



Katina Andrea Kiep (Autor)

Einfluss von Kultivierungsparametern auf die Morphologie und Produktbildung von *Aspergillus niger*



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/486>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1 Einleitung und Zielsetzung

Filamentös wachsende Pilze wie beispielsweise *Aspergillus niger* werden in zahlreichen Bioprozessen aufgrund ihrer Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen durchzuführen, und wegen ihrer effizienten Sekretionseigenschaften zur Synthese biotechnologischer Wertstoffe eingesetzt. Die Produktion von Proteasen, Exopolysacchariden, Nahrungsergänzungsmitteln oder Therapeutika stellt nur einen kleinen Auszug der metabolischen Vielseitigkeit filamentöser Pilze dar. Für verschiedene Industriezweige wird zukünftig ein rapider Anstieg des Anteils pilzlicher Produkte prognostiziert [Lubertozzi und Keasling, 2009]. Dabei liegt der Fokus durch die Etablierung gentechnischer Verfahren verstärkt auf der Produktion heterologer, hochwertiger Substanzen, vor allem für die medizinische Diagnostik und Therapie [Meyer et al., 2008]. Zwar kann die Produktivität homo- und heterologer Substanzen durch gentechnische Methoden deutlich erhöht werden, jedoch spielen auch die gewählten Prozessparameter des Herstellungsprozesses eine maßgebliche Rolle, um den gewünschten Produkttiter zu erhöhen.

Die Gesamtheit der Kultivierungsparameter, unter anderem pH-Wert, Temperatur, Medienzusammensetzung, Beschaffenheit des Inokulums sowie die fluidodynamischen Bedingungen im Reaktor und somit die mechanische Beanspruchung infolge des rührer- und begasungsinduzierten Leistungseintrags wird als Environom zusammengefasst. In Abhängigkeit vom Environom, vorrangig durch pH-Wert und Leistungseintrag beeinflusst, kann der filamentös wachsende Pilz *Aspergillus niger* zwei Grenzformen der Morphologie ausbilden, das frei dispergierte Myzel oder distinkte Pellets. Letztere entstehen in einem ersten Aggregationsschritt durch die Zusammenlagerung von Sporen zu Sporenpaketen. Ein Teil dieser Sporen keimt aus und bildet Hyphenelemente, an die sich in einem zweiten Aggregationsschritt weitere Sporen anlagern. Durch Wachstums- und Verzweigungsprozessen entwickeln sich schließlich definierte Pellets. Im Vergleich dazu zeichnet sich myzelartiges Wachstum durch die Bildung eines weitverzweigten Netzwerks von Hyphen aus.

Beide morphologische Formen haben ihre Vorteile und werden in industriellen Kultivierungsprozessen eingesetzt. Welche morphologische Ausprägung optimal für den Produktionsprozess ist, ist dabei abhängig vom gewünschten Produkt und dessen Eigenschaften. Neben der Abhängigkeit von der morphologischen Ausprägung wird die Produktbildung jedoch auch direkt durch die environomischen Bedingungen beeinflusst. Dabei gilt es, die Produktivität durch die Wahl geeigneter Parameter signifikant und gezielt zu maximieren. Auch die Freisetzung des Zielproduktes in den Kultivierungsüberstand als finaler Schritt der Produktbildung ist von hoher Wichtigkeit im Kultivierungsprozess, da

dadurch anschließende Aufarbeitungsprozesse vereinfacht werden. Die Sekretion des Produktes erfolgt allerdings nicht über die gesamte Biomasse, sondern vorwiegend an den Hyphenspitzen und wird ebenfalls durch das Environom beeinflusst. In den meisten industriellen Bioprozessen werden die Verfahrensparameter meist empirisch in „trial and error“-Versuchen ermittelt, eine Optimierung findet zumeist nicht statt. Eine systematische Analyse der Produktbildung und –freisetzung in Abhängigkeit vom Environom und von der Morphologie ist zur Bestimmung optimaler Prozessbedingungen jedoch unerlässlich, da so die Wirtschaftlichkeit des industriellen Produktionsverfahrens erheblich gesteigert werden kann.

