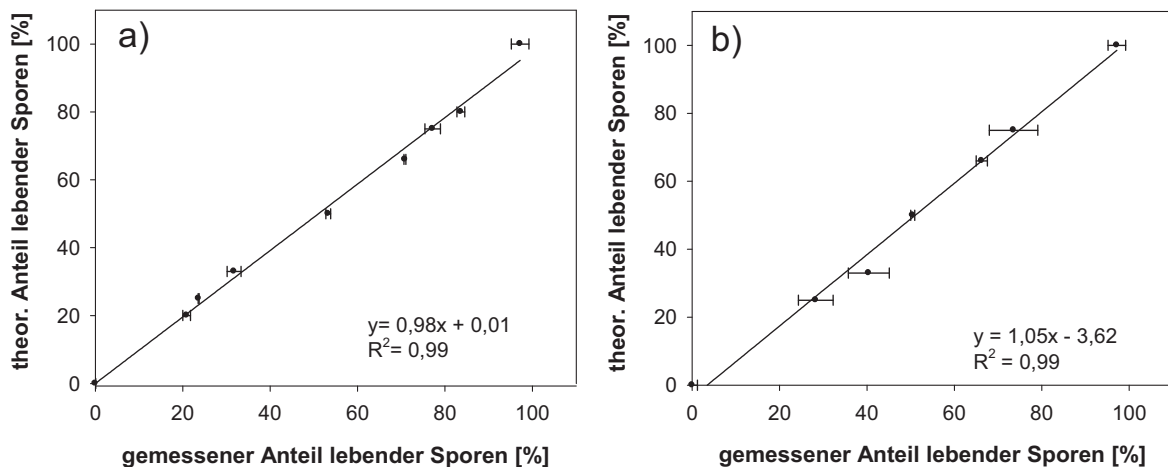


Abb. 4.5: Korrelation zwischen dem theoretisch erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Anteil lebender Sporen nach Mischung mit (a) hitzegetöteten Sporen (121 °C, 30 min) und (b) UV-Licht getöteten Sporen (254 nm, 1 h).

Die Ergebnisse lassen einen sehr guten linearen Zusammenhang zwischen dem theoretisch erwarteten und dem tatsächlich gemessenen Anteil lebender Sporen erkennen. Weiterhin korrelieren die Ergebnisse mit dem Auskeimen der Sporen und dem Biomassewachstum dieser Versuchsansätze in parallel durchgeführten submersen Kultivierungen im Mikroreaktor und Schüttelkolben. Dabei konnten mit zunehmendem Anteil lebender Sporen im Inokulum sowohl höhere maximale Anteile keimender Sporen (Abbildung 4.6-a) als auch Biotrockenmasse (BTM)-Konzentrationen (Abbildung 4.6-b) bestimmt werden.

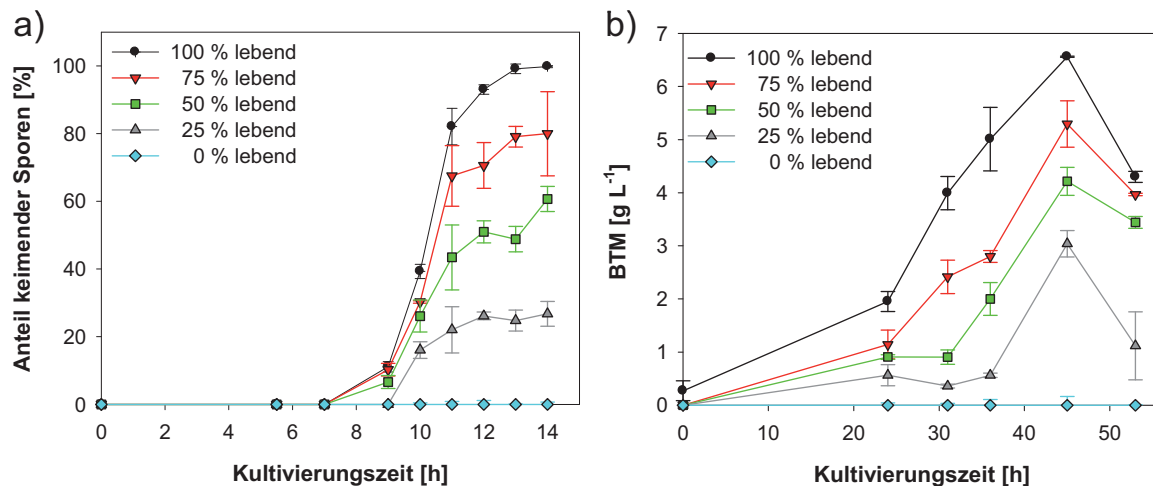


Abb. 4.6: Zeitlicher Verlauf des Anteils keimender Sporen (a) sowie der Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration (b) unter submersen Bedingungen in Abhängigkeit vom Anteil lebender Sporen im Inokulum (Herstellung toter Sporen durch Hitzebehandlung bei 121 °C für 30 min; Kultivierungsparameter: ME-Flüssigmedium, pH 5,5, 24 °C, 130 min⁻¹).

Um im späteren submersen Kultivierungsprozess reproduzierbare, hohe Biomasse- und Produktausbeuten zu erhalten, ist es demnach unerlässlich, vor der Kultivierung über den genauen Anteil intakter Sporen im Inokulum Bescheid zu wissen.

Durch die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Etablierung und Validierung des Lebend/Tot-Assays, ist es zukünftig möglich, dieses Verfahren zur Erfassung der Inokulumzusammensetzung bezüglich membranintakter und -defekter Sporen einzusetzen und damit bereits im Vorfeld der Kultivierung Erkenntnisse über die Güte der Seedingkultur zu erhalten.

4.2.2 Bestimmung der Biomasseaktivität in Submerskultur mittels FDA-Assay

Der Fluorescein-Diacetat-Assay (FDA-Assay) wird vorwiegend zur Bestimmung der mikrobiellen enzymatischen Aktivität von Umweltproben eingesetzt [Adam et al., 2001; Schnurer et al., 1982].

Das Prinzip des Tests besteht in der hydrolytischen Spaltung des farblosen Fluorescein-Diacetat (FDA) zu Fluorescein durch zelleigene Esterasen und Lipasen [Stubberfield et al., 1990]. Dabei diffundiert FDA durch seinen unpolaren, lipophilen Charakter leicht in die Zelle hinein, in der es durch Bindung an intrazelluläre Enzyme hydrolysiert wird. Das entstehende Fluorescein-Molekül ist polar, woraus schließlich eine intrazelluläre Akkumulation von Fluorescein resultiert. Die relative Fluoreszenzintensität einer Probe kann anschließend mittels Fluorometer gemessen und als direktes Maß für die Aktivität einer Probe angesehen werden.

Lipide kommen in vielen Fällen als Speicherstoffe in Sporen vor und dienen neben Kohlenhydraten vermutlich zur Energiegewinnung während der Keimung von Sporen. So wurde beispielsweise eine Veränderung der Lipidzusammensetzung und ein Anstieg der Phospholipidkonzentration in keimenden Sporen nachgewiesen. Aus diesem Grund stellt ein auf Enzymen des Fettstoffwechsels basierender Test ein vielversprechendes Mittel zur Bestimmung der Viabilität von Sporen dar [Chastain et al., 1990; Morozova et al., 2002].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der FDA-Assay erstmalig zur Bestimmung der Viabilität von Sporen von *A. ochraceus* eingesetzt. Anhand der durchgeführten Versuche konnten zwar lebende Sporen von hitzegetöteten unterschieden werden, der Assay scheint jedoch nicht sensitiv genug, um geringe Viabilitätsunterschiede zwischen verschiedenen hergestellten Sporen zu detektieren. Zudem ergab sich bisher kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Sporenaktivität und Biomassewachstum unter submersen Bedingungen.

Im Gegensatz dazu erwies sich die Anwendung des FDA-Assays zur Bestimmung der Aktivität keimender Sporen in der Anfangsphase submerser Kultivierungen als vielversprechend. In dieser frühen Wachstumsphase ist in der Regel aufgrund einer zu geringen Biomassezunahme und Produktivität über herkömmliche Analysemethoden keine Aussage über den Verlauf oder den Erfolg einer Kultivierung möglich. Ein Untersuchungsaspekt bestand daher in der Verifizierung und Optimierung des FDA-Assays zur Bestimmung der Biomasseaktivität keimender Sporen unter submersen Bedingungen, um so Erkenntnisse über den Zustand der Vorkultur zu gewinnen und den weiteren Kultivierungsverlauf abschätzen zu können.

Um verlässliche Biomasseaktivitäten und maximale Fluoreszenzintensitäten zu detektieren, wurden, basierend auf der Methode von Adam und Duncan (2001), in Vorversuchen zunächst die optimale FDA-Konzentration, Inkubationszeit und Methode zur Extraktion des Fluoresceins untersucht. Anschließend wurde sowohl die Resuspensionslösung als auch die Emissionswellenlänge variiert (vgl. Abbildung 4.7). Da die Resuspensionslösung gleichzeitig den Reaktionsraum zur enzymatischen Umsetzung des FDA darstellt, ist sowohl die Aufnahme von FDA in die Sporen als auch die Aktivität der sporeneigenen Enzyme direkt von dieser abhängig. Die Wahl einer geeigneten Resuspensionslösung ist folglich essentiell für die erfolgreiche Anwendung des FDA-Assays.

Wie in Abbildung 4.7 ersichtlich, ist für alle Versuchsansätze eine Zunahme der Aktivität (dargestellt als relative Fluoreszenz Einheit RFU) während der ersten 10 h der Kultivierung zu erkennen, was auf eine Reaktivierung verschiedenster Stoffwechselwege im Zuge der Sporenkeimung hindeutet und die Anwendbarkeit des FDA-Assays auf keimende Sporen bestätigt.

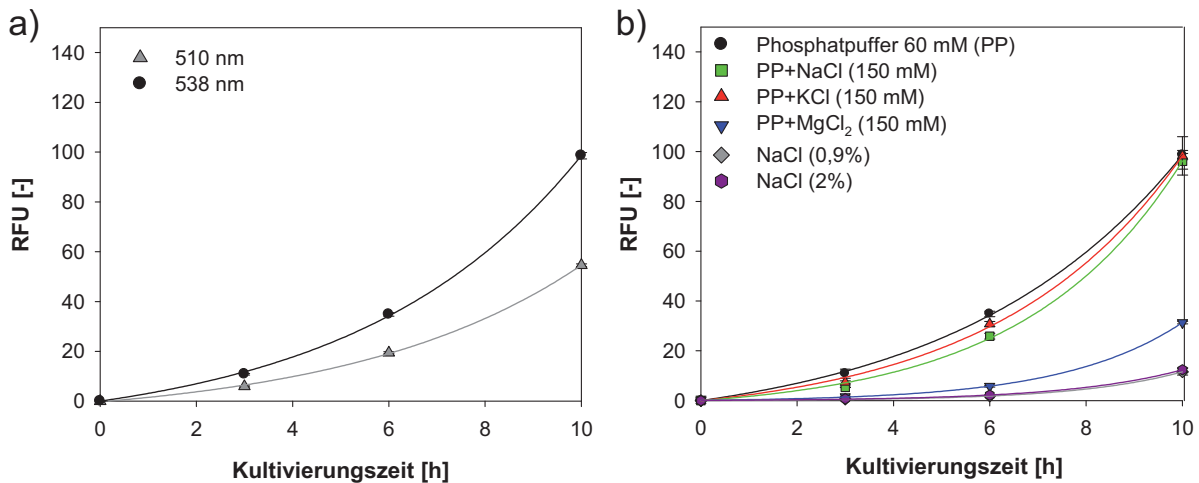


Abb. 4.7: Relative Fluoreszenz Einheit (RFU) während der ersten 10 h einer Submerskultivierung bei (a) variierender Emissionswellenlänge (510 nm bzw. 538 nm, Sporen in 60 mM Phosphatpuffer (PP)) und (b) Variation der Resuspensionslösung im FDA-Assay (Emissionswellenlänge: 538 nm).

Maximale Fluoreszenzwerte wurden bei einer Wellenlänge von 538 nm (vgl. Abbildung 4.7-a) nach Resuspension der keimenden Sporen in 60 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) (vgl. Abbildung 4.7-b) detektiert. Ergebnisse von Yang et al. (1995), die auf einen positiven Effekt durch Zusatz verschiedener Salze zur Resuspensionslösung hindeuten, konnten in diesem Zusammenhang nicht bestätigt werden, was auf die Verwendung unterschiedlicher Organismen zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen 60 mM Phosphatpuffer ohne den Zusatz von Salzen zur Resuspendierung des Zellsediments eingesetzt und die Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 538 nm bestimmt. Auf diese Weise war es möglich, auch nur geringfügig unterschiedliche Emissionswerte zu differenzieren, womit die Genauigkeit des Assays entscheidend verbessert wurde.

4.2.3 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT-Assay

Tetrazoliumsalze wie 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) werden unter verschiedenen Forschungsaspekten zur Ermittlung der Zellviabilität, der metabolischen Aktivität, als Indikator für oxidative Reaktionen sowie zur Detektion von intrazellulären Reduktasen verwendet [Benau et al., 1990; Liu et al., 1997; Marshall et al., 1995; Prochaska et al., 1988; Satoh et al., 1996; Shearman, 1996; Stellmach et al., 1987]. Ferner ermöglicht ihr Einsatz die Bestimmung lebender bakterieller Zellen, wodurch die vielfache Anwendung der Tetrazolium-Assays zur Detektion mikrobieller Kontaminationen in Nahrungsmitteln begründet ist [Beloti et al., 1999; Rodriguez et al., 1992].

Das Prinzip des MTT-Assays beruht auf der intrazellulären Umsetzung des farblosen MTT zu blau-violetten MTT-Formazan durch Dehydrogenasen wie Succinat- oder NAD(P)H-Dehydrogenasen, welche wichtige Enzyme der Atmungskette darstellen [Smith et al., 1997]. MTT wird dabei durch seine positive Ladung in die Zellen aufgenommen. Das gebildete Formazan akkumuliert in Form von Kristallen in den aktiven Zellen und kann schließlich durch Extraktion und darauffolgende photometrische Vermessung bei einer Wellenlänge von 560 nm detektiert werden. Die gemessene Absorption der gebildeten Formazanmenge ist dabei als direktes Maß für die respiratorische Aktivität anzusehen.

Die Anwendbarkeit des MTT-Assays auf Pilzsporen wurde bereits für verschiedene Spezies untersucht. Stentelaire et al. (2001) gelang es, ein Verfahren für *Penicillium digitatum* zu etablieren, das die Sporenvitalität über die Bestimmung der respiratorischen Aktivität erfasst. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Ergebnisse des MTT-Assays gut mit der Methode der sogenannten koloniebildenden Einheiten (CFU) korrelieren. Darüber hinaus wurde die Übertragbarkeit dieser Methode auf andere Spezies wie *A. niger* und *Metarhizium flavoviride* untersucht und ebenfalls anhand der CFU-Bestimmung validiert, wobei die Enzymaktivitäten sich als stark speziesabhängig erwiesen [Stentelaire et al., 2001]. Damit stellt sich die Frage, wie aussagekräftig die erhaltenen Ergebnisse sind, da die zur Validierung und Verifizierung genutzte CFU-Bestimmung selbst einige Fehlerquellen aufweist und eine exakte Bestimmung der Viabilität erschwert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher die Anwendbarkeit des MTT-Assays auf Sporen des hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* überprüft werden.

Zur Etablierung des Assays waren verschiedene Optimierungs- und Validierungsschritte erforderlich. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden die Sporen zunächst in verschiedenen Reaktionslösungen auf ihre Fähigkeit zur Umsetzung von farblosem MTT zu blau-violetter MTT-Formazan getestet. Gleichzeitig erfolgte eine Variation der eingesetzten Sporenkonzentration, um Aussagen über die für den Assay minimal benötigte bzw. optimale Sporenkonzentration treffen zu können. Als Negativkontrolle dienten hitzegetötete Sporen (121 °C, 30 min), welche keine respiratorische Aktivität mehr aufwiesen. Die Inaktivität und

Keimungsunfähigkeit dieser Sporen wurde auf MEA-Medium sowie unter submersen Kultivierungsbedingungen (vgl. Abbildung 4.6) bestätigt.

In Abbildung 4.8 ist die mittels MTT-Assay bestimmte Absorption von lebenden und abgetöteten Sporen in Phosphatpuffer bei unterschiedlichen Sporenkonzentrationen dargestellt.

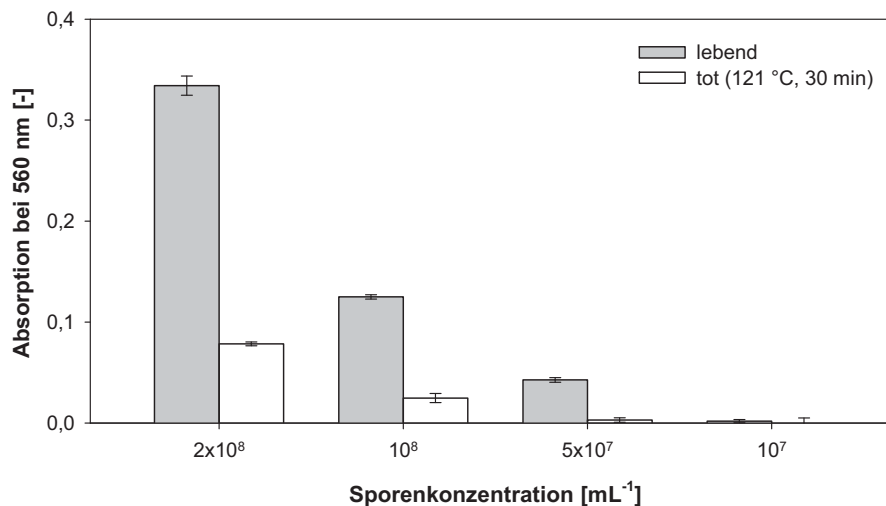


Abb. 4.8: Respiratorische Aktivität von lebenden und hitzegetöteten Sporen (121 °C, 30 min) in Phosphatpuffer (60 mM) bei unterschiedlichen Sporenkonzentrationen.

Die Ergebnisse lassen abnehmende Aktivitätswerte mit Verringerung der eingesetzten Sporenkonzentration erkennen, womit deutlich wurde, dass tatsächlich die Aktivität der Sporen im MTT-Assay erfasst wird. Zudem konnte bei der Verwendung von 60 mM Phosphatpuffer als Reaktionslösung eindeutig zwischen lebenden und hitzegetöteten Sporen differenziert werden. Die niedrigen Absorptionswerte der toten Sporen könnten zum einen durch eine geringe unspezifische Umsetzung von MTT zu MTT-Formazan erklärt werden. Andererseits ist bei Absorptionswerten unter 0,05 eine Messung von Artefakten möglich, da die Werte im nicht-linearen Messbereich des Photometers liegen.

Die Ergebnisse lassen weitere Aussagen über die optimal einzusetzende Sporenkonzentration zu. Die untere Detektionsgrenze liegt bei einer Sporenkonzentration von $5 \cdot 10^7 \text{ mL}^{-1}$, da hier eine Aktivität der Sporen gerade noch messbar ist. Die Absorptionswerte bei einer Sporenkonzentration von 10^8 mL^{-1} liegen deutlicher im linearen Messbereich des Photometers. Möglich ist auch die Verwendung von $2 \cdot 10^8 \text{ Sporen mL}^{-1}$. Bei einer Sporenanzucht unter suboptimalen Sporulationsbedingungen können jedoch nicht immer diese hohen Konzentrationen erreicht werden, so dass in den folgenden Versuchen eine einheitliche Sporenkonzentration von $1 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt wurde.

Zur Validierung des MTT-Assays wurde in weiteren Versuchen überprüft, inwieweit ein linearer Zusammenhang zwischen dem Anteil lebender Sporen und der ermittelten respiratorischen Aktivität besteht. Hierzu wurden lebende und tote Sporen zu definierten

Anteilen miteinander vermischt und auf ihre Aktivität hin getestet. Um eine eventuell vorhandene Abhängigkeit der respiratorischen Aktivität von der Art der Abtötung der Sporen auszuschließen, wurden, wie bereits zur Etablierung des Lebend/Tot-Viabilitätstest, Sporen nach Behandlung mit Hitze und UV-Licht analysiert.

In Abbildung 4.9 sind die theoretisch erwarteten Anteile lebender Sporen nach Mischung mit (a) hitzegetöteten und (b) UV-Licht getöteten Sporen über der jeweils gemessenen Absorption nach Umsetzung des MTT zu MTT-Formazan aufgetragen.

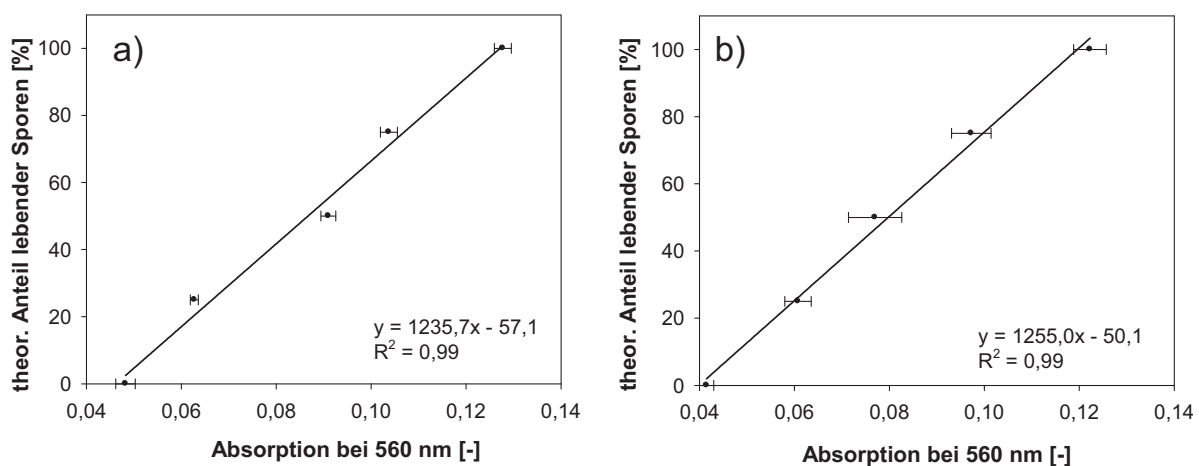


Abb. 4.9: Absorption bei 560 nm in Abhängigkeit vom Anteil lebender Sporen nach Mischung mit (a) hitzegetöteten Sporen (121 °C, 30 min) und (b) UV-Licht getöteten Sporen (254 nm, 1 h).

Für beide Versuchsansätze ist mit Zunahme des Anteils lebender Sporen eine lineare Steigerung der Absorption bei 560 nm zu erkennen. Es ergibt sich eine Korrelation mit einem hohen Bestimmtheitsmaß (0,99) zwischen der mittels MTT-Assay bestimmten Aktivität und dem theoretisch erwarteten vitalen Sporenanteil. Eine Beeinflussung des Assays durch die Art der Abtötung der Sporen auf die verbleibende Restaktivität kann ausgeschlossen werden, da die sehr geringen Absorptionswerte dieser vollständig abgetöteten Sporen für beide Arten der Abtötung in der gleichen Größenordnung liegen.

Demzufolge ist es mittels MTT-Assay möglich, durch Ermittlung der respiratorischen Aktivität einer Sporensuspension Rückschlüsse auf deren Anteil lebender, aktiver Sporen zu ziehen und damit Erkenntnisse über die Güte der Seedingkultur zu erhalten. Aus dem Zusammenhang zwischen respiratorischer Aktivität und dem Anteil vitaler Sporen ergeben sich zahlreiche neue Anwendungsmöglichkeiten. Ein Beispiel wäre der Einsatz des MTT-Assays zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Bedingungen der Sporenanzucht auf die Sporengüte. Durch eine Veränderung der respiratorischen Aktivität können somit ungünstige Faktoren, die eine verringerte Sporenqualität zur Folge haben, aufgedeckt werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde auch der Einsatz eines weiteren Tetrazoliums Salzes, 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (CTC), untersucht. Im Gegensatz zu MTT adsorbiert dieses an der Zelloberfläche und wird direkt an der äußeren Membran bei respiratorischer Aktivität zu rot-fluoreszierendem CTC-Formazan reduziert, wodurch Zellaufschluss und Extraktion des Formazans nicht notwendig sind. Eine Anwendbarkeit von CTC zur Bestimmung der Viabilität von *Aspergillus*-Sporen konnte bisher jedoch weder in der Literatur noch in den hier durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Dies ist damit zu begründen, dass Sporen filamentöser Pilze eine ruhende Überdauerungsform darstellen und in diesem Entwicklungsstadium an der äußeren Membran der Sporen keine detektierbaren, respiratorisch aktiven Reaktionen ablaufen. Vielmehr ist durch das Vorliegen von Mitochondrien in eukaryotischen Zellen eine intrazelluläre respiratorische Aktivität zu erwarten, welche, wie bereits gezeigt, durch das Tetrazoliumsalz MTT nachgewiesen werden konnte.

Im Folgenden wurden die hier vorgestellten Methoden zur Untersuchung des Einflusses verschiedenster environomischer Parameter auf die Sporengüte eingesetzt. Die Ergebnisse der Charakterisierungsverfahren wurden nach deren Anwendung auf unterschiedlich hergestellte Sporenpopulationen untereinander verglichen sowie in Korrelation zum Wachstum und zur Produktivität des verwendeten Pilzes unter submersen Bedingungen gesetzt und damit einem *proof-of-concept* unterzogen.

4.3 Sporenbildung und Sporeneigenschaften als Funktion environomischer Parameter

Bisher lag der wissenschaftliche Fokus bei der Optimierung von Produktionsprozessen mit filamentösen Pilzen in der Untersuchung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Morphologie und die Produktbildung [Grimm et al., 2005a; Kelly et al., 2006; Kiep, 2010; Krull et al., 2010]. Obwohl für diese Kultivierungsprozesse häufig Sporen als Starterkulturen Verwendung finden, wurde der Einfluss der Sporeneigenschaften in Seedingkulturen auf das Wachstums- und Produktionsverhalten in der anschließenden Kultivierung bislang nicht berücksichtigt. Verschiedene Publikationen weisen jedoch darauf hin, dass eine erhebliche Anzahl physiologischer Parameter sowohl die Sporulation als auch die Eigenschaften der unter diesen Bedingungen gebildeten Sporen hinsichtlich Stabilität, Keimungsfähigkeit oder Widerstandsfähigkeit beeinflussen [Engelkes et al., 1997; Cliquet et al., 2005]. Aufgrund speziesabhängiger Unterschiede und konträrer Ergebnisse in der Literatur erscheint es allerdings schwierig, generalisierte Aussagen über optimale Sporulationsparameter für *Aspergilli* zu treffen.

Da vor allem für industrielle Kultivierungsmaßstäbe stetig hohe Sporenmengen benötigt werden und gleichzeitig homogene Seedingkulturen mit Sporen hoher Güte für reproduzierbare Produktausbeuten unerlässlich sind, galt es im Rahmen der Arbeit störende Einflussfaktoren aufzudecken und schließlich optimale Parameter zur Sporenbildung von *A. ochraceus* zu finden. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Sporulationsbedingungen untersucht, welche in Abbildung 4.10 zusammenfassend dargestellt sind.

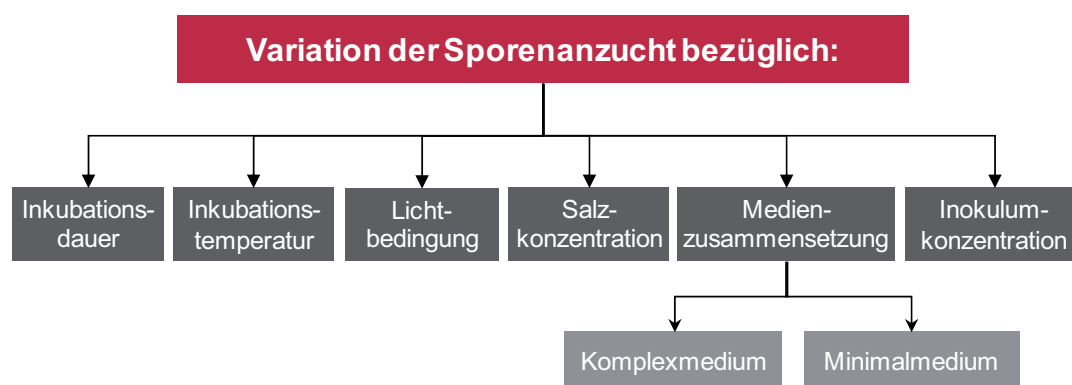


Abb. 4.10: Schema der Versuche zur Sporenanzucht unter variierten Sporulationsbedingungen.

