

# 1 Einleitung

Unter dem Begriff Biotechnologie versteht man definitionsgemäß die Wissenschaft der technischen Nutzbarmachung lebender Organismen, ihrer Bestandteile oder Produkte. Biotechnologische Produktionsverfahren werden seit je her eingesetzt – Bier, Wein, Käse und Brot sind nur einige Produktbeispiele. Dabei wurden die Stoffwechselleistungen der beteiligten Mikroorganismen, die die Herstellung dieser Produkte ermöglichen, zunächst unbewusst genutzt, ohne etwas über die Existenz oder Funktion von Bakterien, Hefen oder Pilzen zu wissen. Die Mikrobiologie, ein Wissenschaftszweig, der diese mikroskopisch kleinen Lebewesen erforscht, ermöglichte die detaillierte Analyse und Aufklärung ihres Stoffwechsels, so dass bald ein systematischer, gezielter Einsatz dieser Organismen erfolgen konnte und ihr Potenzial, weitere interessante Produkte herstellen zu können, entdeckt wurde. Zu den bedeutendsten mikrobiellen Produkten gehören die Proteine, die wichtige katalytische Funktionen in vielen Bereichen des alltäglichen Lebens übernehmen – sei es die Protease, die als Waschmittelzusatz die Textilreinigung effizienter gestaltet oder das Insulin, dessen weltweit zunehmender Bedarf ohne die mikrobielle Produktion nicht zu decken wäre.

Voraussetzung für die Aufnahme eines solchen biotechnologischen Proteinproduktionsprozesses ist dessen Wirtschaftlichkeit, so dass die Optimierung der Produktbildung das übergeordnete Ziel darstellt. In der Vergangenheit war die Herangehensweise an solche Optimierungen durch sogenanntes „trial and error“ geprägt, bei dem inter- und intrazelluläre Vorgänge unberücksichtigt blieben und als sogenannte „Black Box“ beschrieben wurden. In den letzten Dekaden hat jedoch eine rasante Entwicklung analytischer Methoden

stattgefunden, die aus den unterschiedlichsten Disziplinen rekrutiert werden und in zunehmendem Maße zur Entwicklung einer „Transparent Box“ beitragen. Der Sonderforschungsbereich 578 „Integration gen- und verfahrenstechnischer Methoden zur Entwicklung biotechnologischer Prozesse – Vom Gen zum Produkt“, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstand, leistet hierzu einen großen Beitrag. Der große Nutzen besteht darin, eine ausführliche Charakterisierung der biotechnologischen Produktion zu erreichen, um somit genaue Einblicke in die inter- und intrazellulären Prozesse zu bekommen, was wiederum die Optimierung erleichtert und effizienter gestaltet.

In der vorliegenden Arbeit wird ein biotechnologischer Prozess in Biopellets des filamentösen Pilzes *Aspergillus niger* hinsichtlich der Produktion eines homologen (Glucoamylase) und eines heterologen (Green Fluorescent Protein: GFP) Proteinprodukts mittels verschiedener analytischer Methoden charakterisiert. Bei der Kultivierung von *A. niger* spielt die Morphologie, als interzelluläre Erscheinung eine bedeutende Rolle bei der Produktbildung und wird maßgeblich auch durch verfahrenstechnische Parameter wie z. B. den Rührerleistungseintrag im Bioreaktor beeinflusst. Fragen bezüglich der Ausprägung der Zellheterogenität und der davon abhängigen Lokalisierung des GFP innerhalb des Bioaggregats werden hier für unterschiedliche Rührerintensitäten mit Hilfe der Laser Scanning Mikroskopie geklärt.