Als übergeordnetes Ziel soll daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine umfassende Charakterisierung der Morphologie und Produktbildung am Beispiel des Modellstammes *Aspergillus niger* SKAN1015 in Abhängigkeit des Environoms erfolgen. Als Modellprodukt wird das homolog-rekombinante Enzym β -Fructofuranosidase (SUCA, EC 3.2.1.26) unter der Regulation des konstitutiven Promoters der Pyruvatkinase (*Ppki*) betrachtet. Mit Hilfe dieser Charakterisierung der Fructosyltransferaseproduktion mit *A. niger* sowohl auf genetischer als auch auf mikro- und makroskopischer Ebene sollen letztendlich Engpässe des Syntheseweges aufgedeckt und Optimierungspotentiale des Produktionsprozesses mit filamentösen Mikroorganismen aufgezeigt werden.

Dabei ergeben sich folgende Teilaufgaben:

- Beschreibung der Morphologie in Abhängigkeit vom Environom (pH-Wert, Leistungseintrag, Sporenkonzentration zu Kultivierungsbeginn),
- Darstellung der Produktbildung und –freisetzung unter Berücksichtigung environomischer sowie morphologischer Parameter,
- Analyse möglicher Limitierungen auf dem Weg vom Gen zum Produkt sowie
- Betrachtung intrazellulärer Prozesse zur Abschätzung des physiologischen Zustands der Biomasse.

Zur Aufklärung dieser Aufgaben wird in Batchkultivierungen im Labormaßstab der Einfluss des rührerinduzierten Leistungseintrags (6 bis 2919 W m^{-3}), der Sporenkonzentration zu Kultivierungsbeginn (10^4 bis 10^7 Sporen mL^{-1}) des pH-Wertes (pH 3 und 5,5) auf die Morphologie sowie die Produktbildung und –freisetzung untersucht. Kultivierungsbegleitend erfolgen die Bestimmung der Pelletgröße anhand bildanalytischer Auswerteverfahren sowie die Charakterisierung der Pelletstruktur über mikroskopische Aufnahmen und Mikrotomschnitte. Die Bildung von β -Fructofuranosidase wird ausgehend von der Genexpression über die Synthese bis hin zur Sekretion untersucht. Zur Analyse des physiologischen Zustands der Biomasse werden sowohl Stoffwechselprozesse als auch das Expressionslevel ausgewählter Gene aus den Bereichen Morphologie, Metabolismus, Stressantwort und Sekretion betrachtet.

2 Stand der Wissenschaft und Forschung

2.1 Filamentöse Pilze (*Aspergilli*)

Filamentöse Pilze der Gattung *Aspergillus* zählen innerhalb der Klasse der höheren Pilze, der Eumyceten, zur Gruppe der Ascomyceten (Schlauchpilze). Diese zeichnen sich durch das Wachstum als septiertes Hyphengeflecht und die Ausbildung von Konidiosporen aus. Ascomyceten sind in der Lage sich über zwei Reproduktionsmechanismen zu vermehren, sexuell über die Bildung von Ascosporen im Anschluss an die Meiose im Ascus oder asexuell durch die Bildung von Konidien. Dazu werden von vereinzelt Hyphen Konidiophoren (Sporenträger) gebildet, an denen die Konidien (Sporen) perlschnurartig angeordnet sind. Einige Pilze dieser Gattung, wie *Aspergillus niger*, sind ausschließlich zur asexuellen Fortpflanzung befähigt und gehören daher zu den Fungi imperfecti. Der Name *Aspergillus niger* leitet sich dabei von dem lateinischen Wort für Weihwasserwedel (*lat.: Aspergillum*), an den die mikroskopisch beobachtete Form erinnert, und von der schwarzen (*lat.: niger*) Pigmentierung der Konidien ab [Munk, 2001; Schlegel, 1992].