Zunächst wird der Effekt der verschiedenen Sporulationsbedingungen auf die Sporenbildung diskutiert. Anschließend werden die mit Hilfe der etablierten Charakterisierungsmethoden (vgl. Kapitel 4.2) identifizierten Eigenschaften verschiedener Sporenpopulationen vorgestellt. Für eine ganzheitliche Beurteilung der Sporeneigenschaften wird schlussendlich erörtert, inwieweit eine Korrelation zum Wachstum und der Biotransformationsleistung im submersen Kultivierungsprozess besteht.

4.3.1 Sporenbildung

Die asexuelle Sporenbildung filamentöser Pilze wird allgemein durch limitierende Nährstoffbedingungen oder spezielle Umweltfaktoren, wie z. B. Licht, Hitze und Trockenheit, induziert [Adams et al., 1998; Broderick et al., 1981]. Die Auswirkungen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Sporulationsparameter (Abbildung 4.10) auf die Sporenbildung des hier untersuchten filamentösen Pilzes *A. ochraceus* wird im Folgenden diskutiert. Dabei wird als Qualitätsindikator die Sporenausbeute herangezogen.

4.3.1.1 Einfluss der Inkubationsdauer

Durch die Variation der Inkubationsdauer sollte zunächst ermittelt werden, zu welchem Zeitpunkt die maximale Sporenkonzentration erreicht werden kann. In Abbildung 4.11 sind die erzielten Sporenausbeuten der verschiedenen Versuchsansätze dargestellt.

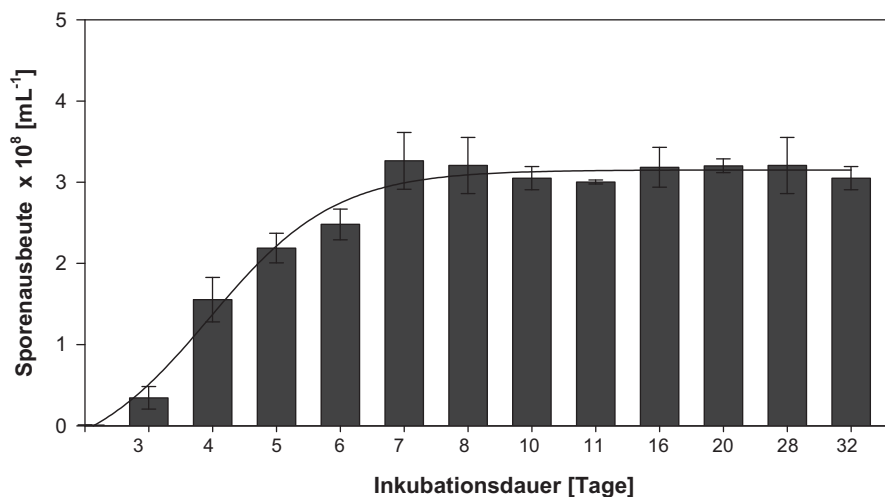


Abb. 4.11: Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 24 °C in Dunkelheit.

Während in Studien mit *A. nidulans* bereits nach einer Inkubationsdauer von 18 h eine Sporenbildung nachgewiesen werden konnte [Adams et al., 1998], wurde für den hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* in diesem Zeitraum lediglich der Beginn des Hyphenwachstums festgestellt.

Ab dem vierten Inkubationstag war auf der Agaroberfläche eine gelbliche Färbung zu erkennen, die aus der Bildung erster Sporen resultierte. Mit zunehmender Inkubationsdauer konnte eine verstärkte Sporenbildung detektiert werden, wobei nach acht Tagen Inkubation die höchsten Sporenausbeuten von ca. $3,3 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ bestimmt wurden. Eine weitere Steigerung der Sporenkonzentration konnte auch nach Verlängerung der Inkubationsdauer auf 32 Tage nicht nachgewiesen werden. Die Stagnation der Sporenbildung lässt sich zum einen durch eine vorliegende Nährstofflimitation im Agarmedium ab einem bestimmten Zeitpunkt erklären. Zum anderen können über das Myzel sekretierte Signalpeptide beim

Erreichen einer bestimmten Sporenkonzentration eine Zellantwort bewirken, die in einer Hemmung der weiteren Sporenbildung resultierte. In diesem Zusammenhang konnten bereits in verschiedenen filamentösen Pilzen spezielle Effektorsubstanzen identifiziert werden, die erst ab einer bestimmten Zelldichte in das Medium freigesetzt werden und so unter anderem die Konidiophorenbildung beeinflussen [Hogan, 2006]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für maximale Sporenausbeuten eine achttägige Inkubation auf MEA-Medium einen ausreichend langen Zeitraum für die Sporenanzucht darstellt.

4.3.1.2 Einfluss der Temperatur

Nachdem ermittelt wurde, welche Inkubationsdauer für die Bildung maximaler Sporenkonzentrationen notwendig ist, wurde der Einfluss der Inkubationstemperatur auf den Sporulationsprozess untersucht. Dabei wurden Temperaturen zwischen 14 und 40 °C gewählt. In Abbildung 4.12 sind die gebildeten Sporenmengen in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur aufgetragen.

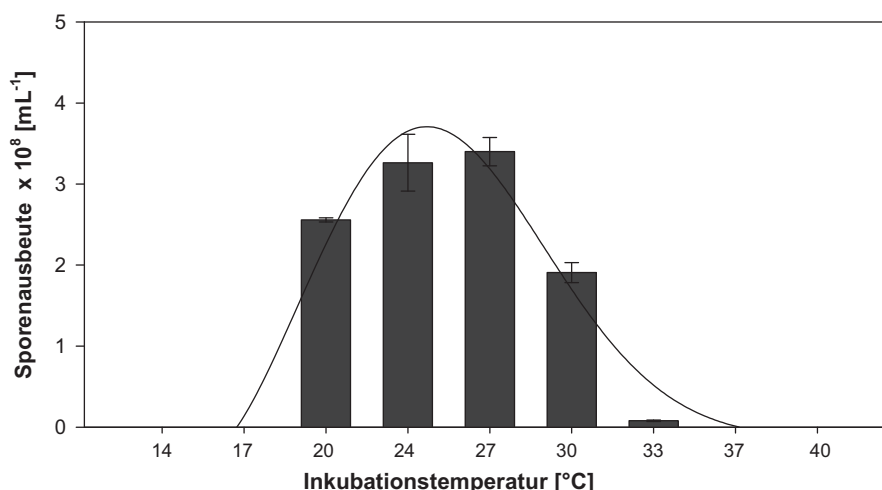


Abb. 4.12: Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Temperatur nach 8 Tagen in Dunkelheit [Stellmacher, 2009].

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die Sporenbildung bei *A. ochraceus* in einem Temperaturbereich von 20 bis 30 °C möglich ist. Zwischen 14 und 17 °C konnte auf dem Agarmedium weder ein Myzelrasen noch die Bildung gelblich gefärbter Sporen festgestellt werden. Mit steigender Inkubationstemperatur wurde eine Zunahme des vegetativen Wachstums und der Sporenproduktion detektiert, wobei maximale Sporenausbeuten von 3,3 bzw. 3,6 · 10⁸ Sporen mL⁻¹ zwischen 24 und 27 °C erzielt wurden. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 30 bzw. 33 °C resultierte in einem verlangsamten Sporulationsprozess, während in den Versuchsansätzen über 37 °C keine Sporenbildung mehr detektiert wurde. Die Sporenproduktion als Funktion der Inkubationstemperatur folgt damit dem Verlauf einer

Optimumskurve, was auf das Wachstumsoptimum des Pilzes zurückzuführen ist. Wie bereits für andere biotechnologisch relevante *Aspergillus*-Spezies gezeigt, ergaben sich auch für *A. ochraceus* und die für das Wachstum sowie die Sporulation notwendigen Enzyme Temperaturoptima, die letztendlich die Sporenausbeute beeinflussen. Nach den im Rahmen dieser Versuchsreihe durchgeführten Analysen, konnte damit eine optimale Inkubationstemperatur zwischen 24 bis 27 °C ermittelt werden.

4.3.1.3 Einfluss der Lichtbedingung

Ascomyceten sind grundsätzlich in der Lage, unterschiedliche Lichtqualitäten wahrzunehmen, was auf das Vorliegen verschiedener Photorezeptoren zurückzuführen ist [Corrochano, 2007; Hill, 1976; Mooney et al., 1990]. Das Repertoire dieser Photorezeptoren und der daraus resultierende Photoeffekt scheinen jedoch zwischen den verschiedenen Gattungen der Ascomyceten stark zu variieren. So konnte für *A. nidulans* nachgewiesen werden, dass insbesondere durch die Bestrahlung mit Infrarotlicht (780 nm) eine verstärkte Sporenproduktion möglich ist, während in *Alternaria tomato* UV-Licht (380 nm) zu einer verstärkten Sporenproduktion führte [Corrochano, 2007; Mooney et al., 1990]. Zur Ermittlung möglicher Auswirkungen auf den Sporulationsprozess von *A. ochraceus* wurde die Sporenproduktion nach achttägiger Inkubation unter Rotlicht (780 nm, 24 h pro Tag), künstlichem Licht (570 bis 690 nm, 24 h pro Tag), in Dunkelheit und bei tagesrhythmischen Lichteinfluss (570 bis 690 nm, 9 h Licht pro Tag) untersucht.

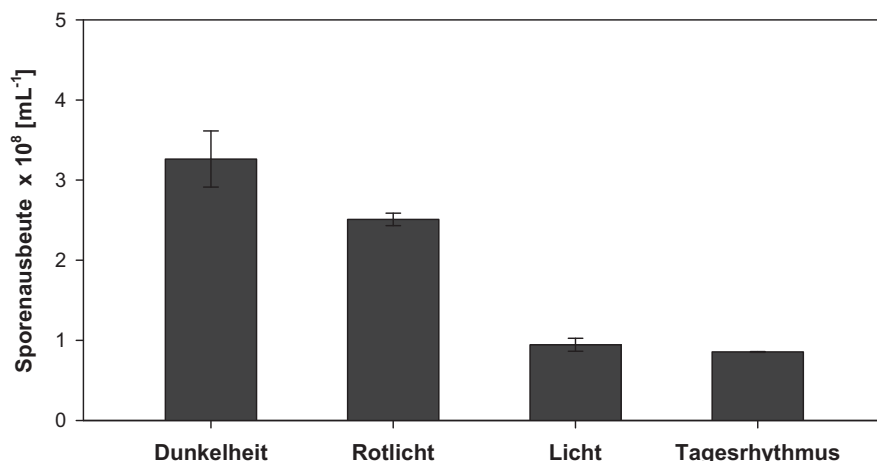


Abb. 4.13: Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Lichtbedingung während der Sporulation (Inkubation: 8 Tage, 24 °C).

Abbildung 4.13 zeigt deutlich, dass in Dunkelheit und unter Rotlicht die höchsten Sporenkonzentrationen von 3,3 bzw. 2,6·10⁸ mL⁻¹ gebildet wurden. Bei der tagesrhythmischen Beleuchtung und bei der konstanten Bestrahlung mit Licht konnten keine vergleichbar hohen Sporenkonzentrationen ermittelt werden. Hier scheinen regulatorische Vorgänge die

Sporulation zu verzögern oder gar einzuschränken. Auch bei *A. oryzae* konnte unter kontinuierlicher Bestrahlung mit weißem Licht eine Reprimierung der Sporenproduktion nachgewiesen werden [Hatakeyama et al., 2007]. In diesem Zusammenhang wurden für einige Pilze bereits unterschiedliche Photorezeptoren identifiziert, die regulatorische Funktionen übernehmen [Corrochano, 2007]. Dabei können wie bei *A. nidulans* die Sporulation oder wie bei *Neurospora crassa* physiologische und morphologische Entwicklungsstadien gesteuert werden [Mooney et al., 1990]. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Sporenproduktion in Dunkelheit hinsichtlich der erzielbaren Sporenkonzentration die Methode der Wahl ist, da sie hohe Sporenausbeuten ohne zusätzlichen technischen Aufwand ermöglicht.

4.3.1.4 Effekt erhöhter Salinität

Der Einfluss des Salzgehalts und der damit verbundenen Osmolalität auf das Wachstum und die Reproduktion wurde bereits anhand einiger *Aspergillus*-Spezies untersucht [Beever et al., 1986; Han et al., 2003; Kelavkar et al., 1993; Mert et al., 1977, 1987; Ramos et al., 1999; Redkar et al., 1995; Ruijter et al., 2004; Witteveen et al., 1995]. Die Ergebnisse variieren jedoch von Spezies zu Spezies. Für *A. nidulans* konnte beispielsweise in Versuchen mit verschiedenen Chloridsalzen (KCl, NaCl, MgCl₂) nachgewiesen werden, dass eine 0,5 bis 1 M Salzkonzentration im Agarmedium die Sporenbildung steigert. Bei höheren Salzkonzentrationen von über 2 M verschlechtern sich hingegen das vegetative Wachstum und die Sporenproduktion [Beever et al., 1986]. In Studien mit *A. niger* wurde eine maximale Sporenbildung durch sehr viel geringere NaCl-Zusätze von 0,16 M zum Medium erzielt, während für *A. flavus* ausschließlich eine Inhibierung der Sporulation durch eine erhöhte Salinität beobachtet werden konnte [Mert et al., 1977, 1987].

Um den Effekt des Salzgehaltes des Agarmediums auf die Sporenbildung von *A. ochraceus* zu untersuchen, wurden dem MEA-Medium verschiedene Konzentrationen an NaCl (0,5 M bis 3 M) zugesetzt. Abbildung 4.14 zeigt fotografische Aufnahmen sowie die jeweils ermittelten Sporenausbeuten der verschiedenen Ansätze.

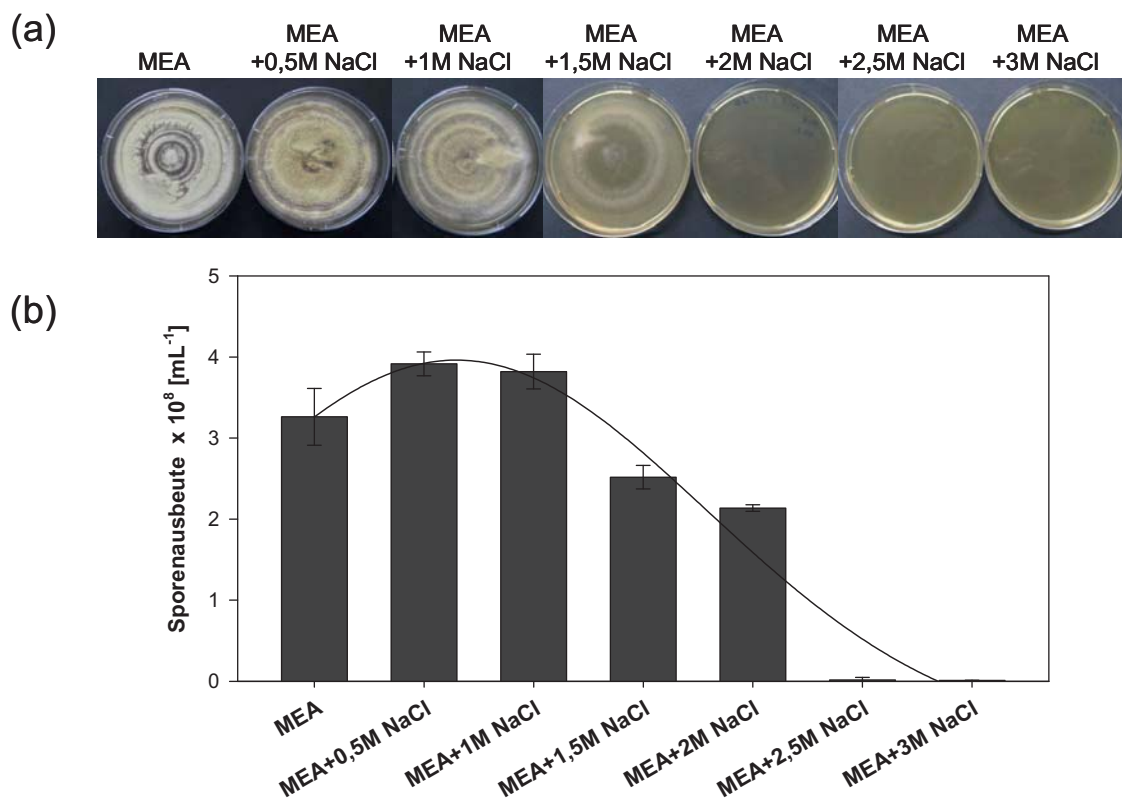


Abb. 4.14: (a) Wachstum von *A. ochraceus* nach 5 Tagen Inkubation, (b) Sporenausbeute nach 8 Tagen Inkubation in Abhängigkeit von der Salzkonzentration im MEA-Medium (Inkubation: 24 °C, Dunkelheit).

Bereits nach fünf Tagen Inkubation waren eindeutige Unterschiede zwischen dem Wachstum auf herkömmlichem MEA-Medium und dem Wachstum auf MEA-Medium mit verschiedenen Salzkonzentrationen erkennbar (Abbildung 4.14-a).

Während auf dem MEA-Standard-Medium zu diesem Zeitpunkt größtenteils weißes Myzel sichtbar war, führte der Zusatz von 0,5 bis 1 M NaCl zum Sporulationsmedium zu einer schnelleren Sporenbildung, was durch die gelb- bis bräunliche Färbung der Agaroberfläche durch die Sporen deutlich wurde. Dieser Trend ließ sich auch nach acht Tagen Inkubation beobachten, wobei schließlich durch 0,5 bis 1 M NaCl-Konzentrationen im Agarmedium die höchsten Sporenausbeuten von ca. $3,9 \cdot 10^8$ Sporen mL⁻¹ erzielt wurden (Abbildung 4.14-b). Eine weitere Erhöhung des Salzgehalts führte zu einer Abnahme der Sporenausbeute. Konzentrationen von 2,5 bis 3 M NaCl scheinen sogar stark inhibierend zu wirken, da keine Sporulation beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse bestätigen die bedeutende Rolle von Salzen für das Wachstum filamentöser Pilze. Neben dem Einfluss von Natrium- und Chloridionen auf den Ionenhaushalt und das Membranpotential, dienen insbesondere Natriumionen häufig als Kofaktoren bestimmter Enzyme [Page et al., 2006]. So besteht die Möglichkeit, dass eine erhöhte Natriumkonzentration in einer Steigerung der Aktivität verschiedener Enzyme des Pilzes

resultiert. Diese gesteigerte Aktivität könnte das verbesserte Myzelwachstum oder die stärkere Sporulation erklären. Weiterhin kann eine gesteigerte Sporenbildung durch den mit dem Zusatz von Salz verbundenen erhöhten osmotischen Stress erklärt werden, der die Sporulation anregt. Insbesondere bei einigen Prokaryoten aber auch bei filamentösen Pilzen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Sporenbildung und vorliegender Stressbedingung beobachtet werden, wobei die entstehenden Sporen eine Überdauerungsform extremer Bedingungen darstellen [Beever et al., 1986; Mert et al., 1987]. Wie bereits erwähnt, wirken insbesondere höhere Salzkonzentrationen (ab 1,5 M NaCl-Zusatz) im Agarmedium inhibierend auf das Wachstum und die Sporulation. Möglicherweise kommt es aufgrund der hohen Osmolalität des umgebenden Mediums im Vergleich zur intrazellulären Osmolalität zum Ausstrom von Wasser aus der Zelle, um den osmotischen Gradienten auszugleichen. Dies hat eine Verringerung der intrazellulären Wasseraktivität zur Folge. Da die Verfügbarkeit von Wasser jedoch essentiell für viele Stoffwechselprozesse ist, werden diese folglich verlangsamt oder kommen sogar zum Erliegen, womit sich die Inhibierung des Wachstums bei hoher Salinität erklären lässt.

Der toxische Effekt sehr hoher Osmolalitäten wird auch in verschiedenen Publikationen beschrieben und äußert sich in der Hemmung enzymatischer Reaktionen und der Beeinträchtigung der korrekten Proteinfaltung. Zudem wird vermutlich, wie für *Bacillus subtilis* gezeigt wurde, die Bildung genregulationsspezifischer Faktoren (z. B. Sigma-Faktoren) inhibiert, was zu einer mangelnden Expression von Sporulationsgenen führt [Adler et al., 1982; Dichtl et al., 1997; Hohmann, 2002; Murguia et al., 1996; Ruzal et al., 1998].

4.3.1.5 Einfluss der Medienzusammensetzung

Der Effekt der Medienzusammensetzung auf die Sporenbildung wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben [Chen et al., 2005; Engelkes et al., 1997; González et al., 2008; Han et al., 2003; Mazas et al., 2009; Ooijkaas et al., 1999]. Da die Zielstellung der verschiedenen Autoren jedoch sowohl hinsichtlich des Stammes (z. B. *Aspergilli*, *Penicillia*, *Candida*) als auch in der Optimierungsgröße (z. B. vegetatives Wachstum, Sporenbildung, Gefrier-trocknungsstabilität) variiert, können kaum allgemeingültige Aussagen über optimale Nährstoffkomponenten für eine maximale Sporulation getroffen werden, die ohne weiteres auf *A. ochraceus* übertragen werden können.

Grundsätzlich können zur Kultivierung von filamentösen Pilzen synthetische oder komplexe Nährmedien eingesetzt werden. Synthetische Medien zeichnen sich durch eine definierte und konstante Zusammensetzung an Nährstoffkomponenten aus und werden häufig im Rahmen physiologischer Untersuchungen eingesetzt. In der Industrie finden jedoch aus Kostengründen komplexe Medien biologischen Ursprungs bevorzugt Anwendung. Im Folgenden wird daher zunächst die Sporenbildung auf verschiedenen Komplexmedien vorgestellt.

Um gezielter die Nährstoffbedürfnisse von *A. ochraceus* zur Sporenbildung zu identifizieren, wurden weitere Versuche auf Minimalmedium durchgeführt, da hier die einzelnen Komponenten selektiv verändert werden konnten. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse sollten schließlich optimale Kohlenstoff- und Stickstoffquellen gefunden werden, die als Grundlage für ein Minimalmedium eingesetzt werden können.

Variation der Nährstoff-Zusammensetzung von Komplexmedien

Neben dem durch die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) empfohlenen MEA-Medium wurden in Vorversuchen zunächst mehrere Komplexmedien getestet, die in der Literatur zur Sporenanzucht filamentöser Pilze beschrieben werden. Die inhaltlichen Zusammensetzungen der einzelnen Medien sind Tabelle 3.1 (Kapitel 3.3.1.1) zu entnehmen.

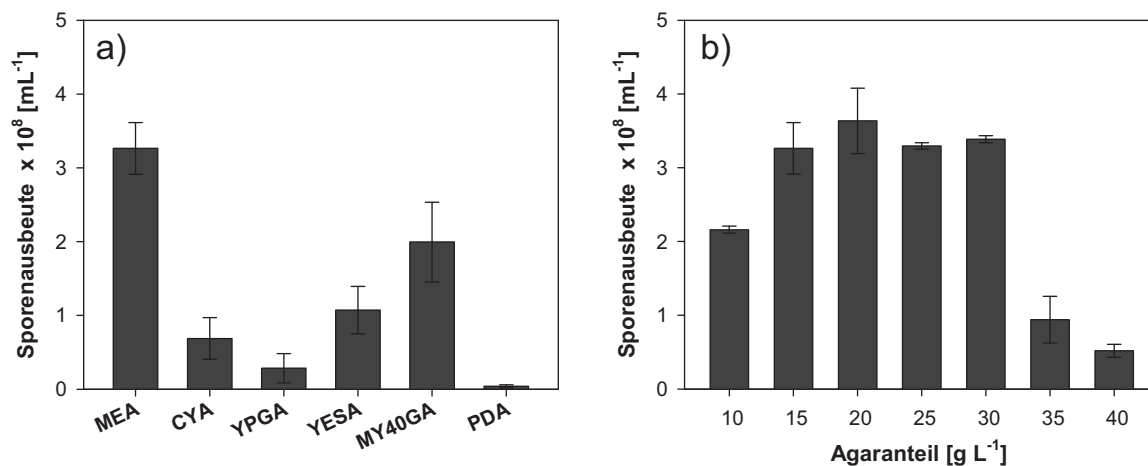


Abb. 4.15: Sporenausbeute auf (a) verschiedenen Komplexmedien und (b) MEA-Medium mit unterschiedlichem Agaranteil (Inkubation: 8 Tage, 24 °C, Dunkelheit).

Abbildung 4.15-a) zeigt, dass auf dem MEA-Standard-Medium deutlich höhere Sporenausbeuten von ca. $3,2 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ erzielt wurden, während auf den anderen Medien meist weniger als 50 % dieser Sporenkonzentration zu verzeichnen waren. Die in diesem Medium enthaltenen Nährstoffkomponenten scheinen demnach zur Anzucht von *A. ochraceus*-Sporen am besten geeignet. In folgenden Versuchen wurde überprüft, inwieweit die Sporenbildung auf dem MEA-Medium durch eine Variation des Agaranteils gesteigert werden kann (Abbildung 4.15-b). Die Erhöhung der Agarkonzentration im MEA-Medium von 10 auf 20 g L^{-1} ließ einen stimulierenden Effekt auf die Sporenbildung erkennen, was auf die verringerte Wasseraktivität des Mediums zurückgeführt werden kann. Die Wasseraktivität, welche als Maß für die zur Verfügung stehende Humidität des Mediums beschrieben wird, wirkt sich zusammen mit Temperatureinflüssen auf die Bindung und den

Dissoziationszustand des Wassers sowie auf die Löslichkeit von Substanzen, wie Zuckern und Salzen im Medium aus [www.wateractivity.org, 2010]. Eine verringerte Wasseraktivität limitiert den Nährstofftransport, was letztendlich den Sporulationsprozess bis zu einem Agargehalt von 20 g L^{-1} im MEA-Medium verstärkt einleiten könnte. Bei höheren Agarkonzentrationen und damit verbundenen sehr geringen Wasseraktivitäten überwiegt die Nährstofflimitation, woraus eine Abnahme des Myzelwachstums und der Sporenbildung resultiert. Damit ergibt ein Agaranteil von 20 g L^{-1} eine optimale Humidität des Mediums für die Bildung hoher Sporenmengen.

Abschließend sollte in dieser Versuchsreihe eruiert werden, inwieweit eine Steigerung der Sporenbildung auf MEA-Medium durch die Variation der Nährstoffkomponenten Malzextrakt und Sojapepton möglich ist. Zusätzlich wurde ein weiteres Komplexmedium getestet, welches als Hauptkomponente Maisquellwasser (MQWA) statt Malzextrakt enthielt. Maisquellwasser fällt unter anderem als Abfallprodukt bei der Quellung von Maiskörnern an. Es ist reich an Nährstoffen und findet daher häufig in submersen Kultivierungsprozessen mit filamentösen Pilzen Verwendung. Durch den möglichen Einsatz dieser Nährstoffkomponente zur Sporenanzucht würde eine kostengünstige Alternative zu Malzextrakt zur Verfügung stehen. Zudem stellt sich die Frage, inwieweit die Anzucht der Sporen auf den gleichen Substraten, wie sie in der anschließenden submersen Kultivierung vorliegen, von Vorteil ist, da sich der Organismus auf diese Weise nicht an neue Nährstoffbedingungen anpassen muss.

Anhand der in Abbildung 4.16-a) dargestellten Sporenausbeuten kann auf MEA-Medien generell eine effizientere Sporenbildung festgestellt werden. Die Komplexmedien mit Maisquellwasser scheinen dagegen nicht als Sporulationsmedium geeignet zu sein.

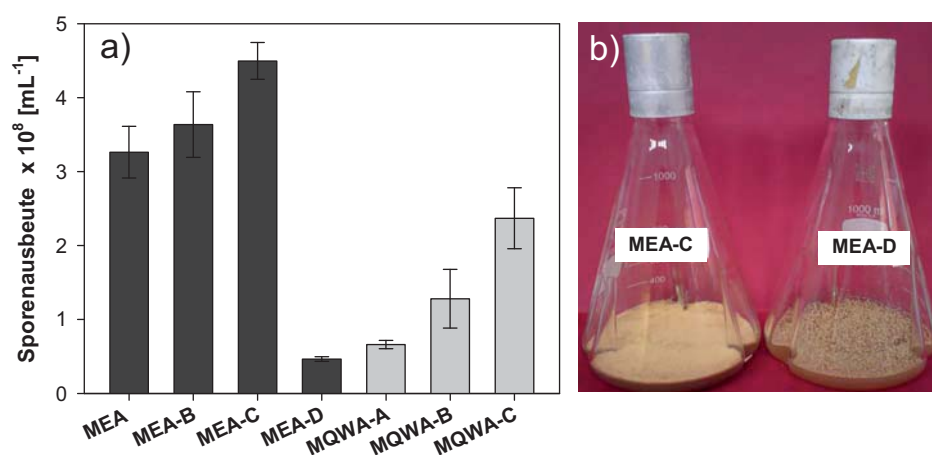


Abb. 4.16: (a) Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Komplexmedien, (b) Sporenrasen auf MEA-C und MEA-D (Inkubation: 8 Tage, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, Dunkelheit).