Durch den Einsatz der Real Time RT-PCR und sogenannter custom made DNA-Arrays werden produkt spezifische und prozessrelevante Genexpressionsdaten aufgenommen und, im Fall der Glucoamylase und GFP spezifischen Genexpression, mit den entsprechenden Proteindaten abgeglichen, um mögliche Prozesslimitierungen auf Transkriptions- und/oder Translationsebene aufzudecken und um zu klären, inwieweit die Erkenntnisse über ein homologes Proteinprodukt auf ein heterologes übertragbar sind. Es soll beurteilt werden inwieweit sich die Berücksichtigung der erhobenen Daten für die Verfahrensoptimierung eignet und welche Daten möglicherweise eine Vorhersage der Produktbildung erlauben.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 *Aspergillus niger*

Der filamentöse Pilz *Aspergillus niger* gehört innerhalb der Klasse der höheren Pilze (Eumycota) zur Gattung der Ascomyceten, den sogenannten Schlauchpilzen. Sein gewöhnliches Habitat ist der humide Erdboden, in dem er, neben anderen Mikroorganismen, überwiegend saprophytischen Tätigkeiten nachgeht. Dieser biologische Abbau toten, organischen, überwiegend pflanzlichen Materials stellt einen der wichtigsten Recyclingprozesse in der Natur dar. Dieser Prozess erfolgt sehr effizient, da *A. niger*, wie auch andere Pilzvertreter, über ein exzellentes Sekretom verfügt, welches u. a. hydrolytische Enzyme beinhaltet. Durch das netzwerkartige Wachstum in Form filamentöser Hyphen kann der Enzymcocktail flächig über dem polymeren Substrat ausgebreitet werden, so dass nach erfolgter Hydrolyse eine Nährstoffaufnahme in Form geringer proportionierter Moleküle (einfache Zucker, Aminosäuren) möglich ist.

Diese durchaus nützliche Eigenschaft der Pilze befähigt sie allerdings auch dazu, humane Nahrungsquellen und anderweitige Nutzpflanzen zu kontaminieren und als Pflanzenpathogen zu agieren. Auch stellen einige Pilzvertreter problematische Humanpathogene (z. B. *A. fumigatus*) dar.

Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit steht der Nutzen, der sich durch den Einsatz des filamentösen Pilzes *A. niger* ergibt und der mit der Erwähnung des

enzymhaltigen Sekretoms bereits angedeutet wurde - *Aspergillus niger* als Wertstoffproduzent für die Biotechnologie.

### 2.1.1 Wertstoffproduzent in der Biotechnologie

Der Einsatz *Aspergillus niger* in der Biotechnologie geht bis an den Anfang des vergangenen Jahrhunderts zurück. 1917 wurde das erste Herstellungsverfahren von Citronensäure technisch realisiert. Die Produktionsmenge dieses zunächst im Oberflächenverfahren durchgeführten Prozesses lag 1927 bereits bei 5000 Tonnen pro Jahr [Syldatk 2006]. Heute kommen jedoch verstärkt submerse Fermentationen zum Einsatz, wobei die Jahresproduktion 1997 bei 700.000 Tonnen lag, die einen Marktwert von 700 Millionen US\$ erzielten [Schmid 2002]. Der Einsatz von Citronensäure erfolgt vorwiegend in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksabrunder und Konservierungsmittel. Aber auch in der pharmazeutischen (Konservierungsmittel) und chemischen Industrie (Waschmittelzusatz, Behandlung von Textilien) findet Citronensäure Verwendung [Syldatk 2006].

Bald wurde aber auch das Potential *A. niger* zunächst zur Produktion homologer extrazellulärer Enzyme erkannt. Bekannte Beispiele sind Pektin spaltende Enzyme, Proteasen sowie Stärke spaltende Enzyme wie die Glucoamylase (Kapitel 2.3.1), die von *A. niger* produziert und industriell genutzt werden.