Innerhalb ihres natürlichen Habitates, vor allem im Erdboden, breiten sich *Aspergilli* als fädiges Pilzmyzel aus. Sie sind befähigt über einen weiten Temperaturbereich von 10 bis 50 °C sowie einen pH-Bereich von pH 2 bis 11 mit einem Optimum zwischen pH-Werten von pH 2 und 5 zu wachsen. Pilze sind als aerobe, chemoorganoheterotrophe Organismen ein essentieller Bestandteil des Ökosystems. Sie zersetzen organisches, hauptsächlich pflanzliches Material in niedermolekulare Verbindungen, die als Nährstoffe erneut genutzt werden können. Dabei werden vom pilzlichen Myzel extrazelluläre, lytische Enzyme ausgeschieden, die in der Lage sind, Makromoleküle wie beispielsweise Saccharose, Stärke, Pektin, Cellulose oder Lignin in ihre Untereinheiten zu hydrolysieren, so dass diese in die Zellen aufgenommen werden können und als Nährstoffquelle zur Verfügung stehen [Lubertozzi und Keasling, 2009; Munk, 2001; Schlegel, 1992, Schuster et al., 2002].

Aufgrund des breiten Spektrums an Exoenzymen und ihrer metabolischen Vielseitigkeit werden zahlreiche filamentöse Pilze als Wertstoffproduzenten kommerziell in unterschiedlichen Industriezweigen der weißen Biotechnologie eingesetzt, wie zum Beispiel in der Waschmittelherstellung, Lebensmittel- und Getränkeindustrie, Futtermittelindustrie, Lederverarbeitung oder Pharmaindustrie [Archer, 2000; Lubertozzi und Keasling, 2009; Meyer, 2008a; Papagianni, 2004]. Von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) wurden zahlreiche filamentöse Pilze der Gattung *Aspergillus* als gesundheitlich unbedenklich eingestuft, so dass diese für die Produktion von Lebensmitteln und Therapeutika eingesetzt

werden dürfen. Seit den frühen sechziger Jahren wurde dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger* sowie den von diesem Organismus produzierten Enzymen und Metaboliten der GRAS-Status (*engl., generally regarded as safe*) verliehen [Conesa et al., 2001; Schuster et al., 2002]. Bereits seit 1919 wird der Metabolit Citronensäure industriell mit *Aspergillus niger* produziert und hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie verwendet. Für das Jahr 2009 wurde ein Anstieg des globalen Marktwertes von Citronensäure und weiteren organischen Säuren, die mittels Pilzen großtechnisch erzeugt werden, auf drei Milliarden US\$ prognostiziert [Lubertozzi und Keasling, 2009]. Aber auch pilzliche Enzyme wie Proteasen, Lipasen, Amylasen, Pektinasen, Cellulasen oder Invertasen finden Anwendung in verschiedenen Industriezweigen, wobei mit über zwei Dritteln der Hauptteil dieser nativen Enzyme in der Lebensmittel-, Futtermittel- und Getränkeindustrie eingesetzt werden [Lubertozzi und Keasling, 2009].

Für eine effiziente und ökonomische Produktion dieser „Low-value“-Produkte ist die Fähigkeit der Pilze, ein breites Substratspektrum zu nutzen, von Vorteil, da somit eine Vielzahl von einfachen, kostengünstigen Substraten als Ausgangsstoffe in der Produktion eingesetzt werden können. Zusätzlich dazu verfügen filamentöse Pilze aufgrund ihrer saprophytischen Lebensweise über ein effizientes Sekretionssystem, so dass die gewünschten Produkte in den Kultivierungsüberstand abgegeben werden und das Down-Stream-Processing durch eine einfache Abtrennung der Biomasse erleichtert wird. Dabei werden Produktausbeuten von bis zu 30 gL^{-1} an extrazellulärem Protein erzielt [Conesa et al., 2001]. Als Eukaryoten sind Pilze darüber hinaus zu posttranslationalen Modifikationen, wie der korrekten Faltung und Glycosylierung von Proteinen, befähigt. Aufgrund dieser Eigenschaften sind filamentöse Pilze auch als Wirtsorganismen für die Produktion heterologer Proteine, vor allem Therapeutika, die bisher kostenintensiv in tierischen Zellkulturen erzeugt wurden, von Interesse. Da filamentöse Pilze über das Expressionssystem von Eukaryoten verfügen, aber gleichzeitig mit einem vergleichsweise geringen Aufwand bakterieller Produktionssysteme kultiviert werden, können folglich auch „High-value“-Proteine, insbesondere aus dem pharmazeutischen Bereich, mit rekombinanten Pilzstämmen kosteneffizient hergestellt werden [Lubertozzi und Keasling, 2009]. Allerdings werden für rekombinante Proteine deutlich geringere Ausbeuten, meist nur im mgL^{-1} -Bereich, erzielt. Zur Steigerung der Produktionsraten und Produktausbeuten heterologer Proteine sind daher eine Optimierung des Kultivierungsprozesses oder der weitere Einsatz von gentechnischen Methoden, beispielsweise die Wahl eines geeigneten Promoters oder das Einbringen von Multi-Copy-Gensequenzen des gewünschten Produktes, notwendig. [Archer und Peberdy, 1997; Archer, 2000; Conesa, 2001; Lubertozzi und Keasling, 2009, Meyer, 2008; Punt et al., 2002; Schuster et al., 2002; Wang et al., 2003, Wang et al., 2005].