Wie bereits erwähnt, konnte durch eine Erhöhung der Agarkonzentration von 15 g L^{-1} (MEA) auf 20 g L^{-1} (MEA-B) eine 10 %-ige Steigerung der Sporenausbeute erzielt werden. Ferner zeigte sich, dass die Einzelkomponenten der Medien die Sporenbildung erheblich beeinflussen. Durch eine Konzentrationserhöhung des Malzextrakts von 30 g L^{-1} (MEA-B) auf 50 g L^{-1} (MEA-C) war eine weitere Zunahme der Sporenbildung um 25 % zu verzeichnen. Insbesondere Sojapepton scheint einen positiven Effekt auf die Sporulation auszuüben. So konnte mit zunehmendem Anteil an Sojapepton im Agarmedium eine deutliche Steigerung der Sporenbildung induziert werden. Der Effekt dieser Medienkomponente kann bereits optisch anhand der in Abbildung 4.16-b) dargestellten, bewachsenen Agarmedien MEA-C und MEA-D erfasst werden. Da sich das MEA-C-Medium nur durch den Zusatz von 3 g L^{-1} Sojapepton vom MEA-D-Medium unterscheidet, ist die fast zehnfache Steigerung der Sporenmenge von $5 \cdot 10^7$ auf $5 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} folglich auf den Effekt dieser Medienkomponente zurückzuführen. Ein gleicher Trend zeigte sich beim Vergleich der Medien MQWA-A und MQWA-B. Auch hier resultierte der Zusatz von Sojapepton in einer direkten Steigerung der Sporenausbeute. Sojapepton enthält vor allem Aminosäuren wie Aspartat, Glutamat, Glycin und Prolin sowie die Spurenelemente Magnesium, Calcium und Kalium. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde daher in weiteren Versuchen auf Minimalmedium insbesondere der Einfluss verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie verschiedener Aminosäuren auf die Sporulation näher untersucht.

Variation der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Minimalmedium

Um vom Hyphenwachstum auf die Sporenbildung umzuschalten, ist die Aktivierung spezifischer Regulator-Gene erforderlich [Adams, 1994; Mirabito et al., 1994; Ward et al., 2006]. In *A. nidulans* und anderen *Aspergilli* wurde nachgewiesen, dass die Expression des *brlA*-Gens fundamental am Wechsel vom vegetativen Wachstum zur asexuellen Reproduktion beteiligt ist. Weiterhin wurde festgestellt, dass Nährstoffmangel die Expression dieses Gens induziert [Skromne et al., 1995]. Dabei kann unter Nährstoffmangel nicht allein die Limitation oder Abwesenheit eines Nährstoffes verstanden werden, sondern auch die suboptimale Versorgung des Myzels mit energetisch minderwertigen Nährstoffquellen. Die Verwertung dieser Nährstoffe ist oft an eine Reihe energieabhängiger Modifikationsprozesse gebunden, die für den Pilz metabolischen Stress bedeuten.

In den folgenden Versuchsreihen galt es daher Nährstoffbedingungen zu identifizieren, die den hier verwendeten Modellorganismus in einen metabolischen Stresszustand versetzen und so den Sporulationsprozess begünstigen. Um eindeutige, auf eine bestimmte Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle zurückzuführende Auswirkungen zu detektieren, wurde ein Minimalmedium als Basismedium verwendet, welches (a) jeweils unterschiedliche Kohlenstoffquellen und (b) verschiedene Stickstoffquellen enthielt.

(a) Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen

Für verschiedene *Aspergillus*-Spezies wurde ein bevorzugtes Wachstum auf Glucose und glucoseähnlichen Substraten, wie Sucrose, festgestellt. Die meisten *Aspergilli* metabolisieren jedoch ebenso eine Reihe anderer Kohlenhydrate sowie organische Verbindungen und Säuren, so dass bisher kaum generalisierte Aussagen über optimale Kohlenstoffquellen für die Bildung hoher Sporenmengen getroffen werden können [Papagianni, 2004; Ruijter et al., 1997].

Um mögliche Präferenzen für eine bestimmte Kohlenstoffquelle während der Sporenbildung von *A. ochraceus* aufzudecken, wurde in der vorliegenden Arbeit ein breites Spektrum verschiedener Mono-, Oligo- und Polysaccharide als Kohlenhydratquelle zur Sporenanzucht untersucht. Des Weiteren wurden Schlüsselmetabolite als Kohlenstoffquelle im Agarmedium eingesetzt, um ihren Einfluss auf die Sporulation und die Eigenschaften der gebildeten Sporen zu eruieren. In Abbildung 4.17 ist die gebildete Sporenmenge der verschiedenen Versuchsansätze nach elf Tagen Inkubation dargestellt.

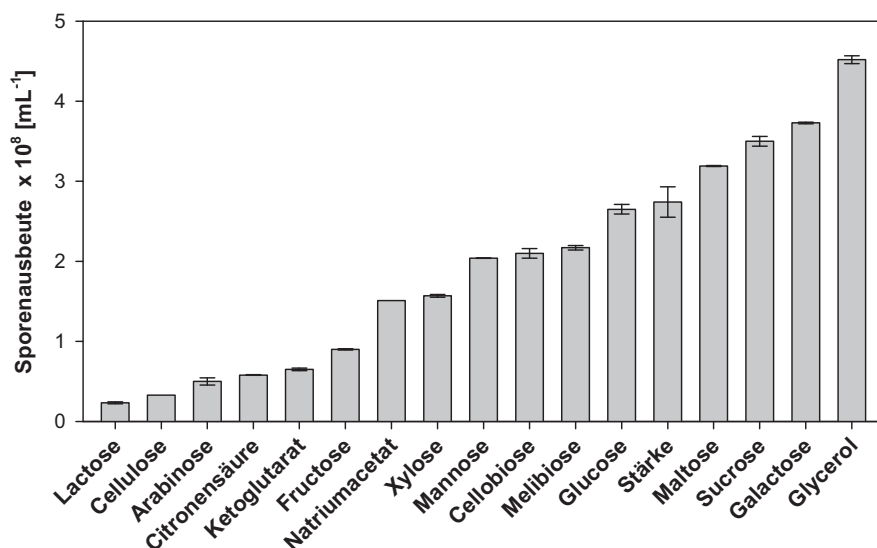


Abb. 4.17: Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle im Minimalmedium. Als Stickstoffquelle wurde NaNO_3 eingesetzt und ein C:N-Verhältnis von 8:1 eingestellt. (Inkubation: 11 Tage, 24 °C, Dunkelheit).

Nach Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen konnten unterschiedliche Auswirkungen auf das Sporulationsverhalten beobachtet werden. Während mit Lactose, Cellulose, Arabinose, Citronensäure, α -Ketoglutarat und Fructose im Sporulationsmedium weder gutes vegetatives Wachstum, noch ergiebige Sporenausbeuten erzielt wurden, ermöglichten die Kohlenhydratquellen Natriumacetat, Xylose, Mannose, Cellobiose und Melibiose mittleres Wachstum und Sporenkonzentrationen von durchschnittlich $1,8 \cdot 10^8$ mL⁻¹. Hohe Sporenmengen von $3,0$ bis $3,5 \cdot 10^8$ Sporen mL⁻¹ wurden dagegen durch den Zusatz von Glucose, Stärke, Maltose, Sucrose und Galactose zum Sporulationsmedium erreicht.

Insbesondere Glycerol scheint sowohl gutes vegetatives Wachstum als auch eine ertragreiche Sporenbildung zu induzieren. Die in Versuchen mit *Talaromyces flavus* (anamorph: *Penicillium dangeardii*) beobachtete ausgeprägte Sporenbildung auf Lactosehaltigen Medien konnte für den hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* nicht bestätigt werden, was auf speziesabhängige Unterschiede zurückgeführt werden kann [Engelkes et al., 1997].

Da im Hinblick auf den industriellen Prozess kurze Vorlaufzeiten und das frühzeitige Erreichen hoher Sporenmengen angestrebt werden, wurde im Folgenden die Sporenausbeute nach acht Tagen Inkubation auf ausgewählten Kohlenstoffquellen bestimmt und vergleichend zu den Ergebnissen nach elf Tagen dargestellt (Abbildung 4.18).

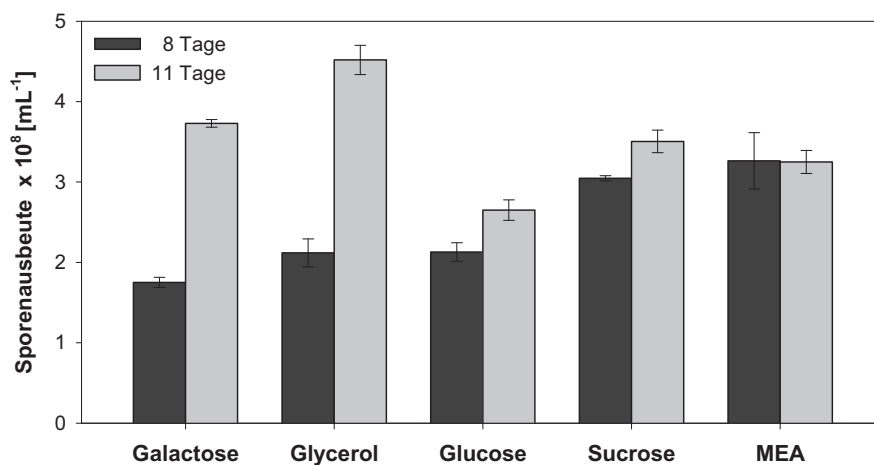


Abb. 4.18: Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle im Minimalmedium. Als Stickstoffquelle wurde NaNO_3 eingesetzt und ein C:N-Verhältnis von 8:1 eingestellt. (Inkubation: 8 und 11 Tage, 24 °C, Dunkelheit).

Die Ergebnisse zeigen, dass besonders Sucrose eine schnelle Sporenbildung förderte. Durch den Zusatz des Disaccharids zum Agarmedium konnte bereits nach acht Tagen Inkubation eine ähnliche Sporenkonzentration von $3 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ wie auf dem komplexen MEA-Standard-Medium erzielt werden. Auf dem Galactose- und Glycerol-Medium wurden entgegen der Erwartung nach acht Tagen nur mittlere Sporenausbeuten von etwa $2 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ erreicht, während nach elf Tagen bei einem voll ausgebildeten Myzelrasen eine starke Zunahme der Sporenbildung und schließlich maximale Sporenmengen von etwa $4,5 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ zu verzeichnen waren. Insgesamt scheint die enzymatische Ausstattung von *A. ochraceus* optimal auf die Verwertung von Sucrose abgestimmt zu sein, so dass durch Verwendung dieser Kohlenstoffquelle im Sporulationsmedium in kurzer Zeit hohe Sporenmengen hergestellt werden können.

(b) Einfluss verschiedener Stickstoffquellen

Studien mit *T. flavus* belegen, dass das Vorliegen einer Stickstoffquelle für das Hyphenwachstum von essentieller Bedeutung ist und auch die Quantität und Qualität der gebildeten Sporen maßgeblich beeinflussen kann [Engelkes et al., 1997].

Aspergilli können sowohl organische als auch anorganische Ammonium- und Nitratverbindungen verwerten. In Versuchen mit *A. flavus*, *A. nidulans* und *Coniothyrium minitans* wurde festgestellt, dass organische Stickstoffquellen zwar das vegetative Wachstum fördern, die Sporulation jedoch inhibieren. Dagegen wurde bei Verwendung anorganischer Stickstoffquellen die Sporenbildung gesteigert [Han et al., 2003; Olutiola, 1976; Ooijkaas et al., 1999]. Auch in *T. flavus* ließen sich durch Verwendung verschiedener Stickstoffquellen unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum und die Sporulation feststellen. Eine intensive Sporenbildung fand hier jedoch vor allem auf organischen Verbindungen wie Tyrosin statt [Engelkes et al., 1997].

Um optimale Stickstoffquellen für eine maximale Sporenbildung von *A. ochraceus* aufzudecken, wurden im Rahmen dieser Versuchsreihe anorganische und organische Stickstoffquellen eingesetzt. Des Weiteren wurden Aminosäuren als Stickstoffquelle im Sporulationsmedium getestet.

Anhand der in Abbildung 4.19 dargestellten Ergebnisse kann eine starke Auswirkung der Art der Stickstoffquelle auf die Sporenbildung von *A. ochraceus* festgestellt werden.

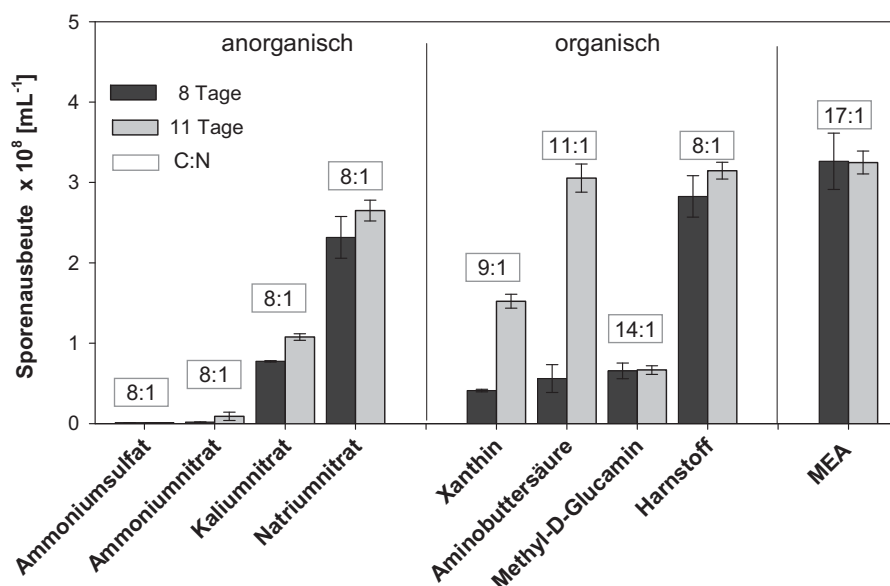


Abb. 4.19: Sporenausbeute in Abhängigkeit von anorganischen und organischen Stickstoffquellen im Minimalmedium. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose mit einem C-Anteil von 4 g L^{-1} eingesetzt (Inkubation: 8 und 11 Tage, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, Dunkelheit).

Während nach acht und elf Tagen Inkubation auf Ammoniumsulfat und –nitrat ein starkes Myzelwachstum, jedoch nur eine sehr geringe Sporenbildung detektiert wurde, erfolgte auf

Kalium- und Natriumnitrat-haltigen Medien eine gesteigerte Sporulation mit mittleren Sporenausbeuten von $1,0$ bis $2,3 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} .

Auf den meisten organischen Stickstoffquellen wurden nach acht Tagen Inkubation im Durchschnitt nur $0,5 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} gebildet. Eine Ausnahme stellte das Diamid Harnstoff dar, dessen Einsatz als Stickstoffquelle bereits zu diesem Zeitpunkt eine sechsfach höhere Sporenmenge von $2,8 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} ermöglichte und damit ähnliche Sporenkonzentrationen wie auf dem komplexen MEA-Standard-Medium erzielte. Nach elftägiger Inkubation waren auch auf der organischen Stickstoffquelle α -Aminobuttersäure vergleichbare Sporenausbeuten zu verzeichnen.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnte kein Einfluss auf den Sporulationsprozess durch das höhere tatsächliche C:N-Verhältnis in den Medien mit organischer Stickstoffquelle festgestellt werden. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass Glucose als primäre Kohlenstoffquelle den Katabolismus anderer im Medium enthaltener Kohlenstoffverbindungen weitestgehend reprimiert und eine Metabolisierung der eingesetzten organischen Stickstoffquelle als Kohlenstoffquelle nahezu ausgeschlossen werden kann [Ruijter et al., 1997]. Vielmehr scheint die Art der Stickstoffquelle die Quantität der Sporenbildung zu beeinflussen. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Prozesse kann ein Einblick in den Stickstoffmetabolismus von *Aspergillus* geben. Filamentöse Pilze benötigen für das vegetative Wachstum vor allem Ammoniumionen, um ihren Stickstoffbedarf zu decken. Liegen ausreichend hohe Konzentrationen dieser primären Stickstoffquelle vor, kommt es zu einer schnellen Sporenkeimung, womit die stark ausgeprägte Myzelbildung auf den Medien mit Ammoniumsulfat und -nitrat zu erklären ist. Da auf diesen Medien auch nach längerer Inkubation nur eine mangelhafte Sporenbildung beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass Ammoniumionen die Sporulation inhibieren, bzw. den Organismus nicht in jenen Zustand versetzen, der diesen Entwicklungsprozess induziert. Im Gegensatz dazu können Nitratsalze wie Kalium- oder Natriumnitrat als sekundäre Stickstoffquelle betrachtet werden, welche zunächst unter hohem Energieaufwand über eine membranassoziierte Permease in die Zelle aufgenommen und zu Ammoniumionen reduziert werden müssen [Krappmann et al., 2005]. Infolgedessen liegt bei Wachstum auf diesen Stickstoffquellen eine suboptimale Nährstoffversorgung vor, die den Sporulationsprozess letztendlich stimuliert. Auch Harnstoff zählt zu den sekundären Stickstoffquellen. Die Harnstoffassimilation und -spaltung ist ATP-abhängig und für den Organismus mit hohem energetischem Aufwand verbunden. Folglich ist die auf diesem Substrat wachsende Hyphenzelle metabolischem Stress ausgesetzt, woraus vermutlich der verstärkte Sporulationsprozess resultierte.

Im Folgenden wurden verschiedene Aminosäuren als Stickstoffquelle im Sporulationsmedium eingesetzt. Der Einfluss von Aminosäuren auf das Sporulationsverhalten erwies sich in Vorversuchen als interessanter Untersuchungsaspekt. Da die bekannten Stoffwechselwege zahlreich und besonders der Katabolismus von Aminosäuren sehr komplex ist, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur eine Auswahl an Aminosäuren erläutert.

Abbildung 4.20 zeigt die erhaltenen Sporenausbeuten nach Wachstum auf verschiedenen Aminosäuren im Sporulationsmedium.

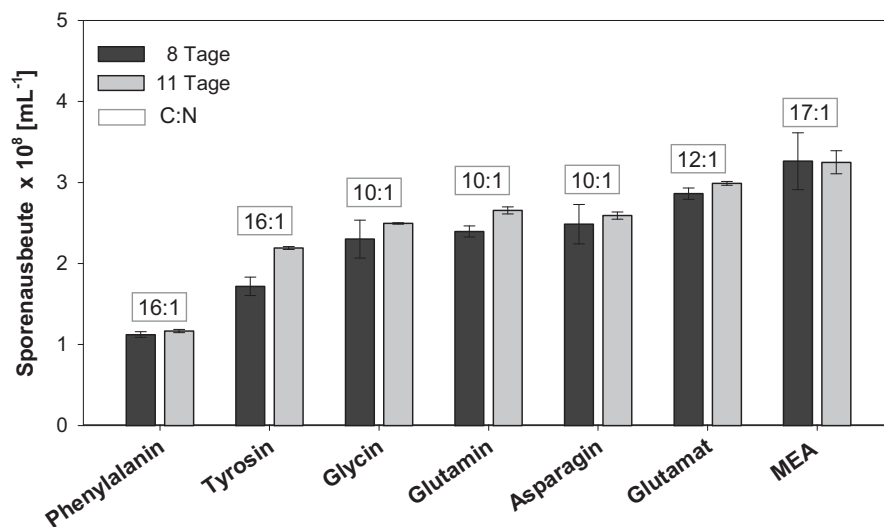


Abb. 4.20: Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Aminosäure im Minimalmedium. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose mit einem C-Anteil von 4 g L^{-1} eingesetzt (Inkubation: 8 und 11 Tage, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, Dunkelheit).

Auf den Aminosäure-haltigen Agarmedien ließ sich überwiegend eine ausgeprägte Sporenbildung beobachten. Bereits in Versuchen mit *A. flavus* wurde festgestellt, dass durch den Einsatz von Aminosäuren als Stickstoffquelle höhere Sporenmengen gebildet werden, als mit Nitrat-, Nitrit-, oder Ammonium-haltigen Stickstoffquellen (vgl. Abbildung 4.19) [Grover, 1964]. Nach acht Tagen Inkubation konnte durch den Zusatz von Glycin, Glutamin und Asparagin ein intensives vegetatives Wachstum und eine Sporenausbeute von durchschnittlich $2,4 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} detektiert werden. Auf Glutamat-haltigem Medium wurde beim Vergleich aller im Rahmen dieser Versuchsreihe getesteten Stickstoffquellen die höchste Sporenkonzentration von $2,9 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} gebildet und letztendlich eine ähnliche Sporenausbeute wie auf dem komplexen MEA-Standard-Medium erzielt. Da nach elf Tagen Inkubation auf keinem der hier untersuchten Medien eine signifikante Steigerung der Sporenmenge zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass bereits nach acht Tagen das Nährstoffpotential im Medium zur Sporulation ausgeschöpft war.

Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen dem C:N-Verhältnis im Sporulationsmedium und der Sporenausbeute festgestellt werden, so dass eine Metabolisierung der eingesetzten organischen Stickstoffquelle als Kohlenstoffquelle ausgeschlossen werden kann. Auch hier scheint die jeweilige Aminosäure direkt die Quantität der Sporenbildung zu beeinflussen. Aus der Fachliteratur lassen sich jedoch nur schwer generalisierte Aussagen zum Einfluss der Aminosäuren auf das Sporulationsverhalten ableiten, da sie dem Pilz nicht nur als Stickstoffdonor, sondern auch als Intermediat oder gar als direkter Baustein für die Proteinbiosynthese zur Verfügung stehen können. Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen können zwischen bestimmten Aminosäuren jedoch tendenziell ähnliche

Auswirkungen auf das Wachstums- und Sporulationsverhalten festgestellt werden. Dies trifft insbesondere auf Aminosäuren wie Glutamin und Asparagin zu, deren Abbauwege in Glutamat resultieren. Glutamat gehört zu den Stickstoffquellen, die nach erfolgter Aufnahme nicht weiter zu Ammonium reduziert werden müssen, sondern vielmehr direkt als universeller Stickstoffdonor von der Hyphenzelle verwendet werden.

Darüber hinaus fiel bei der Betrachtung der mit Tyrosin versetzten Agarmedien auf, dass die darauf gebildeten Sporen im Vergleich zu den anderen Sporenproben eine deutlich dunklere Färbung aufwiesen, was vermutlich auf eine erhöhte Akkumulation von Melanin zurückzuführen ist. Dieses Pigment wird während der Sporenbildung in der Zellwand der Spore eingelagert und dient zum Schutz vor äußeren Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung, enzymatischer Lyse oder mechanischem Stress. Zusätzlich zur Verstärkung der Zellwand wirkt die Melanisierung als osmotische Barriere [Calvo et al., 2002; Nosanchuk et al., 2003; Pihet et al., 2009]. Die ausreichende Synthese von Melanin während der Sporulation ist demnach für die Widerstandsfähigkeit der gebildeten Sporen von großer Bedeutung. Da Tyrosin ein wichtiges Intermediat der Melaninsynthese darstellt, begünstigt das Wachstum auf dieser aromatischen Aminosäure vermutlich indirekt die Sporenformation und -qualität von *A. ochraceus*.

4.3.1.6 Einfluss der Inokulumkonzentration

Die Konzentration des Inokulums hat einen direkten Effekt auf das Wachstum filamentöser Pilze. Gegenstand bisheriger Untersuchungen war insbesondere der Einfluss der Inokulumkonzentration auf das Aggregationsverhalten, die Morphologie sowie die Produktbildung im submersen Kultivierungsprozess [Grimm et al., 2004; Kiep, 2010; Papagianni et al., 2006; Sautour et al., 2003; Sharma et al., 1980; Tucker et al., 1994; Xu et al., 2000]. Über die Auswirkung der Inokulumkonzentration auf das Keimungsverhalten und die Sporenbildung filamentöser Pilze auf festen Medien ist bisher wenig in der Literatur beschrieben. Zudem können aufgrund individueller Bedürfnisse der verschiedenen Spezies kaum allgemeingültige Aussagen getroffen werden, die ohne weiteres auf *A. ochraceus* übertragen werden können. In diesem Versuchsteil galt es daher zu klären, inwieweit Inokula verschiedener Konzentration das Sporulationsverhalten auf Festmedium beeinflussen. Hierfür wurde das MEA-Medium mit unterschiedlichen Inokulumdichten beimpft, so dass auf der Agaroberfläche 10^{-1} bis 10^4 Sporen mm^{-2} vorlagen. Nach fünf- sowie achttägiger Inkubation wurde die gebildete Sporenmenge der verschiedenen Versuchsansätze bestimmt (vgl. Abbildung 4.21).

Anhand der Ergebnisse konnte ein deutlicher Einfluss der Inokulumkonzentration auf die Differenzierung der Hyphen auf dem Agarmedium festgestellt werden. Nach fünf Tagen Inkubation war zunächst ein Anstieg der Sporenproduktion mit zunehmender Inokulumdichte zu erkennen, wobei der Versuchsansatz, der mit 100 Sporen mm^{-2} beimpft wurde, mit

$1,8 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} die höchste Sporenausbeute erzielte. Eine weitere Erhöhung der Inokulumkonzentration führte zu einer Abnahme der Sporenbildung. Auch Untersuchungen mit *Colletotrichum gloeosporioides* und *Glomerella cingulata* wiesen darauf hin, dass eine minimale Inokulumdichte zur Sporenbildung notwendig ist, während zu hohe Inokulumkonzentrationen das Keimungsverhalten und die Differenzierung der Hyphen inhibieren [Lax et al., 1985; Lingappa et al., 1973]. Aktuelle Ergebnisse lassen in diesem Zusammenhang auf regulatorische Netzwerke schließen, welche, ähnlich dem *Quorum Sensing* bei Prokaryoten, in Abhängigkeit von der Sporendichte Zell-Zell-Interaktionen kontrollieren und so die Sporulation fördern oder hemmen [Hogan, 2006].

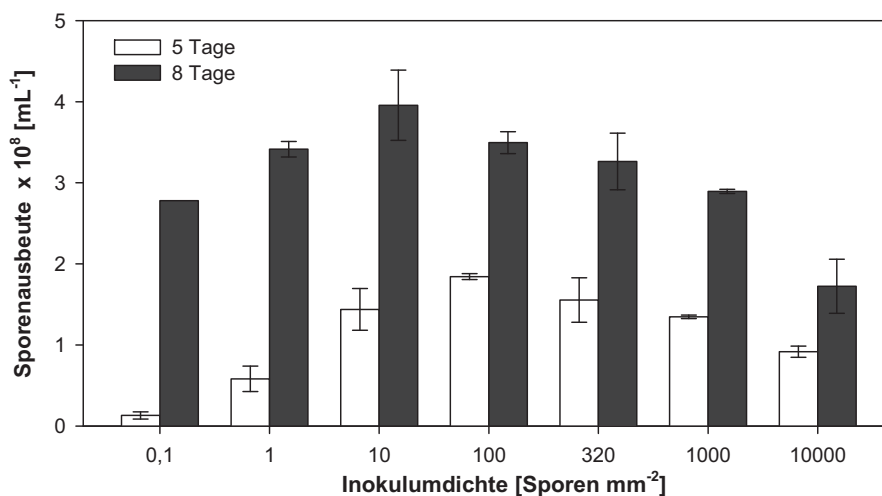


Abb. 4.21: Sporenausbeute in Abhängigkeit von der Inokulumdichte auf MEA-Medium (Inkubation: 5 und 8 Tage, 24 °C, Dunkelheit).

Nach acht Tagen Inkubation setzte sich der zuvor beobachtete Trend fort, wobei die optimale Inokulumdichte für eine schnelle und maximale Sporenbildung bei *A. ochraceus* nun eindeutig im Bereich von 10 Sporen mm^{-2} zu lokalisieren war. In den zuvor eher schwach sporulierenden Ansätzen mit Inokulumdichten von 0,1 bis 1 Spore mm^{-2} , erfolgte im Vergleich zu Tag fünf eine deutlich gesteigerte Sporenproduktion, während in den Ansätzen mit höheren Inokulumkonzentrationen im gleichen Zeitraum eine geringere Sporenzunahme detektiert wurde. Hier besteht zum einen die Möglichkeit, dass über das Myzel sekretierte Signalpeptide beim Erreichen einer bestimmten Sporenkonzentration eine Zellantwort bewirken, die in einer Hemmung der weiteren Konidiophorbildung resultiert. Denkbar ist auch, dass es sich bei jenen Signalmolekülen um die gleichen Peptide handelt, die zuvor die Sporulation fördern, aber ab einer bestimmten Konzentration den gegenteiligen Effekt bewirken [Hogan, 2006].

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe lassen damit die Schlussfolgerung zu, dass für eine schnelle und maximale Sporenproduktion Inokulumdichten von 10 bis 100 Sporen mm^{-2} eingestellt werden sollten.

4.3.2 Sporeneigenschaften

Im vorherigen Kapitel wurde bereits die Auswirkung verschiedener environomischer Parameter auf die Sporenbildung diskutiert, wobei entscheidende Einflussfaktoren identifiziert und damit erste Hinweise über optimale Sporulationsbedingungen gefunden wurden. Da vor allem für industrielle Kultivierungsmaßstäbe neben hohen Sporenmengen gleichzeitig homogene Seedingkulturen mit Sporen hoher Güte für reproduzierbare Produktausbeuten unerlässlich sind, galt es im Folgenden mit Hilfe der etablierten Charakterisierungsmethoden (vgl. Kapitel 4.2) die Eigenschaften der verschiedenen hergestellten Sporenpopulationen zu analysieren. Durch Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsverfahren untereinander sowie mit weiteren Qualitätsindikatoren sollte gleichzeitig die Anwendbarkeit der Methoden überprüft werden. Für eine ganzheitliche Beurteilung der identifizierten Sporeneigenschaften und -qualität wurde im Rahmen der Arbeit schlussendlich validiert, inwieweit eine Korrelation zum Wachstum und der Biotransformationsleistung im submersen Kultivierungsprozess besteht.

4.3.2.1 Effekt erhöhter Salinität

Die Eigenschaften von Sporen und die Sporengüte im Allgemeinen werden unter anderem durch die auf den Sporulationsprozess einwirkenden Umgebungsparameter beeinflusst. Unter diesen Parametern spielt die Salinität des Sporulationsmediums eine wichtige Rolle, da Salze einerseits essentielle Mineralstoffe darstellen, andererseits in hohen Konzentrationen durch die stark verringerte Wasseraktivität inhibierend wirken. In Kapitel 4.3.1.4 wurden bereits starke Auswirkungen der Salinität des Sporulationsmediums auf das Wachstum und die Sporenbildung von *A. ochraceus* beschrieben. Nachfolgend werden die Charakteristika der unter diesen Bedingungen hergestellten Sporen dargestellt und diskutiert.

Sporenencharakteristika

Anteil membranintakter Sporen

Wie bereits erwähnt, beeinflusst die Sporenkonzentration des Inokulums die morphologische Entwicklung der Kultur unter submersen Bedingungen [Papagianni, 2004]. Die unterschiedlichen Morphologieformen haben wiederum verschiedene Produktivitäten zur Folge. Die Kenntnis über die absolute Sporenkonzentration im Inokulum stellt daher einen wichtigen Ansatzpunkt zur Erhaltung der Reproduzierbarkeit von Produktionsprozessen dar. Entscheidend dabei ist der Anteil intakter, keimfähiger Sporen einer Sporenpobe, der zur Biomassebildung in submerser Kultivierung beiträgt. In der vorliegenden Arbeit wurde das LIVE/DEAD® Viability Kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), bestehend aus SYTO 9 Green und

Propidiumiodid (PI), zur Unterscheidung lebender und defekter Sporen anhand ihrer Membranintegrität eingesetzt (Kapitel 4.1.1).

In Abbildung 4.22 ist der Einfluss des Salzgehalts im Sporulationsmedium auf den prozentualen Anteil membranintakter bzw. -defekter Sporen dargestellt.

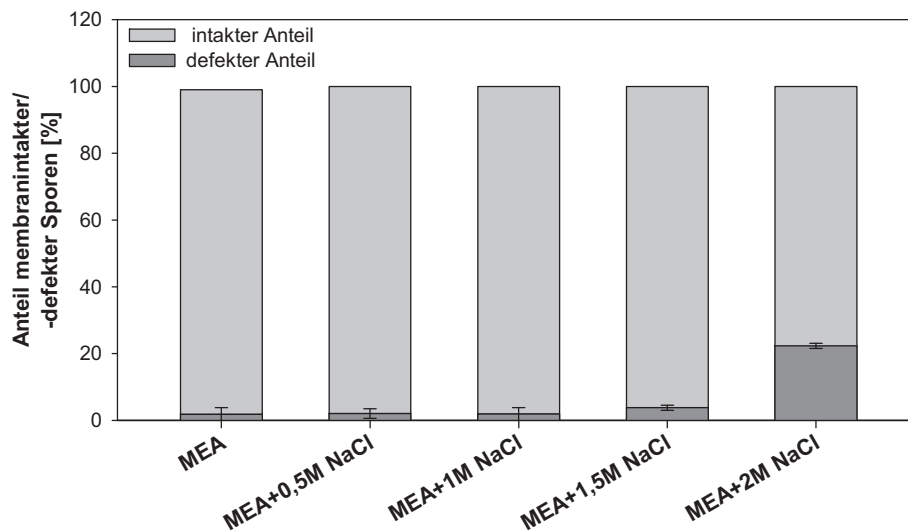


Abb. 4.22: Sporenteil mit intakter bzw. defekter Membranintegrität in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Sporulationsmediums.

Mit zunehmendem Salzzusatz im Sporulationsmedium wurde ein steigender Anteil membrandefekter Sporen detektiert. Während sich dieser Effekt bis zu einer 1,5 M NaCl-Konzentration noch relativ gering auswirkte, wiesen die unter Zugabe von 2 M NaCl angezogenen Sporen bereits einen relativen Anteil defekter Sporen von 22 % auf. Der steigende Anteil defekter Sporen kann auf durch hohe Salinität hervorgerufene Defekte in der Zellwand der Sporen zurückgeführt werden. Möglicherweise wird die Struktur der Sporenhülle direkt durch die Salzkonzentration oder indirekt durch die mangelnde Expression sporulationsspezifischer Gene beeinflusst, welche am Zellwandaufbau beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurde bereits für *B. subtilis* gezeigt, dass bei hoher Osmolalität eine verringerte Genexpression aus einer verminderten Bildung genregulationsspezifischer Faktoren resultiert [Ruzal et al., 1998]. Weiterhin könnten Enzyme, die an der Synthese von Komponenten der Sporenmembran beteiligt sind, durch die verringerte Wasseraktivität im Myzel bzw. in der Konidiophore in ihrer Aktivität eingeschränkt sein oder durch Inhibierung auf genregulatorischer Ebene in ungenügender Anzahl vorliegen.

Konzentration kompatibler Solute

Aspergillus-Sporen sind mit einem komplexen Nährstoffsortiment ausgestattet, wodurch ihnen Energie und Metabolite für die erneute Keimung zur Verfügung stehen. Die cytosolische Kohlenhydratfraktion besteht dabei vorwiegend aus Polyolen und Zuckern, wobei die Konzentration der jeweiligen Polyole von den auf den Sporulationsprozess einwirkenden Umgebungsparametern beeinflusst wird [Morozova et al., 2002; Ruijter et al., 2003]. Polyole dienen als kompatible Solute zur Anpassung der intrazellulären Osmolalität an die Umgebung und wirken dem drohenden Wasserverlust unter hyperosmotischen Bedingungen entgegen. Zudem werden eine Reihe weiterer physiologischer Funktionen beschrieben, in denen Polyole als Kohlenstoffspeicher, Antioxidantien, Reduktantien und Osmolytika wesentlich involviert sind [Ruijter et al., 2003; Witteveen et al., 1995].

In biochemischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass über die Charakterisierung der cytosolischen Kohlenhydratfraktion von Pilzsporen eine Aussage über deren Keimfähigkeit möglich ist [Morozova et al., 2002; Tereshina et al., 2004]. Im Rahmen der Arbeit galt es daher zu klären, inwieweit die intrazelluläre Kohlenhydrat-Zusammensetzung der Sporen als Qualitätsindikator von Seedingkulturen des hier verwendeten Modellorganismus *A. ochraceus* herangezogen werden kann.

Die Bestimmung der Polyole erfolgt traditionell mittels Gaschromatographie (GC), wobei zunächst eine zeitaufwändige Derivatisierung unter Einsatz karcinogener Komponenten wie N-(Trimethylsilyl)-imidazol oder bis-(Trimethylsilyl)-acetamid in Pyridin erforderlich ist. Durch die Verfügbarkeit neu entwickelter HPLC-Säulen ist inzwischen die Auftrennung von Polyolen ohne Derivatisierung möglich. Dafür galt es zunächst zur Isolierung der Kohlenhydrate und Polyole aus *A. ochraceus*-Sporen, das optimale Zellaufschlussverfahren (mechanisch oder physikalisch) zu identifizieren. Ferner wurde der Einsatz variierender Extraktionslösungen (Dimethylsulfoxid, H₂O, 0,9 %-ige NaCl-Lösung) untersucht. Insgesamt erwies sich die physikalische Behandlung bei 100 °C in 0,9 %-iger NaCl-Lösung für 10 min als optimales Verfahren zur Isolierung der Kohlenhydrat-Verbindungen aus *A. ochraceus*-Sporen. Die qualitative und quantitative Bestimmung der Kohlenhydrat- und Polyolkonzentration erfolgte schließlich mittels HPLC (vgl. Kapitel 3.7.4.2).

In Abbildung 4.23 sind die intrazellulären Polyolkonzentrationen der unter variierender Osmolalität im Agarmedium gebildeten Sporen dargestellt.

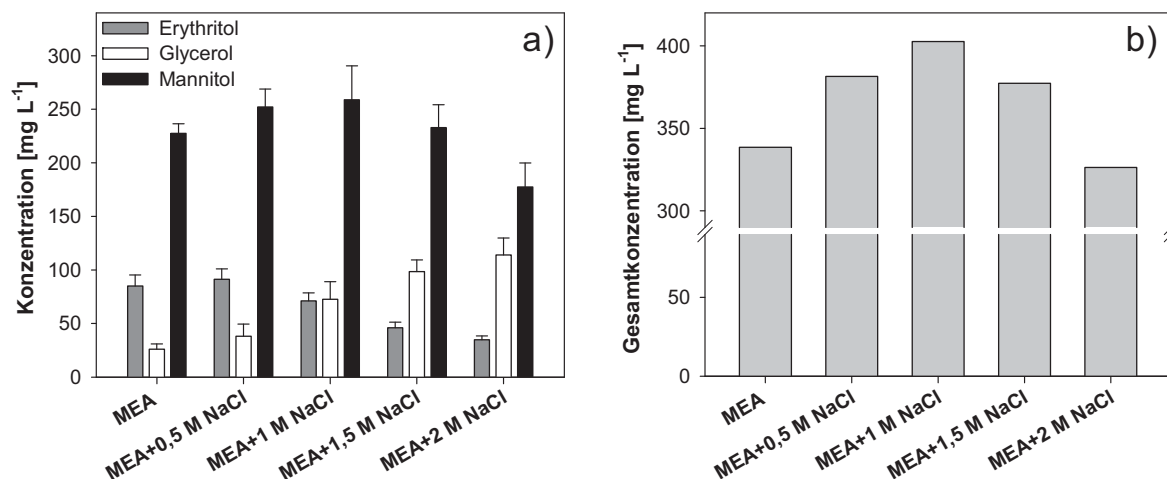


Abb. 4.23: (a) Konzentration von Erythritol, Glycerol und Mannitol sowie (b) Gesamtkonzentration von Erythritol, Glycerol und Mannitol in Sporen in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Sporulationsmediums.

Bei der Analyse der cytosolischen Kohlenhydrat-Zusammensetzung der verschiedenen Sporenproben wurden vorwiegend Erythritol, Glycerol und Mannitol detektiert (vgl. Abbildung 4.23-a). Für die Polyole Erythritol und Glycerol konnte mit zunehmender Salinität im Sporulationsmedium ein gegenläufiger Trend beobachtet werden. Während Sporen, die auf MEA-Standard-Medium und bei einer geringen NaCl-Konzentration von 0,5 M angezogen wurden, einen relativ hohen Erythritolgehalt von etwa 90 mg L^{-1} aufwiesen, enthielten die unter 2 M NaCl-Zusatz gebildeten Sporen eine 60 % geringere Erythritolkonzentration. Im Gegensatz dazu scheinen hohe Osmolalitäten die Bildung und Akkumulation von Glycerol zu induzieren. Sporen, die unter 2 M NaCl-Konzentration im Agarmedium hergestellt wurden, wiesen im Vergleich zu Sporen vom MEA-Standard-Medium, eine vierfach höhere Glycerolkonzentration auf. In diesem Zusammenhang konnte bereits für *S. cerevisiae* sowie verschiedene *Aspergilli* die bevorzugte Synthese von Polyolen mit geringem Molekulargewicht unter erhöhtem osmotischen Stress festgestellt werden [Beever et al., 1986; Hallsworth et al., 1994; Hohmann, 2002; Jennings, 1995; Ramirez et al., 2004; Ramos et al., 1999]. Die Produktion dieser kompatiblen Solute wird dabei über die Aktivierung spezifischer biochemischer Reaktionen und die Expression osmoregulatorischer Gene induziert [Han et al., 2002; Hohmann, 2002].

Weiterhin wird anhand der Ergebnisse deutlich, dass Mannitol die Hauptkomponente der in den Sporen gespeicherten Polyole darstellte. Zudem wurde mit steigender NaCl-Konzentration im Sporulationsmedium eine Zunahme der Mannitolakkumulation detektiert, wobei Sporen, die auf Agarmedium mit 1 M NaCl-Zusatz angezogen wurden, die höchste Mannitolkonzentration von 260 mg L^{-1} aufwiesen. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration im Agarmedium resultierte in einer Abnahme des intrazellulären Mannitolgehalts. Bereits in *A. niger*-Sporen konnte dieser Polyhydroxalkohol als Hauptkomponente nachgewiesen werden [Ruijter et al., 2003]. Gegenwärtig ist jedoch noch

nicht eindeutig geklärt, inwieweit Mannitol als Osmoregulator fungiert. Dessen ungeachtet wurde in weiteren Studien festgestellt, dass Mannitol eine wichtige Rolle als Kohlenstoffspeicher zukommt [Corina et al., 1971; Jennings, 1995; Ruijter et al., 2003; Smirnov et al., 1989; Witteveen et al., 1995].

In Abbildung 4.23-b) ist die Gesamtkonzentration der hier diskutierten Polyole dargestellt. Bei dieser Betrachtung wird deutlich, dass Sporen, die auf MEA-Medium mit 1 M NaCl-Zusatz gebildet wurden, die höchste Polyolkonzentration aufwiesen. Judet et al. (2008) vermuten, dass die hieraus resultierende höhere intrazelluläre Osmolalität zu einem höheren Wassergradienten bei der Quellung und Keimung führt und diese folglich beschleunigt. Ferner weisen Untersuchungen mit *A. niger* darauf hin, dass Polyole die Widerstandskraft der Sporen gegen Zellschäden und Stressbedingungen erhöhen, wodurch der geringere Anteil intakter Sporen bei 2 M NaCl-Zusatz erklärt werden kann (vgl. Abbildung 4.22) [Ruijter et al., 2003; Tereshina et al., 2004].

Biomasseaktivität im FDA-Assay

Zum Vergleich der unterschiedlich hergestellten Sporensätze wurde mittels FDA-Assay deren enzymatische Aktivität in der Anfangsphase einer Kultivierung bestimmt. Da auf diese Weise der Aktivitätsverlauf während der Keimung der Sporen gemessen werden kann, eignet sich der FDA-Assay besonders gut, um ein eventuell verändertes Keimungsverhalten aufzudecken.

Abbildung 4.24 zeigt die enzymatische Biomasseaktivität (dargestellt als relative Fluoreszenz Einheit RFU) über der Kultivierungszeit für die unter variierender Salzkonzentration hergestellten Sporenproben.

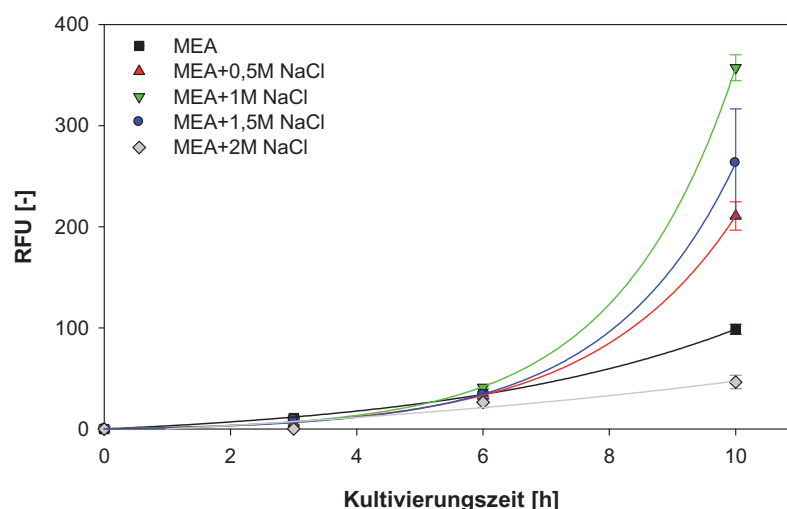


Abb. 4.24: Enzymatische Aktivität (dargestellt als RFU) keimender Sporen unter submersen Bedingungen im FDA-Assay in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Sporulationsmediums.

Während in den ersten 6 h der Kultivierung für die verschiedenen Sporen eine annähernd gleiche Steigung der Biomasseaktivität detektiert wurde, stellten sich nach 10 h bereits klare Unterschiede heraus. So erfolgte die stärkste Aktivitätssteigerung bei Sporen, die bei einer 1 M NaCl-Konzentration angezogen wurden. Sporen vom MEA-Standard-Medium ließen während dieser Zeitspanne ebenfalls eine Zunahme der Aktivität erkennen, diese war jedoch nach 10 h um mehr als das Dreifache geringer als die der 1 M-Sporen. Bei einer 2 M NaCl-Konzentration im Sporulationsmedium wiesen die darauf gebildeten Sporen im FDA-Assay in den letzten 4 h keinen signifikanten Anstieg der Aktivität auf, was zum einen durch den höheren Anteil membrandefekter Sporen unter erhöhten osmolalen Bedingungen zu erklären ist (vgl. Abbildung 4.22). Zum anderen kann der niedrigere Polyol- und insbesondere Mannitolgehalt dieser Sporenproben zur Begründung des geringeren Keimungspotentials herangezogen werden. Wie bereits in Abbildung 4.23-b) gezeigt, enthalten Sporen, die unter 1 M NaCl-Zusatz gebildet wurden, höhere Mengen kompatibler Solute. Die sich hieraus ergebene höhere intrazelluläre Osmolalität hat bei der Quellung einen höheren Wassergradienten zwischen umgebendem Medium und Sporennieren zur Folge [Judet et al., 2008]. Durch das resultierende schnellere Einstromen von Wasser in die Spore können metabolische Aktivitäten, wie die Zellatmung oder Proteinbiosynthese, schneller wieder aufgenommen werden, wodurch letztendlich der beschleunigte Keimungsprozess dieser Sporenpopulation zu erklären ist.

Darüber hinaus kann die starke Aktivitätssteigerung der bei 1 M NaCl im Anzuchtsmedium erhaltenen Sporen auf den hohen intrazellulären Mannitolgehalt zurückgeführt werden. In früheren Studien wurde bereits eine höhere Konzentration an Mannitol in keimfähigen *Aspergillus*-Sporen nachgewiesen. Ferner konnte in Versuchen mit *A. oryzae* eine kontinuierliche Abnahme der Mannitolkonzentration in keimenden Sporen bestimmt werden. Bevor die Spore in der Lage ist, eine externe Kohlenstoffquelle zur Keimung zu nutzen, scheint damit Mannitol als Hauptenergiespeicher für die endogene Respiration zu fungieren [Corina et al., 1971; d'Enfert, 1997; Morozova et al., 2002; Ruijter et al., 2003; Smirnov et al., 1989; Tereshina et al., 2004; Witteveen et al., 1995]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine 1 M NaCl-Konzentration im Sporulationsmedium zu einem deutlich verstärkten Anstieg der Biomasseaktivität in der Keimungsphase führte. Sporen, die ohne den Zusatz von Natriumchlorid gebildet wurden, zeigten im Vergleich geringere Aktivitäten in der Anfangsphase submerser Kultivierungen.

Sporenvitalität im MTT-Assay

Zur weiteren Charakterisierung der unter variierender Salinität des Agarmediums gebildeten Sporenpopulationen, wurden diese mittels MTT-Assay auf ihre respiratorische Aktivität getestet. Als Maß für diese Aktivität diente dabei die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes MTT

durch intrazelluläre Dehydrogenasen zu blau-violetten MTT-Formazan, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm detektiert wurde (vgl. Kapitel 4.2.3).

Anhand Abbildung 4.25 ist ein Anstieg der Aktivität bis zu einer Konzentration von 1 bis 1,5 M NaCl im Sporulationsmedium zu erkennen, während für den Ansatz mit 2 M NaCl-Konzentration eine Abnahme der respiratorischen Aktivität zu verzeichnen ist. Wie bereits erwähnt, war bei diesem Ansatz der mittels Lebend/Tot-Test bestimmte Anteil defekter Sporen deutlich höher (vgl. Abbildung 4.22). Die verringerte Aktivität lässt sich damit auf die geringere Anzahl lebender, aktiver Sporen zurückführen.

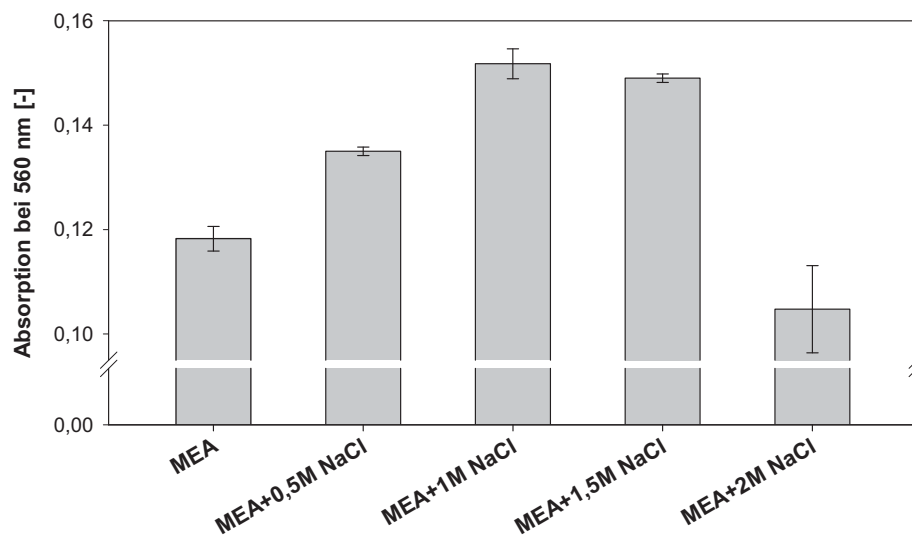


Abb. 4.25: Sporenvitalität im MTT-Assay (dargestellt als Absorption bei 560 nm) in Abhängigkeit vom Salzgehalt des Sporulationsmediums.

Verglichen mit den gemessenen Extinktionswerten toter Sporen von 0,04 (vgl. Kapitel 4.1.3) liegen die Werte der hier untersuchten Sporenpopulationen mit 0,12 bis 0,15 in einem deutlich höheren Bereich. Dies bestätigt, dass die Sporen, die auf den unterschiedlichen Agarmedien angezogen wurden, generell Keimungspotential aufwiesen, was bereits durch den FDA-Assay bestätigt wurde.

Insgesamt korrelieren die Ergebnisse des MTT-Assays sehr gut mit dem mittels FDA-Assay aufgenommenen Aktivitätsverlauf während der Keimung. Sporen, die bei 1 M NaCl-Konzentration im Agarmedium angezogen wurden, wiesen sowohl die höchste Aktivität von Enzymen der Zellatmung als auch die stärkste Aktivitätssteigerung während der Keimung unter submersen Bedingungen auf. Die Korrelation bestätigt somit eine Anwendbarkeit des MTT-Assays zur Bestimmung des Keimungspotentials bzw. der Viabilität von Sporen. Damit wurde eine schnelle Methode zur Überprüfung der Sporengüte eines Inokulums etabliert, welche als Kontrollverfahren vor dem Start industrieller Produktionsprozesse eingesetzt werden kann.

Biomassewachstum und Eduktumsetzung in submerser Kultivierung

Der Einfluss verschieden hergestellter Sporenproben auf die Produktivität bzw. Eduktumsetzung in anschließender submerser Kultivierung stellt den auf ökonomischer Basis interessantesten Aspekt innerhalb der Charakterisierung dar. Hier zeigt sich, inwieweit die in den vorherigen Abschnitten diskutierten Sporeneigenschaften als Güteindikator für hohe Edukttransformationen im Produktionsprozess herangezogen werden können. Als Applikationsprozess wurde dazu die Umsetzung der Steroid-Vorstufe Norandrostendion (Nor-AD) durch eine regioselektive Hydroxylierungsreaktion zu 11α -OH-Norandrostendion (Nor-OH-AD) herangezogen. Da der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Wildtypstamm von *A. ochraceus* bezüglich der Biotransformation keine geschlossene Edukt-Produkt-Bilanz aufweist, wird zur Beurteilung der gesamten Transformationsleistung der relative Eduktumsatz an Stelle der Produkt- und Nebenproduktbildung dargestellt. Die detaillierte Versuchsdurchführung zur Analyse des Biomassewachstums und der Biotransformationsleistung ist im Kapitel 3.7.5 beschrieben.

Das Wachstum und die Eduktumsetzung der unter variierender Osmolalität im Sporulationsmedium gebildeten Sporenproben in anschließender Submerskultivierung sind in Abbildung 4.26 dargestellt.

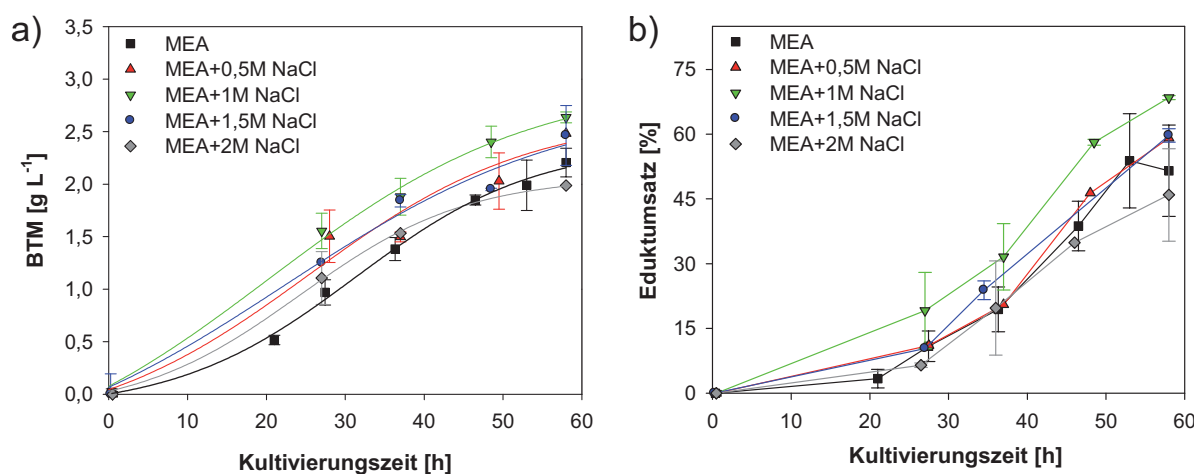


Abb. 4.26: (a) Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration und (b) relativer Eduktumsatz (2 g L^{-1} Edukt entspricht 100 %) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. Als Inokulum dienten Sporen, die für 8 Tage bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ in Dunkelheit, auf Medien mit verschiedenen Salzkonzentrationen angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, 130 min^{-1} , Dunkelheit).

Der zeitliche Verlauf des Biomassewachstums in Abbildung 4.26-a) lässt zunächst für die verschiedenen Ansätze eine vergleichbare Entwicklung erkennen. Dennoch können auch Unterschiede festgestellt werden, die auf spezifische Charakteristika der eingesetzten Seedingkulturen hinweisen. Insbesondere Sporen, die auf MEA-Medium mit 1 M NaCl angezogen wurden, zeigten in anschließender Submerskultivierung nach 30 h einen

stärkeren Anstieg des Wachstums, wobei maximale Biotrockenmasse (BTM)-Konzentrationen von $2,6 \text{ g L}^{-1}$ nach 58 h erreicht wurden. In Abbildung 4.26-b) ist die Eduktumsetzung der verschiedenen Versuchsansätze im Verlauf der Kultivierung dargestellt. Auch hier wiesen Sporen, die auf Medium mit 1 M NaCl angezogen wurden, bereits nach 30 h eine stärkere Edukttransformation und den höchsten Eduktumsatz von 70 % nach einer Kultivierungszeit von 58 h auf.

Abbildung 4.27 zeigt die Gegenüberstellung der maximalen spezifischen Eduktumsatzraten der verschiedenen Versuchsansätze. Obwohl die Varianz innerhalb der biologischen und technischen Replikate recht hoch ausfällt, ist insgesamt für den 1 M NaCl-Ansatz eine gesteigerte Eduktumsetzung durch die Biomasse zu verzeichnen. Im Vergleich zu den herkömmlichen, auf MEA-Standard-Medium produzierten Sporen wurde damit eine Steigerung der Eduktumsetzung von ca. 40 % erzielt.