2.2 Wachstum und Morphologie filamentöser Pilze

Die Morphologie und das Wachstum filamentöser Pilze können auf mikro- und makroskopischer Ebene beschrieben werden. Letztere beinhaltet die sichtbare morphologische Ausprägung von frei dispergiertem Myzel über Myzelbäume und Mischmorphologien zu distinkten Pellets. Neben der im Kultivierungsprozess beobachteten makroskopischen Morphologie ist auch die mikroskopische Morphologie für den Produktionsprozess entscheidend [Krull et al., 2010]. Die Mikromorphologie umfasst dabei die Struktur und den Aufbau der pilzlichen Zellwand, das Wachstum an der Hyphenspitze, die Kompartimentierung, sowie das Entstehen und die Häufigkeit von Verzweigungen [Kossen, 2000; Nielsen, 1996; Wucherpfennig et al., 2010].

2.2.1 Mikromorphologie

In Anwesenheit von Nährstoffen in der Umgebung werden pilzliche Sporen aktiviert und beginnen infolge der Wasseraufnahme zunächst isotrop aufzuquellen. Schließlich keimt die Spore durch Ausbilden eines einzelnen Keimschlauchs aus [d'Enfert, 1997; Harris et al., 1999; Osheroov und May, 2001]. Das Wachstum dieser Hyphe erfolgt mit linearer Ausdehnungsgeschwindigkeit ausschließlich an der Hyphenspitze. Über die gesamte Länge der Hyphe werden Vorläufermoleküle der Zellwand sowie Enzyme, die in die Zellwandsynthese involviert sind, synthetisiert und anschließend, ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), in Vesikeln zum Ort der Zellwandsynthese transportiert. Das Netzwerk des ERs weist in der Verteilung innerhalb der Pilzzelle ebenfalls einen Gradienten zur Hyphenspitze auf, wodurch der zielgerichtete Transport der Vesikel aufrechterhalten wird [Maruyama et al., 2006; Maruyama und Kitamoto, 2007]. Eine maßgebliche Rolle in der Koordinierung der Lokalisation von Zellorganellen, cytoplasmatischen Migration, Zellwandsynthese und Enzymsekretion sowie in der Aufrechterhaltung des apikalen Wachstums kommt dabei dem Cytoskelett, bestehend aus Actinfilamenten und Microtubuli, zu [Jackson and Heath, 1993; McIntyre et al., 2001; Torralba et al., 1998]. Filamentöses Actin (F-Actin) akkumuliert an der Hyphenspitze [Bachewich und Heath, 1998; Jackson und Heath, 1993; McIntyre et al., 2001; Xiang und Morris, 1999] und wird von Calcium (Ca^{2+})-Ionen, deren Konzentration in Richtung der Hyphenspitze zunimmt und somit ebenfalls einen Gradienten aufweist, reguliert [Jackson und Heath, 1993b]. Die Sekretion von Enzymen und das Auftreten von Verzweigungen ist ebenfalls mit dem Konzentrationsgradienten der Ca^{2+} -Ionen verknüpft [Reissing und Kinney, 1983; Torralba et al., 1998]. Der Transport der Vesikel mit Zellwandbestandteilen und Enzymen entlang des polarisierten Cytoskeletts erfolgt durch Microtubuli assoziierte Proteine, beispielsweise Kinesin und Dynein, sowie Actin-bindende Proteine [Jackson und Heath, 1993; Konzack et al., 2005; McIntyre et al., 2001; Xiang und Morris, 1999]. An der Hyphenspitze akkumulieren die Vesikel als sogenannter Spitzenkörper, der dort bis zu 80% des Cytoplasmas einnimmt [Bartnicki-Garcia et al., 1995; Howard, 1981; Kossen, 2000]. Durch den Spitzenkörper werden sowohl die schlauchförmige Gestalt als auch