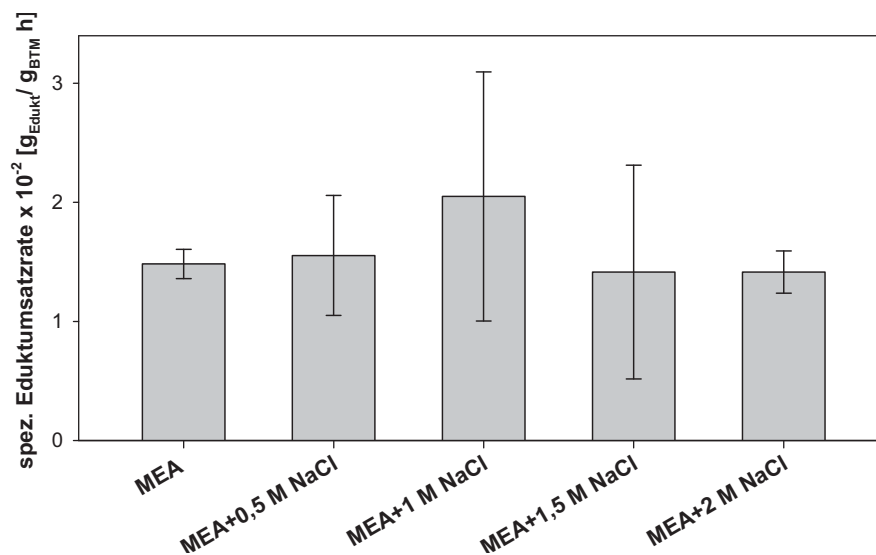


Abb. 4.27: Maximale spezifische Eduktumsatzraten. Als Inokulum dienten Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Medien mit verschiedenen Salzkonzentrationen angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, 24 °C, 130 min⁻¹, Dunkelheit).

Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen damit die bereits anhand der Viabilitätstests aufgestellte Hypothese, dass Sporen, die auf Agarmedium mit 1 M NaCl-Konzentration hergestellt wurden, aufgrund der Akkumulation kompatibler Solute in anschließender Submerskultivierung schneller zu aktiver Biomasse heranwachsen. Dieser Unterschied zeigte sich bereits in der Anfangsphase der Kultivierung, was auf ein verbessertes Keimungsverhalten der Sporen zurückzuführen ist.

4.3.2.2 Einfluss der Zusammensetzung von Komplexmedien

Saprophytische Pilze sind befähigt, auf einer Vielzahl organischer Substrate zu wachsen. Für einen effizienten und ökonomischen Produktionsprozess im industriellen Maßstab ist die Optimierung der Kultivierungsmedien jedoch von großer Relevanz, da sich die Zusammensetzung der Medien sowie der Zusatz bestimmter Nährstoffkomponenten maßgeblich auf die Ausbildung gewünschter Sporeneigenschaften auswirken kann. In Kapitel 4.3.1.5 wurde bereits festgestellt, dass die Quantität der Sporenbildung durch die Zusammensetzung komplexer Substrate im Sporulationsmedium beeinflusst wird. Im Folgenden wird der Effekt ausgewählter Komplexmedien zur Sporulation auf die Sporeneigenschaften und die Biotransformationsleistung in anschließender Submerskultivierung beschrieben.

Sporencharakteristika

In Abbildung 4.28 und 4.29 sind die mit Hilfe der etablierten Charakterisierungsverfahren identifizierten Sporeneigenschaften der verschiedenen Versuchsansätze gegenüber gestellt. Im direkten Vergleich des prozentualen Anteils membranintakter bzw. -defekter Sporen zeigt sich, dass Sporenssets vom MEA- und MEA-C-Medium deutlich weniger membrandefekte Sporen aufwiesen als vom MQWA-C-Medium (vgl. Abbildung 4.28-a).

Auch der Erythritol, Glycerol- und Mannitolgehalt in den Sporen wurde durch die Zusammensetzung des komplexen Sporulationsmediums beeinflusst (vgl. Abbildung 4.28-b). Während in Sporen vom MQWA-C-Medium kein Erythritol im quantifizierbaren Bereich sowie nur geringe Mannitolkonzentrationen bis 165 mg L^{-1} detektiert werden konnten, wiesen Sporen vom MEA-Standard-Medium einen um 40 % erhöhten Mannitolanteil und vom MEA-C-Medium sogar eine um 50 % erhöhte Mannitolakkumulation auf. Die verstärkte Polyolbildung und insbesondere der hohe Mannitolanteil in den Sporen der MEA-Medien verstärkt die Stresstoleranz und die Widerstandsfähigkeit der Sporen [Ruijter et al., 2004; Tereshina et al., 2004] und kann im Hinblick auf die Membranintegrität den geringeren Anteil defekter Sporen erklären.

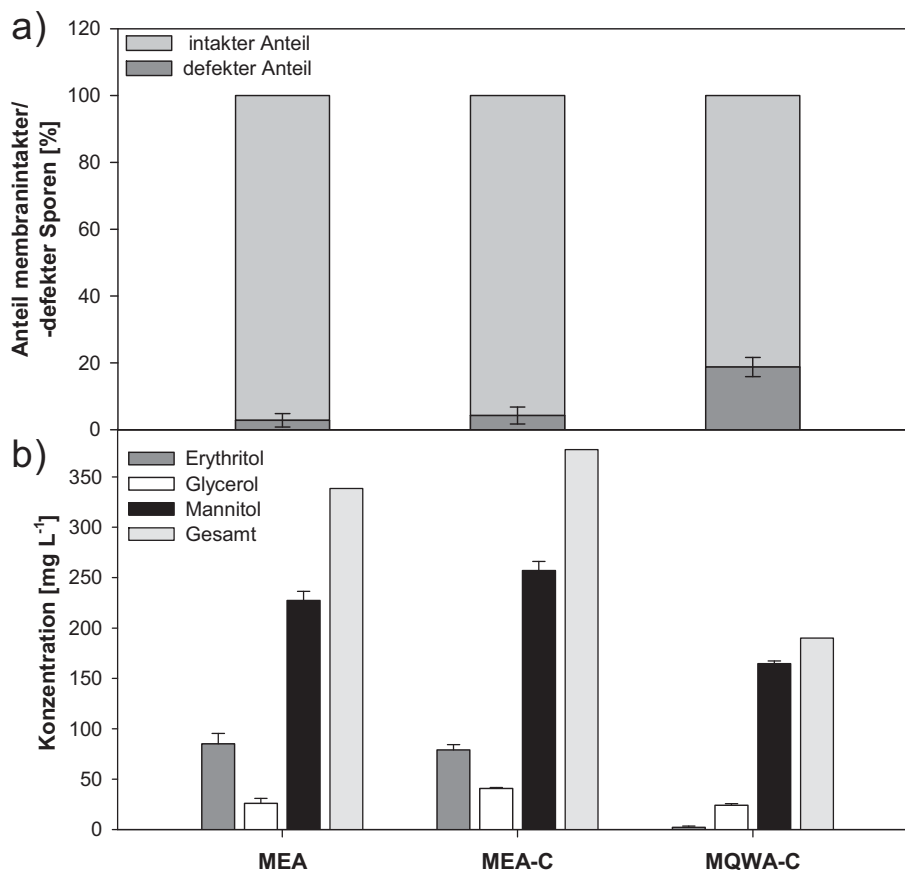


Abb. 4.28: Charakteristika von Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Komplexmedien variierender Zusammensetzung angezogen wurden, (a) mittels Lebend/Tot-Viabilitätstest bestimmter Anteil membranintakter/ -defekter Sporen, (b) intrazelluläre Konzentration von Erythritol, Glycerol und Mannitol sowie die Gesamtkonzentration dieser Polyole.

Bei Betrachtung der mittels FDA- und MTT-Assay bestimmten Zellaktivitäten in Abbildung 4.29 wird gleichermaßen deutlich, dass Sporenpopulationen der MEA-Medien wesentlich aktiver waren, als Sporen vom MQWA-C-Medium, was auf den geringeren Anteil defekter Sporen, als auch auf den höheren Gehalt intrazellulärer Polyole zurückgeführt werden kann. Zudem wiesen MEA-C-Sporen im Gegensatz zu MEA-Standard-Sporen sowohl eine höhere respiratorische als auch eine gesteigerte Biomasseaktivität in der Anfangsphase der submersen Kultivierung auf. Die Erhöhung des Kohlenhydratanteils im Sporulationsmedium scheint demnach nicht nur die Quantität der Sporenbildung, sondern auch deren Qualität zu verbessern.

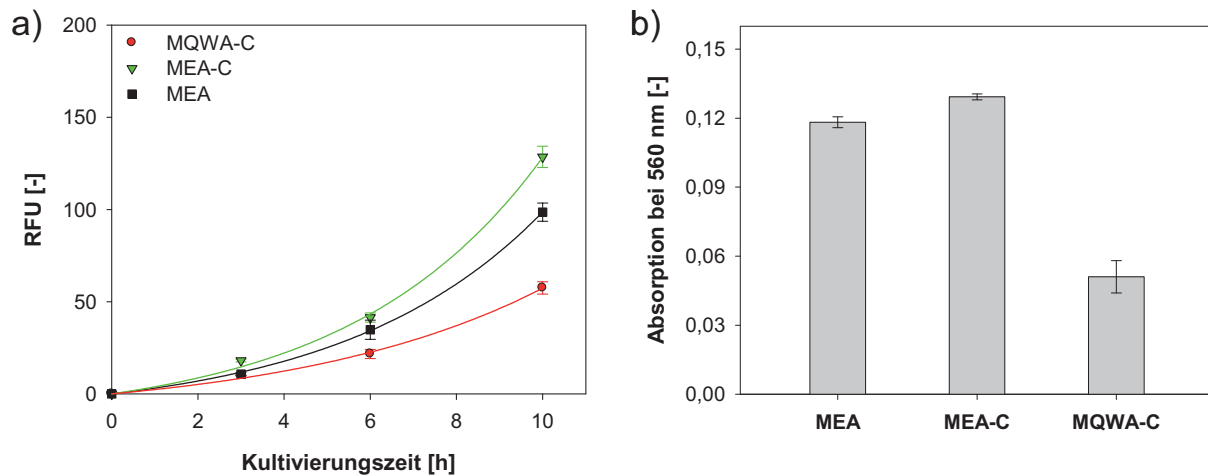


Abb. 4.29: Viabilität von Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit auf Komplexmedien variierender Zusammensetzung gebildet wurden, (a) im FDA-Assay ermittelte enzymatische Aktivität (dargestellt als RFU) keimender Sporen unter submersen Bedingungen, (b) im MTT-Assay bestimmte respiratorische Aktivität (dargestellt als Absorption bei 560 nm).

Biomassewachstum und Eduktumsetzung in submerser Kultivierung

Da Sporenpopulationen vom MEA-C-Medium einen geringen Anteil defekter Sporen aufwiesen, hohe Mannitolkonzentrationen enthielten und auch im FDA-Assay die schnellste Aktivitätssteigerung während der Keimungsphase zeigten, stellte sich die Frage, inwieweit diese Sporenansätze auch in anschließender Submerskultivierung die stärkste Biomassezunahme und die höchste Biotransformationsleistung aufzeigen.

Der zeitliche Verlauf des Wachstums sowie der Eduktumsetzung der verschiedenen hergestellten Seedingkulturen sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

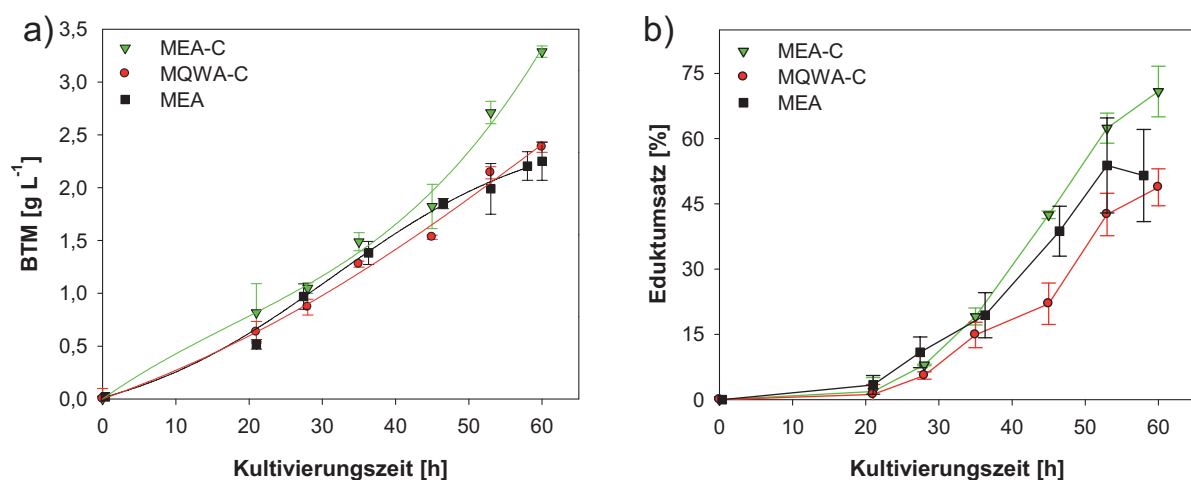


Abb. 4.30: (a) Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration und (b) relativer Eduktumsatz (2 g L⁻¹ Edukt entspricht 100 %) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. Als Inokulum dienen Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Komplexmedien variierender Zusammensetzung angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, 24 °C, 130 min⁻¹, Dunkelheit).

Die verschiedenen Versuchsansätze in Abbildung 4.30-a) lassen zunächst bis zu einer Kultivierungszeit von 40 h eine tendenziell ähnliche Entwicklung des Biomassewachstums erkennen. Ein Vorteil der MQWA-C-Sporen gegenüber MEA-Sporen aufgrund einer schnelleren Adaptation an das Kultivierungsmedium (MQW-Flüssigmedium) kann damit ausgeschlossen werden. Nach einer Kultivierungszeit von 40 h wurden im Versuchsansatz mit MEA-C-Sporen insgesamt deutlich höhere BTM-Konzentrationen bestimmt, wobei ein maximaler BTM-Wert von $3,3 \text{ g L}^{-1}$ zum Ende der Kultivierung erreicht wurde. Auch die Kultivierungsansätze, die mit MEA-Standard-Sporen bzw. MQWA-C-Sporen gestartet wurden, ließen während dieser Zeitspanne eine Steigerung der BTM erkennen, die jedoch nach 60 h um durchschnittlich 38 % geringer ausfiel als die der MEA-C-Sporen. Zudem deutete sich in diesen Versuchsansätzen nach 60-stündiger Kultivierung ein Übergang in die stationäre Phase an.

Eine Gegenüberstellung der Eduktumsetzung der verschiedenen Versuchsansätze über der Kultivierungszeit, ist in Abbildung 4.30-b) dargestellt. Auch hier zeigten Sporen, die auf MEA-C-Medium angezogen wurden, bereits nach etwa 45 h eine stärkere Transformation des Edukts. Nach einer Kultivierungszeit von 60 h wurden ausgehend von der MEA-Standard- bzw. MQWA-C-Seedingkultur nur ca. 50 % des Edukts umgesetzt. Im Gegensatz dazu konnte durch Sporen, die vom MEA-C-Agarmedium hervorgingen, ein Eduktumsatz von 72 % erreicht werden, womit eine Steigerung der Eduktumsetzung um 44 % erzielt wurde. Der Vergleich der maximalen spezifischen Eduktumsatzraten (vgl. Abbildung 4.31) lässt dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen erkennen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verstärkte Biotransformation aufgrund der gesteigerten Zunahme an aktiver Biomasse erfolgte.

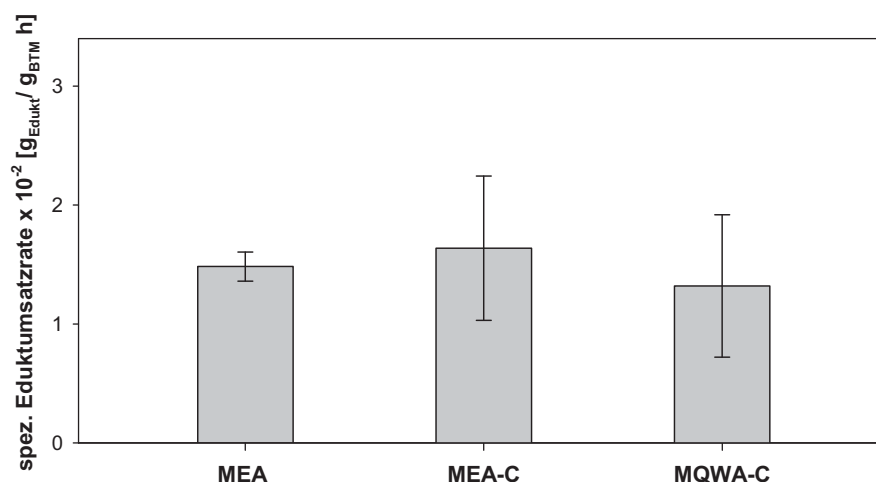


Abb. 4.31: Maximale spezifische Eduktumsatzraten. Als Inokulum dienten Sporen, die für 8 Tage bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ in Dunkelheit, auf Komplexmedien variierender Zusammensetzung angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, 130 min^{-1} , Dunkelheit).

4.3.2.3 Einfluss der Kohlenstoff- und Stickstoffquellen im Minimalmedium

Der Einfluss verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, Aminosäuren und Spurenelemente auf die Sporenbildung und Eigenschaften der gebildeten Sporen wurde in der Literatur bereits für verschiedene Organismen beschrieben [Chen et al., 2005; Engelkes et al., 1997; González et al., 2008; Han et al., 2003; Mazas et al., 2009; Ooijkaas et al., 1999]. Da der Forschungsschwerpunkt der Autoren sowohl hinsichtlich des untersuchten Stammes als auch in der Optimierungsgröße (z. B. vegetatives Wachstum, Sporenbildung, Gefriertrocknungsstabilität) variiert, können keine allgemeingültigen Aussagen über optimale Nährstoffkomponenten für die Anzucht von Sporen hoher Qualität getroffen werden.

Zur Identifizierung optimaler Nährstoffbedingungen von *A. ochraceus* zur Bildung maximaler Sporenkonzentrationen mit hoher Sporengüte, wurden im Rahmen der Arbeit Versuche auf Minimalmedium durchgeführt, welches (a) jeweils unterschiedliche Kohlenstoffquellen bei konstanter Stickstoffquelle (Natriumnitrat) und (b) verschiedene Stickstoffquellen bei konstanter Kohlenstoffquelle (Glucose) enthielt.

(a) Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen

Sporencharakteristika

In Abbildung 4.32 sind die Eigenschaften der auf Minimalmedium mit variierender Kohlenstoffquelle angezogenen Sporen dargestellt.

Beim Vergleich des prozentualen Anteils membranintakter bzw. -defekter Sporen fällt auf, dass Sporenpopulationen vom Galactose- und Glucose-Medium einen deutlich höheren Anteil membrandefekter Sporen aufwiesen (vgl. Abbildung 4.32-a). Werden bei dieser Betrachtung die Ergebnisse der Polyolbestimmung (vgl. Abbildung 4.32-b) in die Auswertung mit einbezogen, zeigt sich, dass Sporen, die auf Galactose- oder Glucose-Medien angezogen wurden, nur sehr geringe Konzentrationen an Erythritol und etwa 130 mg L^{-1} Mannitol enthielten. Im Gegensatz dazu wiesen Sporen vom Sucrose- bzw. Glycerol-haltigen Agarmedium eine durchschnittlich fünffach höhere Erythritolkonzentration und einen um 80 % gesteigerten Mannitolgehalt auf.

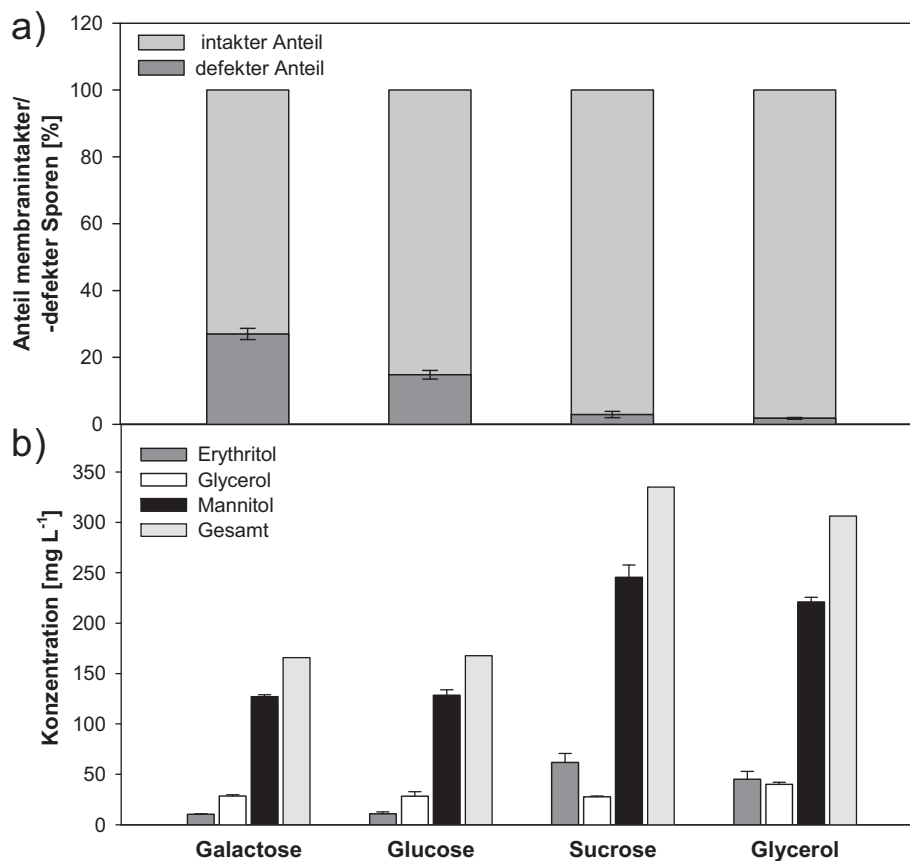


Abb. 4.32: Charakteristika von Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit auf Minimalmedien mit variierender Kohlenstoffquelle angezogen wurden. Als Stickstoffquelle wurde NaNO_3 eingesetzt und ein C:N-Verhältnis von 8:1 eingestellt. (a) mittels Lebend/Tot-Viabilitätstest bestimmter Anteil membranintakter/-defekter Sporen, (b) intrazelluläre Konzentration von Erythritol, Glycerol und Mannitol sowie die Gesamtkonzentration dieser Polyole.

Die hohe Mannitolkonzentration der auf Sucrose-Medium angezogenen Sporen lässt sich durch folgenden Sachverhalt erklären. Nach intrazellulärer Hydrolyse von Sucrose zu Fructose und Glucose werden beide Kohlenhydrate primär zur Energiegewinnung in die Glykolyse eingeschleust. Desweiteren kommt dem Monosaccharid Fructose eine Bedeutung als Zentralmetabolit im Mannitolkreislauf zu, da Mannitol unter anderem aus Fructose bzw. Fructose-6-Phosphat synthetisiert wird [Dijksterhuis et al., 2004; Niehaus et al., 1989; Ruijter et al., 2003]. Steht dem Organismus Sucrose in ausreichender Menge als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, können demzufolge auch entsprechend hohe Konzentrationen an Fructose für den Mannitolstoffwechsel bereitgestellt werden, so dass diese Sporenpopulation schließlich eine gesteigerte intrazelluläre Mannitolkonzentration aufweist. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 4.33 der Mannitolmetabolismus von *A. niger*, basierend auf Untersuchungen von Ruijter et al. (2003) schematisch dargestellt.

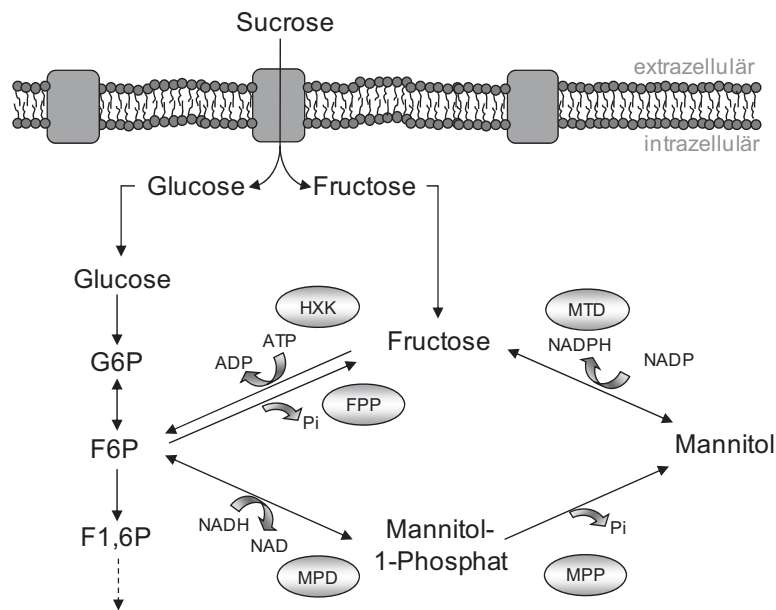


Abb. 4.33: Mannitolmetabolismus in *A. niger* (FPP: Fructose-6-Phosphat-Phosphatase, F6P: Fructose-6-Phosphat, F1,6P: Fructose-1,6-bis-Phosphat, G6P: Glucose-6-Phosphat, HXK: Hexokinase, MPD: Mannitol-Phosphat-Dehydrogenase, MPP: Mannitol-Phosphat-Phosphatase, MTD: Mannitol-Dehydrogenase) [Ruijter et al., 2003].

Der hohe Mannitolanteil in Sporen vom Glycerol-Medium könnte damit erklärt werden, dass die Bildung von Mannitol über die Einschleusung des Glycerol-Intermediats Dihydroxyaceton, in die Gluconeogenese erfolgt. Da es sich hierbei jedoch um einen für den Pilz energetisch ungünstigen Prozess handelt, resultiert die starke Mannitolakkumulation in den Sporen vermutlich zusätzlich aus der geringeren Wasseraktivität des Mediums durch den Glycerolzusatz und dem sich daraus ergebenden erhöhten osmotischen Stress während der Sporulation. Im Gegensatz dazu scheint bei Vorliegen von Galactose und Glucose im Sporulationsmedium der metabolische Stoffwechselweg zur Mannitolsynthese im geringeren Maße durchlaufen zu werden, woraus vergleichsweise niedrige Mannitolkonzentrationen in den Sporen resultierten.

Eine Gegenüberstellung der mittels FDA- und MTT-Assay bestimmten Aktivitäten ist in Abbildung 4.34 dargestellt. Beim Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze wird deutlich, dass Sporen vom Glycerol- und vor allem Sucrose-Medium hohe Aktivitäten aufwiesen, was auch hier auf den geringeren Anteil defekter Sporen und die gesteigerte Akkumulation von Mannitol zurückgeführt werden kann. Im FDA-Assay (vgl. Abbildung 4.34-a) konnten bereits nach 6 h submerser Kultivierung große Unterschiede zwischen den enzymatischen Aktivitäten der verschiedenen Ansätze beobachtet werden. Während für Sporenpopulationen vom Galactose- bzw. Glucose-haltigem Agarmedium zu diesem Zeitpunkt eine schwache bis mäßige Aktivitätssteigerung zu verzeichnen war, konnte für

Sporen vom Glycerol- und Sucrose-Medium bereits eine deutlich höhere Aktivität im Keimungsverhalten detektiert werden. Die stärkste Aktivitätssteigerung wurde nach einer Kultivierungszeit von 10 h für die Sporenpopulation vom Sucrose-Agarmedium festgestellt.

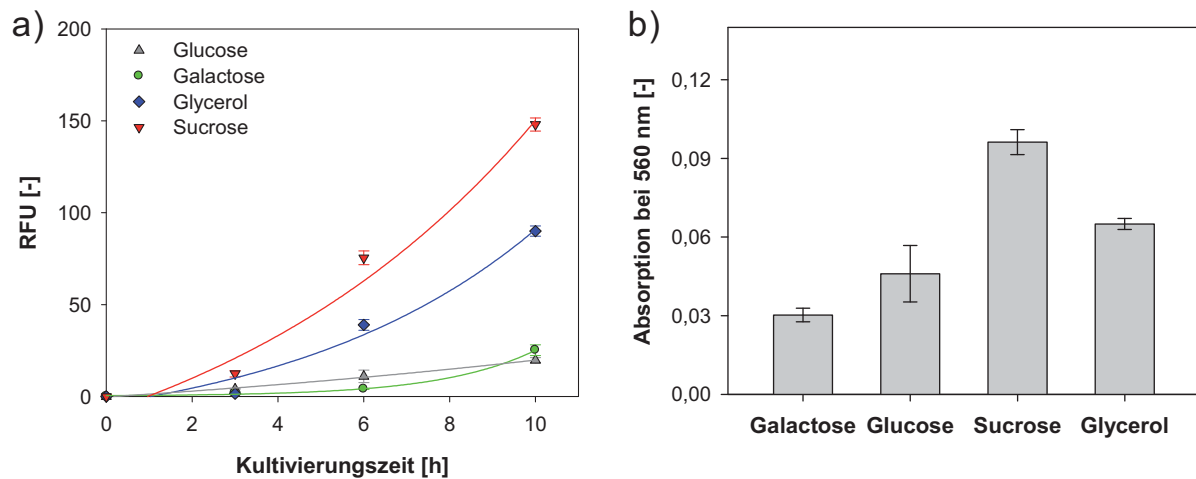


Abb. 4.34: Viabilität von Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Minimalmedien variierender Kohlenstoffquelle gebildet wurden, (a) im FDA-Assay ermittelte enzymatische Aktivität (dargestellt als RFU) keimender Sporen unter submersen Bedingungen, (b) im MTT-Assay bestimmte respiratorische Aktivität (dargestellt als Absorption bei 560 nm).

Insgesamt können den Sporenproben vom Glycerol- und Sucrose-Medium aufgrund des geringeren Anteils membrandefekter Sporen und dem hohen Mannitolgehalt höhere Sporengüten zugeschrieben werden. Zudem wiesen diese Sporensätze im MTT-Assay die höchste Sporenvitalität sowie im FDA-Assay die schnellste Aktivitätssteigerung während der Keimungsphase auf. Im Folgenden galt es zu klären, inwieweit eine Korrelation der identifizierten Sporenqualitäten zum Wachstum und der Biotransformationsleistung in anschließender Kultivierung besteht.

Biomassewachstum und Eduktumsetzung in submerser Kultivierung

In Abbildung 4.35 ist der zeitliche Verlauf des Biomassewachstums sowie der Eduktumsetzung der verschieden hergestellten Seedingkulturen in der Submerskultivierung dargestellt.

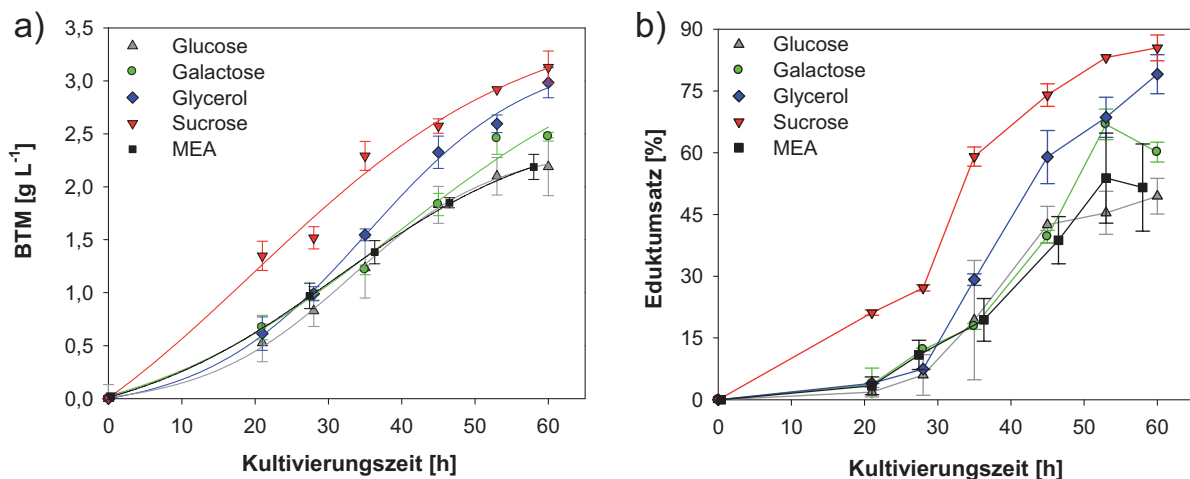


Abb. 4.35: (a) Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration und (b) relativer Eduktumsatz (2 g L^{-1} Edukt entspricht 100 %) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. Als Inokulum dienten Sporen, die für 8 Tage bei $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ in Dunkelheit, auf Minimalmedien mit variierender Kohlenstoffquelle angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 130 min^{-1} , Dunkelheit).

Für die Sporenpopulationen vom Glucose-, Galactose-, Glycerol- bzw. MEA-Standard-Medium lässt sich bis zu einer Kultivierungszeit von etwa 30 h ein tendenziell ähnlicher Verlauf mit einer relativ geringen Biomassebildung (Abbildung 4.35-a) und Eduktumsetzung (Abbildung 4.35-b) erkennen. Nach 35 h können jedoch signifikante Unterschiede festgestellt werden. So wurde für den Versuchsansatz mit Sporen vom Glycerol-Medium im folgenden Kultivierungsverlauf eine verstärkte Wachstumsrate detektiert, was zeitgleich von einem Anstieg des Eduktumsatzes begleitet wurde. Zum Ende der Kultivierung wurden ausgehend von dieser Sporenpopulation nahezu 75 % des Edukts umgesetzt. Im Gegensatz dazu war in den Kultivierungsansätzen mit Sporen vom Glucose-, Galactose- und MEA-Medium auch nach 60 h ein geringerer Eduktumsatz von 50 bis 60 % zu verzeichnen. Wie erwartet, wiesen Sporen vom Sucrose-Medium bereits nach einer Kultivierungsdauer von 20 h die höchste BTM-Konzentration und Eduktumsatzrate auf. Dieser Trend setzte sich bis zum Ende der Kultivierung fort, wobei nach 60 h ein maximaler BTM-Wert von etwa 3 g L^{-1} und ein relativer Eduktumsatz von 85 % erzielt wurden. Weiterhin ist durch die Gegenüberstellung der maximalen spezifischen Eduktumsatzraten für diesen Versuchsansatz eine gesteigerte Eduktumsetzung durch die Biomasse festzustellen (Abbildung 4.36). Im Vergleich zu den auf MEA-Standard-Medium angezogenen Sporen wurde damit eine Steigerung der Edukttransformation um 70 % erzielt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den zuvor identifizierten Sporenqualitäten der verschiedenen Sporenpopulationen.

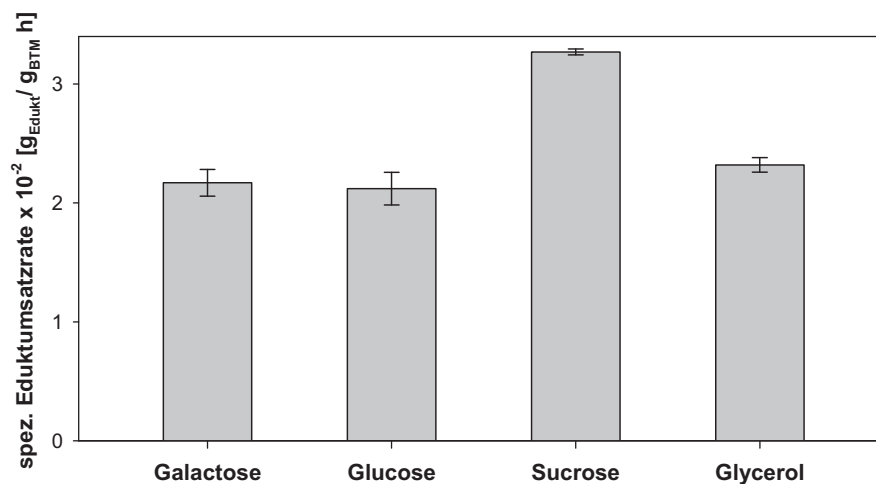


Abb. 4.36: Maximale spezifische Eduktsatzraten. Als Inokulum dienten Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Minimalmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, 24 °C, 130 min⁻¹, Dunkelheit).

(b) Einfluss verschiedener Stickstoffquellen

Sporencharakteristika

In Abbildung 4.37 sind die Charakteristika der auf Minimalmedium mit variierender Stickstoffquelle angezogenen Sporen dargestellt. Im direkten Vergleich des prozentualen Anteils membranintakter bzw. -defekter Sporen wird deutlich, dass Sporen, die auf Agarmedien mit anorganischer Stickstoffquelle (Kalium- und Natriumnitrat) gebildet wurden, höhere Anteile membrandefekter Sporen aufwiesen, als die auf organischen Stickstoffverbindungen (α -Aminobuttersäure und Harnstoff) angezogenen Sporen (Abbildung 4.37-a).

Auch der Polyolgehalt in den Sporen wurde durch die verschiedenen Medienkomponenten beeinflusst (Abbildung 4.37-b). Für Sporen vom Kalium- und Natriumnitrat-Medium wurde eine deutlich geringere intrazelluläre Gesamtpolyol-Konzentration von etwa 170 mg L⁻¹ detektiert. Dagegen wiesen Sporen vom α -Aminobuttersäure- bzw. Harnstoff-haltigem Sporulationsmedium relativ hohe Polyolkonzentrationen von 280 mg L⁻¹ und insbesondere einen gesteigerten Mannitolgehalt von durchschnittlich 200 mg L⁻¹ auf. Die schlechte Viabilität der Sporenpopulationen vom Kalium- bzw. Natriumnitrat-Medium ist damit vermutlich auf den niedrigen Mannitolgehalt zurückzuführen, woraus die verminderte Stabilität der Sporen und die geringere Stresstoleranz resultierten.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich die Art der Stickstoffquelle auf die Konzentration an Mannitol in den Sporen auswirkt. Bereits in früheren Forschungsarbeiten wurde festgestellt, dass die Synthese von Enzymen des Mannitolstoffwechsels durch

spezielle Stickstoffquellen im Medium induziert wird. In diesem Zusammenhang wurde bei Wachstum auf Harnstoff eine höhere Mannitol-Dehydrogenase-Aktivität detektiert, als bei Wachstum auf Nitrat-haltigen Stickstoffquellen [Niehaus et al., 1989].

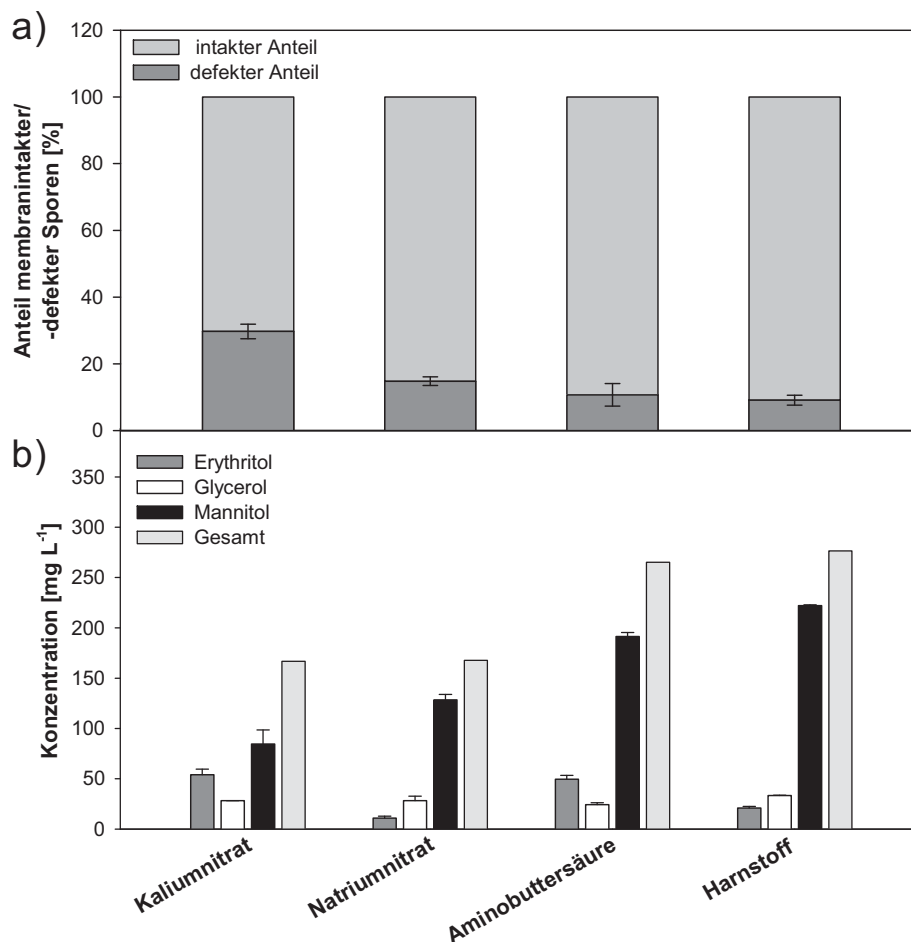


Abb. 4.37: Charakteristika von Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Minimalmedien mit variierender Stickstoffquelle angezogen wurden. Als Kohlenstoffquelle wurde Glucose mit einem C-Anteil von 4 g L⁻¹ eingesetzt. (a) mittels Lebend/Tot-Viabilitätstest bestimmter Anteil membranintakter/-defekter Sporen, (b) intrazelluläre Konzentration von Erythritol, Glycerol und Mannitol sowie die Gesamtkonzentration dieser Polyole.

Zur weiteren Charakterisierung der unterschiedlich hergestellten Sporensätze wurden diese mittels FDA- und MTT-Assay auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht (Abbildung 4.38). Anhand der Ergebnisse wird ebenfalls ein direkter Zusammenhang zwischen der im Sporulationsmedium verwendeten Stickstoffquelle und den Eigenschaften der darauf gebildeten Sporen deutlich. Dabei waren für die Sporen, die auf organischen Stickstoffquellen (α -Aminobuttersäure und Harnstoff) angezogen wurden, wesentlich höhere Viabilitäten zu verzeichnen, was einerseits auf den geringeren Anteil defekter Sporen und andererseits auf den höheren intrazellulären Mannitolgehalt zurückzuführen ist. Die höchsten

Zellviabilitäten wurden schlussendlich für die auf dem Harnstoff-Medium angezogenen Sporen detektiert.

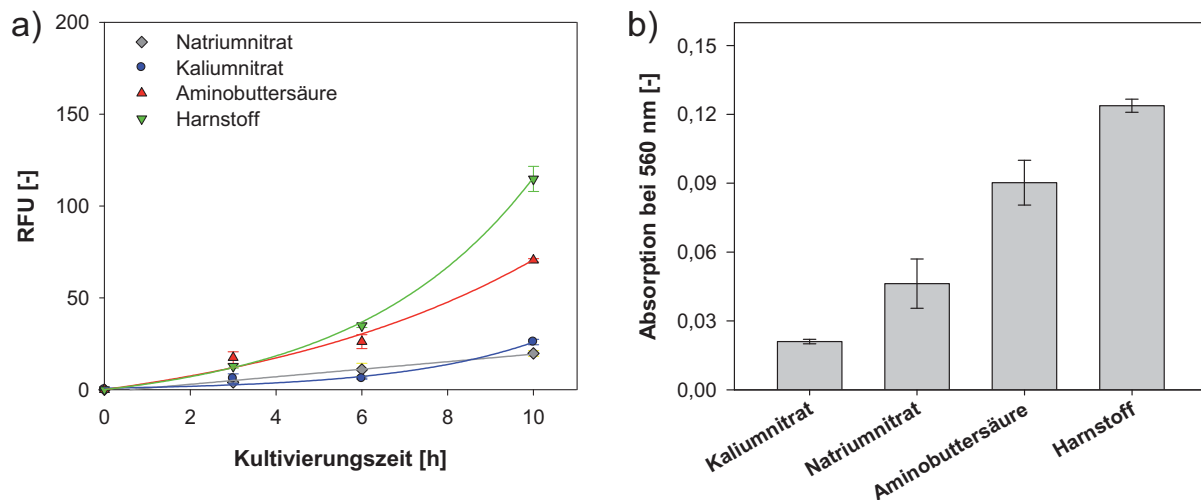


Abb. 4.38: Viabilität von Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Minimalmedien mit variierender Stickstoffquelle gebildet wurden, (a) im FDA-Assay ermittelte enzymatische Aktivität (dargestellt als RFU) keimender Sporen unter submersen Bedingungen, (b) im MTT-Assay bestimmte respiratorische Aktivität (dargestellt als Absorption bei 560 nm).

Biomassewachstum und Eduktumsetzung in submerser Kultivierung

Die Entwicklung des Biomassewachstums sowie der Eduktumsetzung der unter variierender Stickstoffquelle angezogenen Sporenpopulationen sind in Abbildung 4.39 dargestellt.

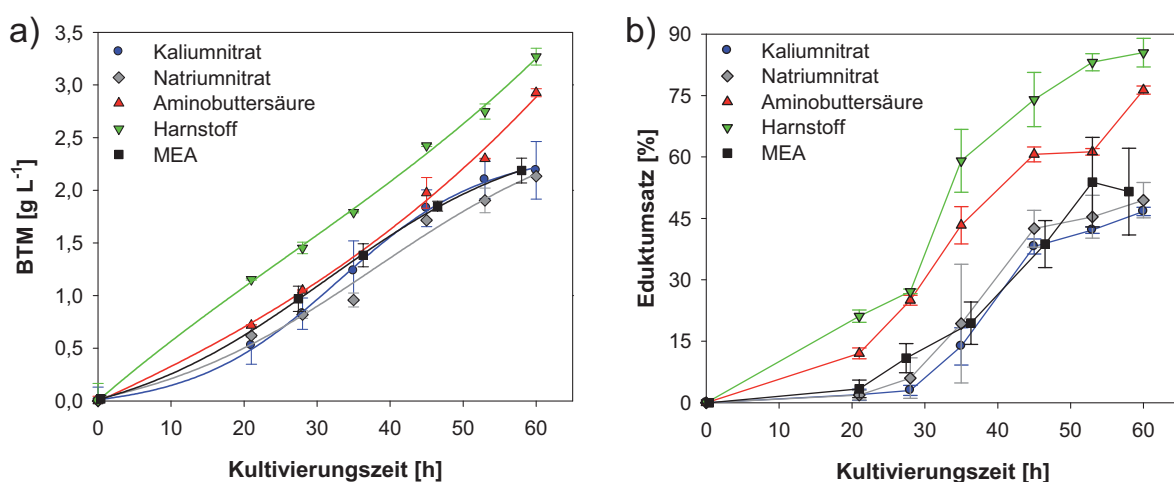


Abb. 4.39: (a) Biotrockenmasse (BTM)-Konzentration und (b) relativer Eduktsatz (2 g L^{-1} Edukt entspricht 100 %) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. Als Inokulum dienten Sporen, die für 8 Tage bei 24 °C in Dunkelheit, auf Minimalmedium mit variierender Stickstoffquelle angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, 24 °C, 130 min^{-1} , Dunkelheit).

Die Kurvenverläufe der verschiedenen Versuchsansätze bestätigen die im vorherigen Abschnitt dokumentierten Ergebnisse der Viabilitätstests. Bereits nach einer Kultivierungszeit von 20 h wurde mit den Sporen vom Harnstoff-Medium eine deutlich höhere BTM-Konzentration erreicht, wobei ein maximaler Wert von $3,3 \text{ g L}^{-1}$ nach 60 h zu verzeichnen war (Abbildung 4.39-a). Auch die Kultivierungsansätze, die mit Sporen vom Kalium- und Natriumnitrat-Medium bzw. mit den MEA-Standard-Sporen inokuliert wurden, ließen während dieser Zeitspanne eine Steigerung der BTM erkennen, diese fiel jedoch nach 60 h, im Vergleich zum Ansatz mit Sporen vom Harnstoff-haltigen Medium, um durchschnittlich 33 % geringer aus. Zudem deutete sich in diesen Versuchsansätzen bereits nach etwa 50 h ein Übergang in die stationäre Phase an. Lediglich die Seedingkulturen, die auf Agarmedium mit α -Aminobuttersäure als Stickstoffquelle angezogen wurden, wiesen analog der Sporen vom Harnstoff-Medium weiterhin exponentielles Wachstum auf.

Die während der Kultivierung umgesetzten Eduktskonzentrationen in Abbildung 4.39-b) lassen eine ähnliche Tendenz erkennen, wie die Ergebnisse des Biomassewachstums. Auch hier resultierten aus Seedingkulturen vom Harnstoff- bzw. α -Aminobuttersäure-Medium bereits nach 30 h Kultivierung deutlich höhere Eduktsätze. Während die Sporenpopulationen vom Kalium- und Natriumnitrat-Medium bzw. vom MEA-Standard-Medium zum Ende der Kultivierung einen relativen Eduktsatz von durchschnittlich 50 % erreichten, konnte mit den Sporen vom α -Aminobuttersäure- bzw. Harnstoff-Medium eine um 50 bzw. 60 % gesteigerte Eduktsatztransformation erzielt werden. Der Vergleich der maximalen spezifischen Eduktsatzraten lässt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen erkennen (Abbildung 4.40), so dass die verstärkte Biotransformation auf die gesteigerte Zunahme an aktiver Biomasse zurückzuführen ist.

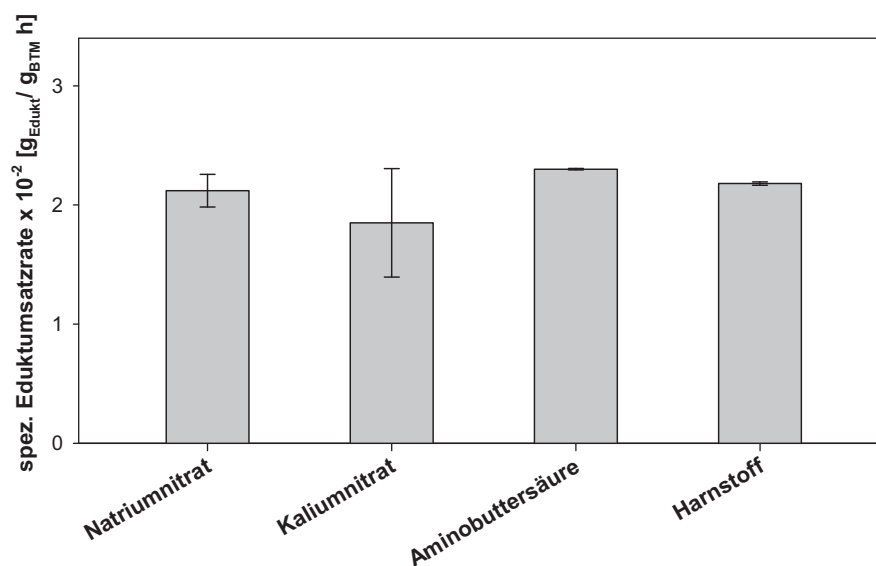


Abb. 4.40: Maximale spezifische Eduktsatzraten. Als Inokulum dienten Sporen, die für 8 Tage bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ in Dunkelheit, auf Minimalmedien mit verschiedenen Stickstoffquellen angezogen wurden (Kultivierungsparameter: MQW-Medium, pH 5,5, $24 \text{ }^\circ\text{C}$, 130 min^{-1} , Dunkelheit).

4.4 Vergleichende Bewertung der Methoden zur Charakterisierung von Seedingkulturen

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Erfassung der Sporengüte und -aktivität untersucht und schließlich vier Methoden zur Bestimmung der Qualität von Seedingkulturen zur Anwendung gebracht.

Der MTT-Assay erlaubt durch Ermittlung der respiratorischen Aktivität einer Sporensuspension Rückschlüsse auf deren Anteil lebender Sporen. Dieser Test ist mit einer Durchführungsdauer von nur etwa einer Stunde mit geringem Zeitaufwand verbunden und stellt damit eine einfache und schnelle Methode zur Überprüfung der Sporengüte eines Inokulums dar, welche als Kontrollverfahren vor dem Start industrieller Produktionsprozesse eingesetzt werden kann.

Mit dem FDA-Assay ist es möglich, innerhalb der ersten 10 Stunden einer Submerskultivierung die Aktivität keimender Sporen zu bestimmen. Da durch herkömmliche Analysemethoden zu diesem Zeitpunkt aufgrund einer zu geringen Biomassezunahme und Produktivität keine Aussagen über den nachfolgenden Kultivierungsverlauf möglich sind, stellt der FDA-Assay eine gute Methode dar, um bereits zu Beginn der Kultivierung Erkenntnisse über den Zustand der Vorkultur zu erhalten und damit auch die weitere Kultivierung abzuschätzen. Dadurch steht nunmehr ein Routineverfahren zur frühzeitigen Kontrolle eines Kultivierungsprozesses zur Verfügung.

Mit der weiteren Charakterisierungsmethode des Lebend/Tot-Viabilitätstests ist es zukünftig möglich, die Inokulumzusammensetzung bezüglich membranintakter und -defekter Sporen in wenigen Minuten zu erfassen und damit ebenfalls im Vorfeld der Kultivierung Auskunft über die Güte der Seedingkultur zu erhalten. Zur Durchführung dieser Methode muss ein Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM) mit entsprechender Expertise vorhanden sein.

Als weiterer Qualitätsindikator von Seedingkulturen kann der Polyol- und vor allem der Mannitolgehalt der Sporen herangezogen und mit dem Keimungspotential korreliert werden. Sowohl die Extraktion der Polyole aus den Sporen als auch deren chromatographische Quantifizierung ist mit geringem Zeitaufwand verbunden und innerhalb eines Arbeitstages möglich.

Durch die kombinierte Anwendung der in dieser Arbeit etablierten Methoden auf unterschiedlich hergestellte Seedingkulturen wurden die verschiedenen Qualitätsindikatoren parallel analysiert und verifiziert. Dabei konnte eine Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden untereinander sowie mit dem Wachstumsverhalten und der Biotransformationsleistung in anschließender Submerskultivierung festgestellt werden, womit die Anwendbarkeit dieser Verfahren zur Erfassung der Sporengüte bestätigt wurde. Im Hinblick auf den industriellen Prozess kann die Bestimmung der Aktivität einer Seedingkultur zukünftig durch Einsatz aller oder durch Verwendung einer Auswahl der vorgestellten Methoden in Abhängigkeit von der vorliegenden Laborausstattung sowie der

personellen Kapazität im Produktionsbetrieb erfolgen. Der Großteil der Methoden ist von der Handhabbarkeit her unter den Bedingungen eines industriellen Produktionsbetriebs im Schnelltest durchführbar. Damit steht ein sehr gut abgesichertes Methodenrepertoire zur Verfügung, um die Sporengüte und -aktivität in Seedingkulturen zu charakterisieren.

Über die Etablierung der Charakterisierungsmethoden ist es nun möglich, Vorhersagen über den Verlauf der Kultivierung zu erhalten bzw. Seedingkulturen niedriger Güte vom Kultivierungsprozess auszuschließen und Fehlkultivierungen zu verhindern. Des Weiteren können anhand der gefundenen Qualitätsindikatoren optimale Parameter zur Sporenbildung und -lagerung aufgedeckt und zukünftig Seedingkulturen hoher Güte hergestellt werden.

Schlussendlich können im Rahmen einer ganzheitlichen Untersuchung submerser Kultivierungsprozesse erstmals spezifische Kultivierungsergebnisse den einwirkenden Kultivierungsparametern oder den Seedingkultur-Eigenschaften zugeordnet werden.



5 Zusammenfassung und Ausblick

In Produktionsprozessen mit filamentösen Pilzen werden häufig Sporen als Starterkulturen, sogenannte Seedingkulturen, für submerse Kultivierungen verwendet. Dabei ist es essentiell, spezifische Charakteristika der im Inokulum enthaltenen Sporen zu kennen, da diese den Erfolg und die Reproduzierbarkeit der Kultivierung beeinflussen können. Aufgrund fehlender adäquater Untersuchungsmethoden war es jedoch bisher nicht möglich, spezifische Eigenschaften von Sporen im Inokulum zu erfassen, die bereits im Vorfeld der Kultivierung deren Erfolg oder Misserfolg indizieren. Im Vordergrund der Arbeit stand daher die Etablierung von Verfahren zur Charakterisierung und Qualitätsbestimmung von Sporen in Seedingkulturen. Als Modellorganismus wurde dazu der filamentöse Pilz *Aspergillus ochraceus* verwendet. Das schlussendliche Ziel der Untersuchung bestand darin, durch die entwickelten Methoden optimale Bedingungen für eine reproduzierbare, maximale Sporenbildung mit hoher Sporenqualität hinsichtlich des Wachstums und der Eduktumsetzung im anschließenden submersen Kultivierungsprozess zu identifizieren.

Zur Bearbeitung dieser Aufgabenfelder erfolgte für die Herstellung der zu untersuchenden Sporensuspensionen zunächst die Entwicklung eines standardisierten Sporenanzucht- und Sporenernteverfahrens. Es wurde festgestellt, dass die Sporenanzucht im Kolben und das Abernten mit 15 g Glaskugeln (\varnothing 5 mm) pro 130 cm² Erntefläche, bei einer Schütteldauer von 20 min und Schüttelfrequenz von 100 min⁻¹ eine Vereinfachung der Sporenernte im Vergleich zur bislang in der betrieblichen Praxis angewandten Spatelmethode darstellt und gleichzeitig eine Steigerung der Sporenausbeute ermöglicht.