die Wuchsrichtung und –geschwindigkeit der Hyphe determiniert [Bartnicki-Garcia et al., 1995; McIntyre et al., 2001; Reynaga-Pena und Bartnicki-Garcia, 1997].

Die Zellwand filamentöser Pilze besteht hauptsächlich aus Chitin (10-20 %), Glucanen (50-60 %) und Glycoproteinen (20-30 %). Chitinketten, Polymere aus β -1,4-verknüpften-N-Acetylglucosamin, verleihen der pilzlichen Zellwand ihre Festigkeit und tragen zur Zellwandintegrität bei. Die hohe Zugfestigkeit ergibt sich dabei aus der Bildung von Chitin-Mikrofibrillen, die durch Wasserstoff-Brückenbindung aus den linearen Chitinketten entstehen. Die Chitinfibrillen sind in eine Matrix von Glucanen, vorwiegend β -1,3-Glucan eingebettet. Die Glucane dienen somit als strukturelle Komponente für den korrekten Zellwandaufbau und als Bindestelle für weitere Zellbestandteile. Die Glycoproteine als Zellwandbestandteil sind an der Zellwandsynthese, Signaltransduktion sowie der Aufnahme von extrazellulären Substanzen beteiligt und spielen eine Rolle in der Stabilisierung der Hyphengestalt und Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Zellwand [Bartnicki-Garcia, 1968; Bowman und Free, 2006; de Nobel et al.; 2000; Fontaine et al., 1997; Kossen, 2000; McIntyre et al.; 2001; Müller et al., 2002; Roncero, 2002; Wessels, 1992]. Die Festigkeit der pilzlichen Zellwand ist dabei auch essentiell, um dem inneren, osmotischen Druck standzuhalten und entgegenzuwirken. Gleichzeitig muss sie eine gewisse Formbarkeit und Flexibilität aufweisen, um ein Wachstum der Hyphenspitze zu gewährleisten und das Entstehen von Verzweigungen zu ermöglichen. Über die Zellwand der Hyphen erfolgt die Wechselwirkung der Pilzzelle mit der Umgebung. Beispielsweise werden als Antwort auf extrazelluläre Signale oder milieubedingten Stress intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert. So kann die Hyphe auf Veränderungen der Umgebung mit einer Anpassung der Zellwandstruktur und Hyphenmorphologie reagieren. [Bowman und Free, 2006; de Nobel et al., 2000; Pel et al., 2007; Roncero, 2002]

Im Anschluss an eine anfängliche Beschleunigungsphase erfolgt das weitere Wachstum der Hyphe mit maximaler Geschwindigkeit, wobei der Vesikeltransport zum Ort der Zellwandsynthese mit konstanter Rate erfolgt und somit den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt darstellt [Grimm et al., 2005a; Prosser and Trinci, 1979]. Die Septierung der Hyphen ist mit der Mitose und folglich der Anzahl der Zellkerne in einem Hyphenkompartiment verknüpft. Für *Aspergillus nidulans* konnte gezeigt werden, dass das erste Septum gebildet wird, sobald acht Zellkerne im Keimschlauch durch mehrere Mitoserunden entstanden sind. Durch die Bildung des Septums wird die Hyphe in ein apikales und ein subapikales Kompartiment geteilt [Grimm et al., 2005a; Momany und Hamer, 1997]. An der äußersten Hyphenspitze befindet sich das apikale Kompartiment, das durch das Septum, welches den Austausch von Cytoplasma ermöglicht, mit dem subapikalen Kompartiment verbunden ist [Nielsen, 1993]. Subapikale Kompartimente weisen meist eine einheitliche Länge auf und enthalten drei bis vier Zellkerne [Kaminsky und Hamer, 1998]. Im Gegensatz dazu variiert die Länge apikaler Regionen und deren Anzahl an Zellkernen in Abhängigkeit von den Mitosezyklen und dem aktiven Wachstum [Kaminsky und Hamer, 1998]. Mit fortschreitender Verlängerung der Hyphe erfolgt die Bildung weiterer Septen, so dass apikale Kompartimente zunächst zu