Weiterhin wurden für die Qualitätsbestimmung der Sporen von *A. ochraceus* verschiedene Charakterisierungsverfahren zur Anwendung gebracht. Der auf Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie basierende LIVE/DEAD[®] Viability-Assay, bestehend aus den Farbstoffen SYTO 9 Green und Propidiumiodid, erlaubt eine Unterscheidung lebender und defekter Sporen anhand ihrer Membranintegrität. Nach Bestimmung optimaler Parameter zur Versuchsdurchführung, wurde eine Korrelation zum Keimungspotential der Sporen in einem für diese Untersuchung entwickelten Mikroreaktor sowie zum Biomassewachstum unter submersen Bedingungen im Schüttelkolben erhalten. Mit Hilfe dieser Methode ist es nunmehr möglich, eine schnelle Bestimmung der Inokulumzusammensetzung hinsichtlich membranintakter, keimfähiger Sporen vorzunehmen und im Vorfeld der Kultivierung Erkenntnisse über die Viabilität der Seedingkultur zu erhalten. Darüber hinaus wurde zur Bestimmung der Biomasseaktivität unter submersen Bedingungen ein Viabilitätstest auf Grundlage eines Fluorescein-Diacetat (FDA)-Assays etabliert. Das Prinzip des Tests basiert auf der hydrolytischen Spaltung von FDA zu Fluorescein durch zelleigene Esterasen und Lipasen. Zukünftig können dadurch in der frühen Wachstumsphase, in der aufgrund einer zu geringen Biomassezunahme und Produktivität über herkömmliche Analysemethoden keine

eindeutigen Aussagen über den Verlauf einer Kultivierung möglich sind, Erkenntnisse über den Zustand der Vorkultur erhalten und der weitere Kultivierungsverlauf abgeschätzt werden. Weiterhin konnte ein Protokoll zur Detektion der respiratorischen Aktivität von Sporensuspensionen unter Einsatz des Tetrazoliumsalzes MTT etabliert werden, wodurch nunmehr Rückschlüsse auf den Anteil lebender, aktiver Sporen in Seedingkulturen gezogen werden können. Zusätzlich wurde festgestellt, dass der intrazelluläre Polyol- und vor allem der Mannitolgehalt der Sporen im Zusammenhang mit dem Keimungspotential einer Sporenpopulation steht und damit als Qualitätsindikator von Seedingkulturen herangezogen werden kann. Nach Anwendung der entwickelten Methoden und Qualitätsindikatoren auf unterschiedlich hergestellte Sporenproben wurde eine Korrelation der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsverfahren untereinander sowie mit dem Wachstumsverhalten und der Biotransformationsleistung in Submerskultivierung festgestellt. Die Methoden sind von der Handhabbarkeit her unter den Bedingungen eines Produktionsbetriebs als Schnelltest durchführbar. Damit steht ein sehr gut abgesichertes Methodenportfolio zur Verfügung, um die Sporengüte und -aktivität in Seedingkulturen zu charakterisieren.

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden wurden zur Identifizierung optimaler Sporulationsparameter für maximale Sporenausbeuten mit hoher Sporenvitalität eingesetzt. Es zeigte sich, dass neben dem Temperaturoptimum des Sporulationsprozesses zwischen 24 und 26 °C, eine Mindestinkubationsdauer von acht Tagen zum Erreichen maximaler Sporenkonzentrationen notwendig ist. Ferner wurde der Einfluss verschiedener Lichtverhältnisse auf den Sporulationsprozess analysiert, wobei die Inkubation in Dunkelheit die höchste Sporenproduktion ohne zusätzlichen technischen Aufwand ermöglichte. Die Einstellung der Inokulumkonzentration zum Beimpfen des Festmediums stellt ebenfalls einen wichtigen Aspekt für eine reproduzierbare Sporenerzeugung dar. Um in kurzer Zeit maximale Sporenausbeuten zu erhalten, sollten demnach Inokulumdichten von 10 bis 100 Sporen mm⁻² eingestellt werden.

Weiterhin resultierten aus einer erhöhten Osmolarität im Sporulationsmedium deutliche Unterschiede sowohl in der Quantität der Sporenbildung als auch in den Eigenschaften der unter diesen Bedingungen gebildeten Sporen. Dabei wurde durch Zusatz von 0,5 bis 1 M NaCl zum Sporulationsmedium eine schnellere und gesteigerte Sporenbildung induziert. Zudem konnte mittels MTT- und FDA-Assay gleichermaßen festgestellt werden, dass Sporen, die bei 1 M NaCl-Konzentration im Agarmedium angezogen wurden, sowohl die höchste respiratorische Aktivität als auch das stärkste Keimungspotential unter submersen Bedingungen aufweisen, was auf die erhöhte Akkumulation kompatibler Solute zurückzuführen ist. Dieser Trend wurde auch im anschließenden submersen Kultivierungsprozess beobachtet, wobei diese Sporenpopulationen gegenüber Seedingkulturen vom MEA-Standard-Medium eine gesteigerte Eduktumsetzung von bis zu 40 % ermöglichten.

Die Verwendung unterschiedlicher komplexer Substrate im Sporulationsmedium zeigte auf, dass insbesondere Malzextrakt und Sojapepton als optimale Nährstoffkomponenten für eine

maximale Sporenbildung geeignet sind. Zudem konnte die Sporenausbeute durch Erhöhung des Agar- und Malzextraktanteils weiter gesteigert werden, wobei gleichzeitig die Sporenqualität verbessert wurde und zu einer 44 %-igen Steigerung der Eduktumsetzung führte.

Schließlich wurden im Rahmen der Arbeit für *A. ochraceus* Minimalmedien gefunden, auf denen gleichermaßen hohe Sporenmengen als auch Sporen hoher Viabilität gebildet werden können. Diesbezüglich wurde Sucrose als optimale Kohlenstoffquelle und Harnstoff als optimale Stickstoffquelle identifiziert, die eine bis zu 60 %-ige Steigerung der Eduktumsetzung erzielten.

Nach umfassender Bewertung der Versuche ist für eine maximale Sporenbildung und -viabilität die Inkubation auf Komplexmedium mit erhöhtem Agar- und Malzextraktanteil bei 24 °C in Dunkelheit für acht Tage anzustreben. Da im Rahmen der Arbeit aus Seedingkulturen vom Sucrose- und Harnstoff-haltigen Minimalmedium ebenfalls eine hohe Biomassebildung und Eduktumsetzung im Kultivierungsprozess resultierte, erweist sich zukünftig auch die Sporenerstellung auf synthetischen Medien als vielversprechend. In weiteren Versuchen ist zu testen, inwiefern sich die Sporenbildung und -viabilität durch Kombination optimaler Kohlenstoff- und Stickstoffquellen in einem Sporulationsmedium potenzieren lassen. Ferner ist zu klären, inwieweit durch den Zusatz von Harnstoff in Komplexmedien die Qualität der gebildeten Sporen positiv beeinflusst werden kann. Auch der Einsatz weiterer komplexer Nährstoffkomponenten, in denen vorwiegend Sucrose enthalten ist (z. B. Melasse), stellt einen interessanten Untersuchungsaspekt dar.

Zusammenfassend wurden durch Variation zahlreicher Parameter und Medienzusammensetzungen Sporulationbedingungen identifiziert, die in kurzer Zeit sehr hohe und reproduzierbare Sporenausbeuten von bis zu $4,6 \cdot 10^8$ Sporen mL^{-1} erzielen. Gleichzeitig konnten mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Methoden zur Bestimmung der Sporengüte optimale Bedingungen gefunden werden, die zu Seedingkulturen mit gesteigertem Wachstum und erhöhter Eduktumsetzung im anschließenden submersen Kultivierungsprozess führen, womit auch die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens durch Reduktion der Kultivierungsdauer erhöht werden könnte.

Im Hinblick auf den industriellen Prozess ist es über die Etablierung der Charakterisierungsverfahren von Seedingkulturen nun möglich, vor der submersen Kultivierung Aussagen über deren möglichen Verlauf zu erhalten. Des Weiteren können durch das Aufdecken optimaler Sporulationsbedingungen zukünftig homogene Sporensuspensionen hoher Viabilität hergestellt werden und damit ein wesentlicher Beitrag zur Qualitätssicherung des bestehenden Kultivierungsverfahrens in Bezug auf die Produktausbeute geleistet werden. Fortführend sollten die im Labormaßstab ermittelten optimalen Sporulationsparameter sowie Qualitätsindikatoren im industriellen Maßstab einem *proof-of-concept* unterzogen werden.



6 Abkürzungen und Symbole

A.	<i>Aspergillus</i>
<i>AreA</i>	<i>Ammonium-Repression-Aktivator A</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
<i>brlA</i>	<i>Bristle-Aktivator A</i>
BTM	Biotrockenmasse
C-Anteil	Kohlenstoffanteil
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CFU	<i>Colony forming units</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
C:N	Kohlenstoff:Stickstoff-Verhältnis
<i>CreA</i>	<i>Carbon-Repression-Aktivator A</i>
CTC	5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid
CYA	Czapek-Hefeextrakt-Agar
d	Tage
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDA	Fluorescein-Diacetat
FPP	Fructose-6-Phosphat-Phosphatase
F6P	Fructose-6-Phosphat
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i>
G6P	Glucose-6-Phosphat
h	Stunde
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HXK	Hexokinase
INT	2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazoliumchlorid
L	Liter
M	Molar [mol L^{-1}]
ME	Malzextrakt-Pepton-Medium
MEA	Malzextrakt-Pepton-Agar
min	Minute
mL	Milliliter
MPD	Mannitol-Phosphat-Dehydrogenase
MPP	Mannitol-Phosphat-Phosphatase
MQW	Maisquellwasser
MQWA	Maisquellwasser-Agar
MTD	Mannitol-Dehydrogenase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

MY40GA	Malzextrakt-Hefeextrakt -40 %-Glucose-Agar
N-Anteil	Stickstoffanteil
N-Quelle	Stickstoffquelle
NADH	Nicotinamidadeninukleotid (oxidiertes Zustand)
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat (reduziertes Zustand)
Nor-AD	Norandrostendion
Nor-OH-AD	11 α -OH-Norandrostendion
OD	Optische Dichte
PDA	Kartoffel-Dextrose-Agar
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI	Propidiumiodid
RFU	<i>Relative Fluorescent Unit</i>
s	Sekunde
spez.	Spezifisch
theor.	Theoretisch
TTC	2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid
UV	Ultraviolett
v/v	<i>Volume/Volume</i> (Volumenanteil am Gesamtvolumen)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
WST-1	Natrium-5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazoliumsalz
WST-5	Dinatrium-2,29-dibenzothiazolyl-5,59-bis[4-di(2-sulfoethyl)carbamoylphenyl]-3,39-(3,39-dimethoxy-4,49-biphenylene)-ditetrazoliumsalz
w/v	<i>Weight/Volume</i> (Massenanteil am Gesamtvolumen)
XTT	Natrium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-Tetrazoliumsalz
YPGA	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Agar
YESA	Hefeextrakt-Sucrose-Agar
μ L	Mikroliter

7 Literatur

- Abdel-Hadi, A.; Magan, N. (2009). **Influence of physiological factors on growth, sporulation and ochratoxin A/B production of the new *Aspergillus ochraceus* grouping.** *World Mycotoxin Journal*, **2** (4): 429-434.
- Abdel-Rahim, A. M.; Arbab, H. A. (1985). **Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*.** *Mycopathologia*, **89** (2): 75-79.
- Adam, G.; Duncan, H. (2001). **Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils.** *Soil Biology and Biochemistry*, **33** (7-8): 943-951.
- Adams, T. H. (1994). **Asexual Sporulation in Higher Fungi.** In: Gow, N. A. R.; Gadd, G. M. (Eds). *The Growing Fungus*. Springer Netherlands, 367-382.
- Adams, T. H.; Wieser, J. K.; Yu, J. H. (1998). **Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62** (1): 35-54.
- Adler, L.; Pedersen, A.; Tunblad-Johansson, I. (1982). **Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl.** *Physiologia Plantarum*, **56** (2): 139-142.
- Araujo, R.; Rodrigues, A. G. (2004). **Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*.** *Journal of Clinical Microbiology*, **42** (9): 4335-4337.
- Archer, D. B. (2000). **Filamentous fungi as microbial cell factories for food use.** *Current Opinion in Biotechnology*, **11** (5): 478-483.
- Atlas, R. M. (1993). **Handbook of Microbiological Media.** Boca Raton, CRC Press.
- Baena-Ruano, S.; Jiménez-Ot, C.; Santos-Dueñas, I. M.; Cantero-Moreno, D.; Barja, F.; García-García, I. (2006). **Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process.** *Process Biochemistry*, **41** (5): 1160-1164.
- Bapat, P. M.; Kundu, S.; Wangikar, P. P. (2003). **An Optimized Method for *Aspergillus niger* Spore Production on Natural Carrier Substrates.** *Biotechnology Progress*, **19** (6): 1683-1688.
- Barreto-Bergter, E.; A.J. Gorin, P.; Travassos, L. R. (1981). **Cell constituents of mycelia and conidia of *Aspergillus fumigatus*.** *Carbohydrate Research*, **95** (2): 205-217.
- Beever, R. E.; Laracy, E. P. (1986). **Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*.** *Journal of Bacteriology*, **168** (3): 1358-1365.
- Beloti, V.; Barros, M. A. F.; De Freitas, J. C.; Nero, L. A.; De Souza, J. A.; Santana, E. H. W.; Franco, B. D. G. M. (1999). **Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk.** *Revista de Microbiologia*, **30** (2): 137-140.
- Benau, D. A.; Schumacher, W. G.; McGuire, E. J.; Fitzpatrick-McElligott, S.; Storey, B. T.; Roth, S. (1990). **Light microscopic localization of glycosyltransferase activities in cells and tissues.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **38** (1): 23-30.
- Bernas, T.; Dobrucki, J. (1999). **Reduction of a tetrazolium salt, CTC, by intact HepG2 human hepatoma cells: subcellular localisation of reducing systems.** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **1451** (1): 73-81.
- Bernas, T.; Dobrucki, J. (2000). **The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **380** (3): 108-116.
- Bernas, T.; Dobrucki, J. (2002). **Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes.** *Cytometry*, **47** (4): 236-242.
- Bernas, T.; Dobrucki, J. W. (2004). **Backscattered light confocal imaging of intracellular MTT-formazan crystals.** *Microscopy Research and Technique*, **64** (2): 126-134.
- Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S.; El-Gewely, M. R. (2005). **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.** *Biotechnology Annual Review*, **11**: 127-152.
- Berridge, M. V.; Tan, A. S. (1993). **Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **303** (2): 474-482.
- Blomberg, A.; Adler, L. (1992). **Physiology of osmotolerance in fungi.** *Advances in Microbial Physiology*, **33**: 145-212.
- Borchert, N. (2010). **Charakterisierung von Seedingkulturen von *Aspergillus ochraceus*.** ibvt, zugl. Bachelorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

- Broderick, A. J.; Greenshields, R. N. (1981). **Sporulation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus ochraceus* in continuous submerged liquid culture.** *Journal of General Microbiology*, **126** (1): 193-202.
- Calvo, A. M.; Wilson, R. A.; Bok, J. W.; Keller, N. P. (2002). **Relationship between secondary metabolism and fungal development.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66** (3): 447-459.
- Carlile, M. J. (1994). **The Success of the Hypha and Mycelium.** In: Gow, N. A. R.; Gadd, G. M. (Eds). *The Growing Fungus*. Springer Netherlands, 3-19.
- Chastain, T. G.; King, B. (1990). **A biochemical method for estimating viability of teliospores of *Tilletia controversa*.** *Phytopathology*, **80** (5): 474-476.
- Chen, C. Y.; Seguin-Swartz, G. (2002). **A rapid method for assessing the viability of fungal spores.** *Canadian Journal of Plant Pathology*, **24** (2): 230-232.
- Chen, X.; Li, Y.; Du, G.; Chen, J. (2005). **Application of response surface methodology in medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **21** (4): 593-599.
- Cliquet, S.; Jackson, M. A. (2005). **Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **32** (5): 204-210.
- Conesa, A.; Punt, P. J.; van Luijk, N.; van den Hondel, C. A. (2001). **The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view.** *Fungal Genetics and Biology*, **33** (3): 155-171.
- Corina, D. L.; Munday, K. A. (1971). **Studies on polyol function in *Aspergillus clavatus*: a role for mannitol and ribitol.** *Journal of General Microbiology*, **69** (2): 221-227.
- Corrochano, L. M. (2007). **Fungal photoreceptors: Sensory molecules for fungal development and behaviour.** *Photochemical and Photobiological Sciences*, **6** (7): 725-736.
- d'Enfert, C. (1997). **Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*.** *Fungal Genetics and Biology*, **21** (2): 163-172.
- Dague, E.; Alsteens, D.; Latgé, J. P.; Dufréne, Y. F. (2008). **High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia.** *Biophysical Journal*, **94** (2): 656-660.
- Dahlberg, K. R.; van Etten, J. L. (1982). **Physiology and Biochemistry of fungal sporulation.** *Annual Review of Phytopathology*, **20**: 281-301.
- Dantigny, P.; Nanguy, S. P. M. (2009). **Significance of the physiological state of fungal spores.** *International Journal of Food Microbiology*, **134** (1-2): 16-20.
- Davies, R. W. (1994). **Heterologous gene expression and protein secretion in *Aspergillus*.** *Progress in industrial microbiology*, **29**: 527-560.
- Davis, D. J.; Burlak, C.; Money, N. P. (2000). **Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes.** *Mycological Research*, **104** (7): 800-804.
- De Vries, R. P.; Visser, J. (2001). ***Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65** (4): 497-522.
- Demming, S.; Sommer, B.; Llobera, A.; Rasch, D.; Krull, R.; Büttgenbach, S. (2011). **Disposable parallel poly(dimethylsiloxane) microbioreactor with integrated readout grid for germination screening of *Aspergillus ochraceus*.** *Biomicrofluidics* **5**(1): 014104.
- Dhingra, O. D.; Sinclair, J. B. (1995). **Basic plant pathology methods.** 2 edn. CRC Lewis Publishers. Boca Raton, London, Tokyo.
- Diano, A.; Bekker-Jensen, S.; Dynesen, J.; Nielsen, J. (2006). **Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism.** *Biotechnology and Bioengineering*, **94** (5): 899-908.
- Dichtl, B.; Stevens, A.; Tollervey, D. (1997). **Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes.** *EMBO Journal*, **16** (23): 7184-7195.
- Diekman, M. A.; Green, M. L. (1992). **Mycotoxins and reproduction in domestic livestock.** *Journal of animal science*, **70** (5): 1615-1627.
- Dijksterhuis, J.; Teunissen, P. G. M. (2004). **Dormant ascospores of *Talaromyces macrosporus* are activated to germinate after treatment with ultra high pressure.** *Journal of Applied Microbiology*, **96** (1): 162-169.
- Doyle, M. P.; Marth, E. H. (1975). **Thermal inactivation of conidia from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. I. Effects of moist heat, age of conidia and sporulation medium.** *Journal of Milk and Food Technology*, **38**: 678-682.
- Driouch, H.; Roth, A.; Dersch, P.; Wittmann, C. (2010a). **Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87** (6): 2011-2024.

- Driouch, H.; Sommer, B.; Wittmann, C. (2010b). **Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production.** *Biotechnology and Bioengineering*, **105** (6): 1058-1068.
- Dulaney, E. L.; McAleer, W. J.; Koslowski, M.; Stapley, E. O.; Jaglom, J. (1955a). **Hydroxylation of progesterone and 11-desoxy-17-hydroxycorticosterone by *Aspergillus* and *Penicillium*.** *Applied microbiology*, **3** (6): 336-340.
- Dulaney, E. L.; Stapley, E. O.; Hlavac, C. (1955b). **Hydroxylation of Steroids, Principally Progesterone, by a Strain of *Aspergillus ochraceus*.** *Mycologia*, **47** (4): 464-474.
- El-Enshasy, H.; Hellmuth, K.; Rinas, U. (1999). **Fungal morphology in submerged cultures and its relation to glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, **81** (1): 1-11.
- El-Enshasy, H.; Kleine, J.; Rinas, U. (2006). **Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*.** *Process Biochemistry*, **41** (10): 2103-2112.
- Elson, M. K.; Schisler, D. A.; Jackson, M. A. (1998). **Carbon-to-nitrogen ratio, carbon concentration, and amino acid composition of growth media influence conidiation of *Helminthosporium solani*.** *Mycologia*, **90** (3): 406-413.
- Engelkes, C. A.; Nucló, R. L.; Fravel, D. R. (1997). **Effect of carbon, nitrogen, and C:N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*.** *Phytopathology*, **87** (5): 500-505.
- Feofilova, E. P.; Daragan-Sushova, M. V.; Volokhova, M. V.; Velichko, B. A.; Shirokova, E. A.; Sinitsyn, P. A. (1988). **Changes in the Chemical Composition of Cells in the Developmental Cycle of *Aspergillus japonicus*.** *Mikrobiologiya*, **57**: 778-784.
- Fernandez Vergano, M. G.; Soria, M. A.; Kerber, N. L. (1996). **Short communication: Influence of inoculum preparation on citric acid production by *Aspergillus niger*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12** (6): 655-656.
- Friedl, M. A.; Kubicek, C. P.; Druzhinina, I. S. (2008). **Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hpocrea atroviridis*.** *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (1): 245-250.
- Fuchs, G.; Schlegel, H. G.; Zaborosch, C. (2007). **Allgemeine Mikrobiologie.** 8. edn. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- González, I.; López, M.; Fernández, A.; Bernardo, A. (2008). **Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed in media with different mineral contents.** *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, **59** (1): 34-38.
- Green, V. S.; Stott, D. E.; Diack, M. (2006). **Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples.** *Soil Biology and Biochemistry*, **38** (4): 693-701.
- Grimm, L. H.; Kelly, S.; Hengstler, J.; Göbel, A.; Krull, R.; Hempel, D. C. (2004). **Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia.** *Biotechnology and Bioengineering*, **87** (2): 213-218.
- Grimm, L. H.; Kelly, S.; Krull, R.; Hempel, D. C. (2005a). **Morphology and productivity of filamentous fungi.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69** (4): 375-384.
- Grimm, L. H.; Kelly, S.; Völkerding, I. I.; Krull, R.; Hempel, D. C. (2005b). **Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia.** *Biotechnology and Bioengineering*, **92** (7): 879-888.
- Grover, R. K. (1964). **The effect of amino acids on growth and sporulation of *Aspergillus flavus* and their carry-over for subsequent spore germination.** *New Phytologist*, **63** (1): 12-20.
- Haack, M. B.; Olsson, L.; Hansen, K.; Lantz, A. E. (2006). **Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70** (4): 482-487.
- Hallsworth, J. E.; Magan, N. (1994). **Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi.** *Microbiology*, **140** (10): 2705-2713.
- Han, K. H.; Lee, D. B.; Kim, J. H.; Kim, M. S.; Han, K. Y.; Kim, W. S.; Park, Y. S.; Kim, H. B.; Han, D. M. (2003). **Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*.** *Journal of Microbiology*, **41** (1): 34-40.
- Han, K. H.; Prade, R. A. (2002). **Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*.** *Molecular Microbiology*, **43** (5): 1065-1078.
- Harman, G. E.; Jin, X.; Stasz, T. E.; Peruzzotti, G.; Leopold, A. C.; Taylor, A. G. (1991). **Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control.** *Biological Control*, **1** (1): 23-28.

- Hatakeyama, R.; Nakahama, T.; Higuchi, Y.; Kitamoto, K. (2007). **Light represses conidiation in koji mold *Aspergillus oryzae***. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **71** (8): 1844-1849.
- Hefnawy, M. (2001). **Effect of osmotic stress on *Aspergillus chevalieri* respiratory system**. *Folia Microbiologica*, **46** (5): 407-412.
- Hill, E. P. (1976). **Effect of light on growth and sporulation of *Aspergillus ornatus***. *Journal of General Microbiology*, **95** (1): 39-44.
- Hille, A.; Neu, T. R.; Hempel, D. C.; Horn, H. (2005). **Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger***. *Biotechnology and Bioengineering*, **92** (5): 614-623.
- Hof, H. (2003). **Pathogene Pilze: *Candida*, *Aspergillus* und Co**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Hogan, D. A. (2006). **Talking to themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi**. *Eukaryotic Cell*, **5** (4): 613-619.
- Hohmann, S. (2002). **Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66** (2): 300-372.
- Holland, H. L.; Lakshmaiah, G. (1999). **Microbial hydroxylation of 2-oxocholesterol**. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, **6** (1-2): 83-88.
- Invitrogen (2004). **LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit**. *Molecular Probes*, Leiden.
- Jackson, M. A.; Schisler, D. A. (1992). **The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment**. *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (7): 2260-2265.
- Jayanthi, C. R.; Madyastha, P.; Madyastha, K. M. (1982). **Microsomal 11-alpha-hydroxylation of progesterone in *Aspergillus ochraceus*. I. Characterization of the hydroxylase system**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **106** (4): 1262-1268.
- Jennings, D. H. (1985). **Polyol Metabolism in Fungi**. *Advances in Microbial Physiology*, 149-193.
- Jennings, D. H. (1995). **The physiology of fungal nutrition**. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Judet, D.; Bensoussan, M.; Perrier-Cornet, J. M.; Dantigny, P. (2008). **Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity**. *Food Microbiology*, **25** (7): 902-907.
- Kardinahl, S.; Rabelt, D.; Reschke, M. (2006). **Biotransformation: From a vision to the technology!** *Biotransformation: Von der Vision zur Technologie!*, **78** (3): 209-217.
- Kelavkar, U. P.; Chhatpar, H. S. (1993). **Polyol concentrations in *Aspergillus repens* grown under salt stress**. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **9** (5): 579-582.
- Kelly, S.; Grimm, L. H.; Jonas, R.; Hempel, D. C.; Krull, R. (2006). **Investigations of the morphogenesis of filamentous microorganisms**. *Engineering in Life Sciences*, **6** (5): 475-480.
- Kiep, K. A. (2010). **Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Morphologie und Produktbildung von *Aspergillus niger***. In: Wittmann, C. (Ed), *ibvt-Schriftenreihe Band 53*, Cuvillier-Verlag, Göttingen, zugl. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Krappmann, S.; Baus, G. H. (2005). **Nitrogen metabolism of *Aspergillus* and its role in pathogenicity**. *Medical Mycology*, **43** (SUPPL.1): S31-S40.
- Kreyenschulte, D. (2010). **Methodenentwicklung zur Charakterisierung von Seedingkulturen von *Aspergillus ochraceus***. *ibvt*, zugl. Bachelorarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Krüger, M.; Sievers, N.; Fischer, R. (1997). **Molekularbiologie der Sporenträgerentwicklung des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans***. *Biologie in unserer Zeit*, **27** (6): 375-382.
- Krull, R.; Cordes, C.; Horn, H.; Kampen, I.; Kwade, A.; Neu, T.; Nörtemann, B. (2010). **Morphology of filamentous fungi: Linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger***. In: Wittmann, C., Krull, R. (Ed). *Biosystems Engineering II - Linking Cellular Networks and Bioprocesses*. Springer Berlin / Heidelberg, 121: 1-21.
- Kück, U.; Nowrousian, M.; Hoff, B.; Engh, I.; Reiß, J. (2009). **Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung**. 3 edn. Springer Berlin / Heidelberg.
- Lax, A. R.; Templeton, G. E.; Meyer, W. L. (1985). **Isolation, Purification, and Biological Activity of a Self-Inhibitor from Conidia of *Colletotrichum gloeosporioides***. *Phytopathology*, **75** (4): 386-390.
- Lewis, D. H.; Smith, D. C. (1967). **Sugar alcohols (Polyols) in fungi and green plants**. *New Phytologist*, **66** (2): 143-184.

- Li, G.; Osborne, J.; Asiegbu, F. O. (2006). **A macroarray expression analysis of novel cDNAs vital for growth initiation and primary metabolism during development of *Heterobasidium parviporum* conidiospores.** *Environmental Microbiology*, **8** (8): 1340-1350.
- Lingappa, B. T.; Lingappa, Y.; Bell, E. (1973). **A self-inhibitor of protein synthesis in the conidia of *Glomerella cingulata*.** *Archives of Microbiology* **94** (2): 97-107.
- Liu, Y.; Bell-Pedersen, D. (2006). **Circadian rhythms in *Neurospora crassa* and other filamentous fungi.** *Eukaryotic Cell*, **5** (8): 1184-1193.
- Liu, Y.; Schubert, D. (1997). **Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis.** *Journal of Neurochemistry*, **69** (6): 2285-2293.
- Loshon, C. A.; Wahome, P. G.; Maciejewski, M. W.; Setlow, P. (2006). **Levels of glycine betaine in growing cells and spores of *Bacillus* species and lack of effect of glycine betaine on dormant spore resistance.** *Journal of Bacteriology*, **188** (8): 3153-3158.
- Lubertozzi, D.; Keasling, J. D. (2009). **Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression.** *Biotechnology Advances*, **27** (1): 53-75.
- Magnuson, J. K.; Lasure, L. L. (2004). **Organic acid production by filamentous fungi.** In: Tkacz, J. S.; Lange, L. (Eds). *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine.* Kluwer Academic/Plenum Publishers. NY. USA, 307-340.
- Managbanag, J. R.; Torzilli, A. P. (2002). **An analysis of trehalose, glycerol, and mannitol accumulation during heat and salt stress in a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*.** *Mycologia*, **94** (3): 384-391.
- Marshall, N. J.; Goodwin, C. J.; Holt, S. J. (1995). **A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function.** *Growth Regulation*, **5** (2): 69-84.
- Mazas, M.; Fernández, A.; Álvarez, A.; López, M.; Bernardo, A. (2009). **Effects of phosphate and sodium and potassium chlorides on sporulation and heat resistance of *Bacillus cereus*.** *Journal of Food Safety*, **29** (1): 106-117.
- Mellon, J. E.; Dowd, M. K.; Cotty, P. J. (2002). **Time course study of substrate utilization by *Aspergillus flavus* in medium simulating corn (*Zea mays*) kernels.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** (3): 648-652.
- Melly, E.; Genest, P. C.; Gilmore, M. E.; Little, S.; Popham, D. L.; Driks, A.; Setlow, P. (2002). **Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures.** *Journal of Applied Microbiology*, **92** (6): 1105-1115.
- Mert, H. H.; Dizbay, M. (1977). **The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinum* species.** *Mycopathologia*, **61** (2): 125-127.
- Mert, H. H.; Ekmekci, S. (1987). **The effect of salinity and osmotic pressure of the medium on the growth, sporulation and changes in the total organic acid content of *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*.** *Mycopathologia*, **100** (2): 85-89.
- Mikosch, T. S. P. (1995). **Heterologe Genexpression in filamentösen Pilzen: Untersuchungen zur Proteinbiosynthese des humanen Mucus-Proteinaseinhibitors in *Aspergillus niger*.** Dissertation. TH Darmstadt
- Mims, C. W.; Richardson, E. A.; Timberlake, W. E. (1988). **Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution.** *Protoplasma*, **144** (2): 132-141.
- Mirabito, P. M.; Osmani, S. A. (1994). **Interactions between the developmental program and cell cycle regulation of *Aspergillus nidulans*.** *Seminars in Developmental Biology*, **5** (3): 139-145.
- Mooney, J. L.; Yager, L. N. (1990). **Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*.** *Genes and Development*, **4** (9): 1473-1482.
- Morozova, E. V.; Kozlov, V. P.; Tereshina, V. M.; Memorskaia, A. S.; Feofilova, E. P. (2002). **Changes in lipid composition and carbohydrate composition of *Aspergillus niger* conidia during germination.** *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologija*, **38** (2): 149-54.
- Munk, K. (2008). **Taschenlehrbuch Biologie: Mikrobiologie.** 1. edn. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin.
- Murguia, J. R.; Belles, J. M.; Serrano, R. (1996). **The yeast HAL2 nucleotidase is an *in vivo* target of salt toxicity.** *Journal of Biological Chemistry*, **271** (46): 29029-29033.
- Nesci, A.; Etcheverry, M.; Magan, N. (2004). **Osmotic and matrix potential effects on growth, sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus* section *Flavi* strains from Argentina.** *Journal of Applied Microbiology*, **96** (5): 965-972.

- Niehaus, W. G.; Jiang, W. (1989). **Nitrate induces enzymes of the mannitol cycle and suppresses versicolorin synthesis in *Aspergillus parasiticus***. *Mycopathologia*, **107** (2-3): 131-137.
- Nosanchuk, J. D.; Casadevall, A. (2003). **The contribution of melanin to microbial pathogenesis**. *Cellular Microbiology*, **5** (4): 203-223.
- Olutiola, P. O. (1976). **Some environmental and nutritional factors affecting growth and sporulation of *Aspergillus flavus***. *Transactions of the British Mycological Society*, **66** (1): 131-136.
- Ooijkaas, L. P.; Wilkinson, E. C.; Tramper, J.; Buitelaar, R. M. (1999). **Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs**. *Biotechnology and Bioengineering*, **64** (1): 92-100.
- Osharov, N.; May, G. S. (2001). **The molecular mechanisms of conidial germination**. *FEMS Microbiology Letters*, **199** (2): 153-160.
- Page, M. J.; Di Cera, E. (2006). **Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function**. *Physiological Reviews*, **86** (4): 1049-1092.
- Papagianni, M. (2004). **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes**. *Biotechnology Advances*, **22** (3): 189-259.
- Papagianni, M.; Matthey, M. (2006). **Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology**. *Microbial Cell Factories*, **5**.
- Pardo, E.; Ramos, A. J.; Sanchis, V.; Marín, S. (2005). **Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium**. *International Journal of Food Microbiology*, **98** (1): 1-9.
- Pascual, S.; Melgarejo, P.; Magan, N. (2003). **Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoccum nigrum***. *Mycopathologia*, **156** (2): 93-100.
- Paul, G. C.; Kent, C. A.; Thomas, C. R. (1993). **Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis**. *Biotechnology and Bioengineering*, **42** (1): 11-23.
- Pfyffer, G. E.; Boraschi-Gaia, C.; Weber, B.; Hoesch, L.; Orpin, C. G.; Rast, D. M. (1990). **A further report on the occurrence of acyclic sugar alcohols in fungi**. *Mycological Research*, **94** (2): 219-222.
- Pihet, M.; Vandeputte, P.; Tronchin, G.; Renier, G.; Saulnier, P.; Georgeault, S.; Mallet, R.; Chabasse, D.; Symoens, F.; Bouchara, J. P. (2009). **Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia**. *BMC Microbiology*, **9**.
- Porcel, E. R.; Casas López, J. L.; Ferrón, M. A. V.; Pérez, J. A. S.; Sánchez, J. L. G.; Chisti, Y. (2006). **Effects of the sporulation conditions on the lovastatin production by *Aspergillus terreus***. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **29** (1): 1-5.
- Posas, F.; Chamber, J. R.; Heyman, J. A.; Hoeffler, J. P.; De Nadal, E.; Arino, J. (2000). **The transcriptional response of yeast to saline stress**. *Journal of Biological Chemistry*, **275** (23): 17249-17255.
- Prochaska, H. J.; Santamaria, A. B. (1988). **Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers**. *Analytical Biochemistry*, **169** (2): 328-336.
- Quéric, N.-V.; Soltwedel, T.; Arntz, W. E. (2004). **Application of a rapid direct viable count method to deep-sea sediment bacteria**. *Journal of Microbiological Methods*, **57** (3): 351-367.
- Ramirez, M. L.; Chulze, S. N.; Magan, N. (2004). **Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum***. *Mycologia*, **96** (3): 470-478.
- Ramos, A. J.; Labernia, N.; Marín, S.; Sanchis, V.; Magan, N. (1998). **Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains**. *International Journal of Food Microbiology*, **44** (1-2): 133-140.
- Ramos, A. J.; Magan, N.; Sanchis, V. (1999). **Osmotic and matric potential effects on growth, sclerotia and partitioning of polyols and sugars in colonies and spores of *Aspergillus ochraceus***. *Mycological Research*, **103** (2): 141-147.
- Ranal, M. A.; De Santana, D. G. (2006). **How and why to measure the germination process?** *Revista Brasileira de Botanica*, **29** (1): 1-11.

- Raut, U.; Narang, P.; Mendiratta, D.; Narang, R.; Deotale, V. (2008). **Evaluation of rapid MTT tube method for detection of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampicin and isoniazid.** *Indian Journal of Medical Microbiology*, **26** (3): 222-227.
- Reddy, K. R. N.; Farhana, N. I.; Wardah, A. R.; Salleh, B. (2010). **Morphological identification of foodborne pathogens colonizing rice grains in South Asia.** *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **13** (16): 794-801.
- Redkar, R. J.; Locy, R. D.; Singh, N. K. (1995). **Biosynthetic pathways of glycerol accumulation under salt stress in *Aspergillus nidulans*.** *Experimental Mycology*, **19** (4): 241-246.
- Reisner, H. J. (1976). **Lipid Metabolism of Fungal Spores during Sporogenesis and Germination.** In: Weber, D. J.; Hess, W. M. (Eds). *The Fungal Spore*. New York: Wiley-VCH, 166–186.
- Rep, M.; Krantz, M.; Thevelein, J. M.; Hohmann, S. (2000). **The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes.** *Journal of Biological Chemistry*, **275** (12): 8290-8300.
- Rodriguez, G. G.; Phipps, D.; Ishiguro, K.; Ridgway, H. F. (1992). **Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*, **58** (6): 1801-1808.
- Rotman, B.; Papermaster, B. W. (1966). **Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **55** (1): 134-141.
- Ruijter, G. J. G.; Bax, M.; Patel, H.; Flitter, S. J.; Van De Vondervoort, P. J. I.; De Vries, R. P.; VanKuyk, P. A.; Visser, J. (2003). **Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores.** *Eukaryotic Cell*, **2** (4): 690-698.
- Ruijter, G. J. G.; Visser, J. (1997). **Carbon repression in *aspergilli*.** *FEMS Microbiology Letters*, **151** (2): 103-114.
- Ruijter, G. J. G.; Visser, J.; Rinzema, A. (2004). **Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation.** *Microbiology*, **150** (4): 1095-1101.
- Ruzal, S. M.; López, C.; Rivas, E.; Sánchez-Rivas, C. (1998). **Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*.** *Current Microbiology*, **36** (2): 75-79.
- Samanta, T. B.; Roy, N.; Chattopadhyay, S. (1978). **An improved 11 alpha-hydroxylation of progesterone by *Aspergillus ochraceus* TS.** *Biochemical Journal*, **176** (2): 593-594.
- Samson, R. A.; Hong, S. B.; Frisvad, J. C. (2006). **Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*.** *Medical Mycology*, **44** (SUPPL. 1): 133-148.
- Satoh, T.; Isobe, H.; Ayukawa, K.; Sakai, H.; Nawata, H. (1996). **The effects of pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on cell viability and dna production of rat hepatocytes.** *Life Sciences*, **59** (14): 1103-1108.
- Sautour, M.; Dantigny, P.; Guilhem, M. C.; Bensoussan, M. (2003). **Influence of inoculum preparation on the growth of *Penicillium chrysogenum*.** *Journal of Applied Microbiology*, **95** (5): 1034-1038.
- Schaumburg, D.; Schaumburg, I. (2006). **Progesterone 11 α -monooxygenase.** *Handbook of Enzymes*. Springer, 314-317.
- Schisler, D. A.; Jackson, M. A.; Bothast, R. J. (1991). **Influence of Nutrition During Conidiation of *Colletotrichum truncatum* on Conidial Germination and Efficacy in Inciting Disease in *Sesbania exaltata*.** *Phytopathology*, **81**: 587-590.
- Schmid, R. D. (2002). **Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik.** Wiley-VCH, Weinheim.
- Schnurer, J.; Rosswall, T. (1982). **Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter.** *Applied and Environmental Microbiology*, **43** (6): 1256-1261.
- Schuster; Dunn, C.; Frisvad; van, D. (2002). **On the safety of *Aspergillus niger* – a review.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59** (4): 426-435.
- Seidl, V.; Seiboth, B.; Karaffa, L.; Kubicek, C. P. (2004). **The fungal STRE-element-binding protein *Seb1* is involved but not essential for glycerol dehydrogenase (*gld1*) gene expression and glycerol accumulation in *Trichoderma atroviride* during osmotic stress.** *Fungal Genetics and Biology*, **41** (12): 1132-1140.
- Sharma, A.; Behere, A. G.; Padwal-Desai, S. R.; Nadkarni, G. B. (1980). **Influence of inoculum size of *Aspergillus parasiticus* spores on aflatoxin production.** *Applied and Environmental Microbiology*, **40** (6): 989-993.
- Shearman, M. S. (1996). **Cellular MTT reduction distinguishes the mechanism of action of [beta]-amyloid from that of tachykinin receptor peptides.** *Neuropeptides*, **30** (2): 125-132.

- Siderius, M.; Mager, W. H. (1997). **General stress response: In search of a common denominator.** *Yeast Stress Responses*, 213-230.
- Skromne, I.; Sanchez, O.; Aguirre, J. (1995). **Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans briA* regulatory gene.** *Microbiology*, **141** (1): 21-28.
- Smirnov, N.; Cumbes, Q. J. (1989). **Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes.** *Phytochemistry*, **28**: 1057-1060.
- Smith, J. J.; McFeters, G. A. (1997). **Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12.** *Journal of Microbiological Methods*, **29** (3): 161-175.
- Solomon, P. S.; Waters, O. D. C.; Jörgens, C. I.; Lowe, R. G. T.; Rechberger, J.; Trengove, R. D.; Oliver, R. P. (2006). **Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch).** *Biochemical Journal*, **399** (2): 231-239.
- Solomon, P. S.; Waters, O. D. C.; Oliver, R. P. (2007). **Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi.** *Trends in Microbiology*, **15** (6): 257-262.
- Stellmach, J.; Severin, E. (1987). **A fluorescent redox dye. Influence of several substrates and electron carriers on the tetrazolium salt-formazan reaction of Ehrlich ascites tumour cells.** *Histochemical Journal*, **19** (1): 21-26.
- Stellmacher, R. (2009). **Entwicklung von Methoden zur Charakterisierung von Seedingkulturen von *Aspergillus ochraceus*.** ibvt, zugl. Diplomarbeit, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Stentelaire, C.; Antoine, N.; Cabrol, C.; Feron, G.; Durand, A. (2001). **Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method.** *Enzyme and Microbial Technology*, **29** (8-9): 560-566.
- Stocks, S. M. (2004). **Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight.** *Cytometry Part A*, **61** (2): 189-195.
- Stringer, M. A.; Timberlake, W. E. (1995). **dewA encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall.** *Molecular Microbiology*, **16** (1): 33-44.
- Stubberfield, L. C. F.; Shaw, P. J. A. (1990). **A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measures of microbial activity.** *Journal of Microbiological Methods*, **12** (3-4): 151-162.
- Suárez-Quiroz, M. L.; González-Rios, O.; Barel, M.; Guyot, B.; Schorr-Galindo, S.; Guiraud, J. P. (2004). **Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee.** *Food Microbiology*, **21** (6): 629-634.
- Tachon, S.; Michelon, D.; Chambellon, E.; Cantonnet, M.; Mezange, C.; Henno, L.; Cachon, R.; Yvon, M. (2009). **Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*.** *Microbiology*, **155** (9): 2941-2948.
- Taniwaki, M. H.; Pitt, J. I.; Teixeira, A. A.; Iamanaka, B. T. (2003). **The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods.** *International Journal of Food Microbiology*, **82** (2): 173-179.
- Tereshina, V. M.; Kovtunen, A. V.; Memorskaya, A. S.; Feofilova, E. P. (2004). **Effect of Carbohydrate Composition of the Cytosol of *Aspergillus niger* Conidia on Their Viability During Storage.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40** (5): 454-459.
- Tovar-Rojo, F.; Cabrera-Martinez, R. M.; Setlow, B.; Setlow, P. (2003). **Studies on the mechanism of the osmoresistance of spores of *Bacillus subtilis*.** *Journal of Applied Microbiology*, **95** (1): 167-179.
- Tsukatani, T.; Suenaga, H.; Higuchi, T.; Akao, T.; Ishiyama, M.; Ezoe, K.; Matsumoto, K. (2008). **Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts.** *Journal of Microbiological Methods*, **75** (1): 109-116.
- Tucker, K. G.; Thomas, C. R. (1994). **Inoculum effects on fungal morphology: Shake flasks vs agitated bioreactors.** *Biotechnology Techniques*, **8** (3): 153-156.
- Tunney, M. M.; Ramage, G.; Field, T. R.; Moriarty, T. F.; Storey, D. G. (2004). **Rapid Colorimetric Assay for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48** (5): 1879-1881.
- Van Der Merwe, K. J.; Steyn, P. S.; Fourie, L.; Scott, D. B.; Theron, J. J. (1965). **Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. [20].** *Nature*, **205** (4976): 1112-1113.
- Van Etten, J. L.; Dahlberg, K. R.; Russo, G. M. (1983). **Fungal spore germination.** In: Smith, J. E. (Ed). *Fungal Differentiation. A Contemporary Synthesis*. New York: Marcel Dekker, 235-266.

- Vezina, C.; Sehgal, S. N.; Singh, K. (1963). **Transformation of steroids by spores of microorganisms. I. Hydroxylation of progesterone by conidia of *Aspergillus ochraceus*.** *Applied microbiology*, **11**: 50-57.
- Voegele, R. T.; Hahn, M.; Lohaus, G.; Link, T.; Heiser, I.; Mendgen, K. (2005). **Possible roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in the biotrophic plant pathogen *Uromyces fabae*.** *Plant Physiology*, **137** (1): 190-198.
- Ward, O. P.; Qin, W. M.; Dhanjoon, J.; Ye, J.; Singh, A. (2006). **Physiology and biotechnology of *Aspergillus*.** *Advances in Applied Microbiology*, **58**: 1-75.
- Webb, M. D.; Pin, C.; Peck, M. W.; Stringer, S. C. (2007). **Historical and contemporary NaCl concentrations affect the duration and distribution of lag times from individual spores of nonproteolytic *Clostridium botulinum*.** *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (7): 2118-27.
- Webster, J.; Weber, R. W. S. (2007). **Introduction to fungi.** 3rd edn. Cambridge University Press.
- Welkos, S. L.; Cote, C. K.; Rea, K. M.; Gibbs, P. H. (2004). **A microtiter fluorometric assay to detect the germination of *Bacillus anthracis* spores and the germination inhibitory effects of antibodies.** *Journal of Microbiological Methods*, **56** (2): 253-265.
- Whitmarsh, A. J.; Davis, R. J. (2000). **A central control for cell growth.** *Nature*, **403** (6767): 255-256.
- Witteveen, C. F.; Visser, J. (1995). **Polyol pools in *Aspergillus niger*.** *FEMS Microbiology Letters*, **134** (1): 57-62.
- Wolken, W. A. M.; Tramper, J.; Van Der Werf, M. J. (2003). **What can spores do for us?** *Trends in Biotechnology*, **21** (8): 338-345.
- Xu, J.; Wang, L.; Ridgway, D.; Gu, T.; Moo-Young, M. (2000). **Increased heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth.** *Biotechnology Progress*, **16** (2): 222-227.
- Yancey, P. H.; Clark, M. E.; Hand, S. C.; Bowlus, R. D.; Somero, G. N. (1982). **Living with water stress: Evolution of osmolyte systems.** *Science*, **217** (4566): 1214-1222.
- Yang, H. C.; Nemoto, Y.; Homma, T.; Matsuoka, H.; Yamada, S.; Sumita, O.; Takatori, K.; Kurata, H. (1995). **Rapid viability assessment of spores of several fungi by an ionic intensified fluorescein diacetate method.** *Current Microbiology*, **30** (3): 173-176.
- Yoshida, Y.; Kiyosue, T.; Nakashima, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. (1997). **Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress.** *Plant and Cell Physiology*, **38** (10): 1095-1102.
- Zanzotto, A.; Szita, N.; Boccazzi, P.; Lessard, P.; Sinskey, A. J.; Jensen, K. F. (2004). **Membrane-aerated microbioreactor for high-throughput bioprocessing.** *Biotechnology and Bioengineering*, **87** (2): 243-54.
- www.wateractivity.org/theory.html / Hrsg. Decagon Devices inc. Stand: Mai 2011



- Band 1** **Sunder, Matthias:** Oxidation grundwasserrelevanter Spurenverunreinigungen mit Ozon und Wasserstoffperoxid im Rohrreaktor. 1996. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-00-4
- Band 2** **Pack, Hubertus:** Schwermetalle in Abwasserströmen: Biosorption und Auswirkung auf eine schadstoffabbauende Bakterienkultur. 1996. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-01-2
- Band 3** **Brüggenthies, Antje:** Biologische Reinigung EDTA-haltiger Abwässer. 1996. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-02-0
- Band 4** **Liebelt, Uwe:** Anaerobe Teilstrombehandlung von Restflotten der Reaktivfärberei. 1997. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-03-9
- Band 5** **Mann, Volker G.:** Optimierung und Scale up eines Suspensionsreaktorverfahrens zur biologischen Reinigung feinkörniger, kontaminierter Böden. 1997. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-04-7
- Band 6** **Boll Marco:** Einsatz von Fuzzy-Control zur Regelung verfahrenstechnischer Prozesse. 1997. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-06-3
- Band 7** **Büscher, Klaus:** Bestimmung von mechanischen Beanspruchungen in Zweiphasenreaktoren. 1997. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-07-1
- Band 8** **Burghardt, Rudolf:** Alkalische Hydrolyse - Charakterisierung und Anwendung einer Aufschlußmethode für industrielle Belebtschlämme. 1998. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-13-6
- Band 9** **Hemmi, Martin:** Biologisch-chemische Behandlung von Färbereiabwässern in einem Sequencing Batch Process. 1999. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-14-4
- Band 10** **Dziallas, Holger:** Lokale Phasengehalte in zwei- und dreiphasig betriebenen Blasensäulenreaktoren. 2000. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-15-2
- Band 11** **Scheminski, Anke:** Teiloxidation von Faulschlamm mit Ozon. 2001. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-16-0
- Band 12** **Mahnke, Eike Ulf:** Fluidodynamisch induzierte Partikelbeanspruchung in pneumatisch gerührten Mehrphasenreaktoren. 2002. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-17-9

- Band 13** **Michele, Volker:** CDF modeling and measurement of liquid flow structure and phase holdup in two- and three-phase bubble columns. 2002. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-18-7
- Band 14** **Wäsche, Stefan:** Einfluss der Wachstumsbedingungen auf Stoffübergang und Struktur von Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-19-5
- Band 15** **Krull Rainer:** Produktionsintegrierte Behandlung industrieller Abwässer zur Schließung von Stoffkreisläuren. 2003. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-20-9
- Band 16** **Otto, Peter:** Entwicklung eines chemisch-biologischen Verfahrens zur Reinigung EDTA enthaltender Abwässer. 2003. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-21-7
- Band 17** **Horn, Harald:** Modellierung von Stoffumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-22-5
- Band 18** **Mora Naranjo, Nelson:** Analyse und Modellierung anaerober Abbauprozesse in Deponien. 2004. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-23-3
- Band 19** **Döpfens, Eckart:** Abwasserbehandlung und Prozesswasserrecycling in der Textilindustrie. 2004. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-24-1
- Band 20** **Haarstrick, Andreas:** Modellierung millieugesteuerter biologischer Abbauprozesse in heterogenen problembelasteten Systemen. 2005. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-27-6
- Band 21** **Baäß, Anne-Christina:** Mikrobieller Abbau der Polyaminopolycarbonsäuren Propylendiamintetraacetat (PDTA) und Diethylentriaminpentaacetat (DTPA). 2004. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-26-8
- Band 22** **Staudt, Christian:** Entwicklung der Struktur von Biofilmen. 2006. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-28-4
- Band 23** **Pilz, Roman Daniel:** Partikelbeanspruchung in mehrphasig betriebenen Airlift-Reaktoren. 2006. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-29-2
- Band 24** **Schallenberg, Jörg:** Modellierung von zwei- und dreiphasigen Strömungen in Blasensäulenreaktoren. 2006. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-30-6
- Band 25** **Enß, Jan Hendrik:** Einfluss der Viskosität auf Blasensäulenströmungen. 2006. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-31-4

- Band 26** Kelly, Sven: Fluidodynamischer Einfluss auf die Morphogenese von Biopellets filamentöser Pilze. 2006. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-32-2
- Band 27** Grimm, Luis Hermann: Sporenaggregationsmodell für die submerse Kultivierung koagulativer Myzelbildner. 2006. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-33-0
- Band 28** León Ohl, Andrés: Wechselwirkungen von Stofftransport und Wachstum in Biofilmsystemen. 2007. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-34-9
- Band 29** Emmler, Markus: Freisetzung von Glucoamylase in Kultivierungen mit *Aspergillus niger*. 2007. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-35-7
- Band 30** Leonhäuser, Johannes: Biotechnologische Verfahren zur Reinigung von quecksilberhaltigem Abwasser. 2007. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 3-932252-36-5
- Band 31** Jungebloud, Anke: Untersuchung der Genexpression in *Aspergillus niger* mittels Echtzeit-PCR. 1996. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-37-2
- Band 32** Hille, Andrea: Stofftransport und Stoffumsatz in filamentösen Pilzpellets. 2008. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-38-9
- Band 33** Fürch, Tobias: Metabolic characterization of recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. 2008. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-39-6
- Band 34** Grote, Andreas Georg: Datenbanksysteme und bioinformatische Werkzeuge zur Optimierung biotechnologischer Prozesse mit Pilzen. 2008. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-40-120
- Band 35** Möhle, Roland Bernhard: An Analytic-Synthetic Approach Combining Mathematical Modeling and Experiments – Towards an Understanding of Biofilm Systems. 2008. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-41-9
- Band 36** Reichel, Thomas: Modelle für die Beschreibung des Emissionsverhaltens von Siedlungsabfällen. 2008. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-42-6
- Band 37** Schultheiss, Ellen: Charakterisierung des Exopolysaccharids PS-EDIV von *Sphingomonas pituitosa*. 2008. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-43-3
- Band 38** Dreger, Michael Andreas: Produktion und Aufarbeitung des Exopolysaccharids PS-EDIV aus *Sphingomonas pituitosa*. 1996. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-44-0

- Band 39** **Wiebels, Cornelia:** A Novel Bubble Size Measuring Technique for High Bubble Density Flows. 2009. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-45-7
- Band 40** **Bohle, Kathrin:** Morphologie- und produktionsrelevante Gen- und Proteinexpression in submersen Kultivierungen von *Aspergillus niger*. 2009. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-46-2
- Band 41** **Fallet, Claas:** Reaktionstechnische Untersuchungen der mikrobiellen Stressantwort und ihrer biotechnologischen Anwendungen. 2009. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-47-1
- Band 42** **Vetter, Andreas:** Sequential Co-simulation as Method to Couple CFD and Biological Growth in a Yeast. 2009. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-48-8
- Band 43** **Jung, Thomas:** Einsatz chemischer Oxidationsverfahren zur Behandlung industrieller Abwässer. 2010. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-49-5
- Band 45** **Herrmann, Tim:** Transport von Proteinen in Partikeln der Hydrophoben Interaktions Chromatographie. 2010. FIT-Verlag Paderborn, ISBN 978-3-932252-51-8
- Band 46** **Becker, Judith:** Systems Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* towards improved Lysine Production. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-426-6
- Band 47** **Melzer, Guido:** Metabolic Network Analysis of the Cell Factory *Aspergillus niger*. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-456-3
- Band 48** **Bolten J., Christoph:** Bio-based Production of L-Methionine in *Corynebacterium glutamicum*. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-486-0
- Band 49** **Lüders, Svenja:** Prozess- und Proteomanalyse gestresster Mikroorganismen. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-435-8
- Band 50** **Wittmann, Christoph:** Entwicklung und Einsatz neuer Tools zur metabolischen Netzwerkanalyse des industriellen Aminosäure-Produzenten *Corynebacterium glutamicum*. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-445-7
- Band 51** **Edlich, Astrid:** Entwicklung eines Mikroreaktors als Screening-Instrument für biologische Prozesse. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-470-9
- Band 52** **Hage, Kerstin:** Bioprozessoptimierung und Metabolomanalyse zur Proteinproduktion in *Bacillus licheniformis*. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-578-2

- Band 53 Kiep, Katina Andrea:** Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Morphologie und Produktbildung von *Aspergillus niger*. 2010. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-632-1
- Band 54 Fischer, Nicole:** Experimental investigations on the influence of physico-chemical parameters on anaerobic degradation in MBT residual waste. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-679-6
- Band 55 Schädel, Friederike:** Stressantwort von Mikroorganismen. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-746-5
- Band 56 Wichter, Johannes:** Untersuchung der L-Cystein-Biosynthese in *Escherichia coli* mit Techniken der Metabolom- und ¹³C-Stoffflussanalyse. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-750-2
- Band 57 Knappik, Irena Isabell:** Charakterisierung der biologischen und chemischen Reaktionsprozesse in Siedlungsabfällen. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-760-1
- Band 58 Driouch, Habib:** Systems biotechnology of recombinant protein production in *Aspergillus niger*. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-808-0
- Band 59 Gehder, Matthias:** Development and Validation of Indicators for the Production and Quality of Seed Cultures. 2011. Cuvillier-Verlag Göttingen, ISBN 978-3-86955-847-9