subapikalen Kompartimenten werden, während subapikale Bereiche in inaktive Hyphenkompartimente übergehen [Nielsen, 1993].

Infolge von Anhäufung und schließlich Überschuss an Transportvesikeln mit Zellwandbestandteilen, die das Septum nicht passieren können, treten in subapikalen Hyphenbereichen schließlich Verzweigungen auf [Aynsley et al., 1990; Kaminsky und Hamer, 1998; Nielsen, 1996; Prosser und Trinci, 1979]. Mit zunehmender Entfernung von der Spitze enthalten die Hyphenkompartimente häufiger große Vakuolen und zeigen kein aktives Wachstum [Kaminsky und Hamer, 1998; McIntyre et al., 2001; Nielsen, 1993]. Auch sind in diesen Hyphenbereichen im Vergleich zu apikalen und subapikalen Kompartimenten andere metabolische Prozesse aktiviert [Nielsen, 1993; Thomas, 1992]. Mit voranschreitendem Zellalter nimmt die Vakuolisierung dieser Bereiche zu, bis schließlich autolytische Prozesse auftreten [White et al., 2002]. Die Differenzierung der Hyphe in verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichen metabolischen Prozessen hat zur Folge, dass in Hyphenregionen, die in ihrem Wachstum arretiert sind, hauptsächlich Sekundärmetabolite gebildet werden, während in aktiven Hyphenbereichen, den apikalen und subapikalen Kompartimenten, wachstumsassoziierte Proteine und Primärmetabolite synthetisiert werden [McIntyre et al., 2001; Nielsen, 1993; Thomas, 1992]. Die Sekretion von Proteinen erfolgt vorwiegend in apikalen Kompartimenten an Orten der Zellwandsynthese unter der Annahme, dass die Zellwand in diesen hochdynamischen Bereichen größere Poren infolge der erhöhten Plastizität aufweist [Barry et al., 2009; McIntyre et al., 2001; Peberdy, 1994; Wessels, 1992; Wosten et al., 1991]. Während einige Studien eine Korrelation von sekretiertem Produkt mit zunehmender Verzweigung und somit Spitzenanzahl nachweisen konnten, beispielsweise die erhöhte Sekretion von heterologem Hühnereiweiß-Lysozym mit einem stärker verzweigten *A. niger*-Myzel [Wongwicharn et al., 1999a], konnte in anderen Studien kein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Hyphenspitzen und der Proteinsekretion festgestellt werden [Bocking et al., 1999].

Die mikroskopische Morphologie, basierend auf den Prozessen Spitzenverlängerung, Septierung und Hyphenverzweigung, kann durch folgende Parameter charakterisiert werden: Gesamtlänge der Hyphe, Hyphendurchmesser, Anzahl der Spitzen, Wachstumsgeschwindigkeit an der Hyphenspitze sowie die Verzweigungshäufigkeit [Grimm et al., 2005a; Metz et al., 1981; Nielsen, 1996; Trinci, 1974, Wucherpennig et al., 2010]. Obwohl die Verlängerung der Hyphenspitze mit einer konstanten Wachstumsrate und folglich linear erfolgt, resultiert aufgrund der Zunahme von Verzweigungsgrad und Spitzenzahl für das gesamte Myzel ein exponentielles Wachstum mit einer spezifischen, maximalen Wachstumsrate, sofern keine Limitierungen durch Substrat- und Nährstoffmangel auftreten [Aynsley et al., 1990; Grimm et al., 2005a].