Mit dem Aufkommen und der rasanten Weiterentwicklung der gentechnischen Modifikation von Mikroorganismen Mitte der 1980er Jahre, in denen erstmals ein mikrobielles Verfahren zur Produktion von Humaninsulin in dem prokaryotischen Expressionssystem *Escherichia coli* durchgeführt werden konnte, wurde der Weg für die rekombinante Proteinproduktion auch für eukaryotische Systeme, zu denen der filamentöse Pilz *A. niger* gehört, geebnet. Vor allem die Produktion heterologer (wirtsfremder) Proteine, die im Falle pharmazeutischer Produkte wegen ihrer hohen Wertschöpfung von großer Bedeutung sind, hat ein besonderes Forschungsinteresse erfahren. Aber auch die Entdeckung neuer homologer Proteine mit interessanten enzymkatalytischen Eigenschaften erfordert zum Teil

gentechnische Modifikationen (z. B. Multicopy-Stämme), um die entsprechenden Prozesse wirtschaftlich rentabel zu gestalten [Archer und Peberdy 1997].

Der Vorteil der Nutzung *A. niger* als Produzent rekombinanter biologischer Wertstoffe liegt vor allem in der relativ einfachen Gewinnung der ins Kulturmedium sekretierten Proteine, die im Vergleich zu bakteriellen Prozessen leichter vom pilzlichen Zellmaterial abgetrennt werden können. Neben diesem, den Downstreamprozess betreffenden Vorteil, bietet *A. niger* durch seinen GRAS-Status (*engl.*: generally regarded as safe) erhebliche Vorteile bei der Prozesszulassung, womit die betroffenen Verfahren in ihrer Aufnahme eine erhebliche Zeitersparnis erfahren, und die entsprechenden Produkte können nach erfolgter Aufarbeitung und Reinigung unbedenklich in der pharmazeutischen und Nahrungsmittelindustrie eingesetzt und vertrieben werden [Schuster et al. 2002].

Auf molekularer Ebene bietet *A. niger* den Vorteil, die produzierten Proteine ähnlich dem humanen Muster zu glycosylieren, was eine wichtige Rolle bei therapeutisch eingesetzten Biopharmaka spielt, da eine unkorrekte Glycosylierung oft zu Unverträglichkeit oder Unwirksamkeit des Präparats führt. Darüber hinaus dürften genetische Modifikationen aufgrund der mittlerweile vollständig vorliegenden Genomsequenz und teilweiser Kenntnis von Genfunktionen zunehmend Fortschritte machen. Allerdings kann die rasante Entwicklung in der Transformationstechnologie allein keine Optimierung der Produktausbeuten realisieren. Vielmehr ist die Kombination rekombinanter DNA-Technologie mit verfahrenstechnischen Optimierungen anzustreben, um das Ziel, einen effizienten Prozess zu etablieren, zu erreichen [Archer und Peberdy 1997].

Dabei liegen gerade auf verfahrenstechnischer Seite große Herausforderungen in der Kultivierung filamentöser Pilze, die sich vor allem durch die Vielfalt der möglichen Morphologien dieser Mikroorganismen ergeben.

### 2.1.2 Morphologie und Produktbildung

*Aspergillus niger* vermehrt sich asexuell durch die Bildung und Verbreitung von Sporen. Neben dieser Funktion haben Sporen aber auch eine Überdauerungsfunktion unter ungünstigen Lebensbedingungen. Dieser als Keimruhe bezeichnete Zustand ist reversibel und kann durch das Vorhandensein günstiger exogener Faktoren aufgehoben werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei Temperatur, pH-Wert, Umgebungsfeuchte sowie das Nahrungsangebot. Für die Keimung ist der Prozess der Wasseraufnahme essentiell und erfordert eine Veränderung in der Zellwandpermeabilität. Durch die Wasseraufnahme kommt es zur Schwellung der Spore. Innerhalb dieser tritt eine punktuelle Ansammlung von Vesikeln nahe der Zellwand auf. Diese sorgen zum einen für die Bereitstellung neuen Zellwandmaterials und enthalten zum anderen Zellwand degradierende Enzyme, die den Umbau der Wand realisieren können. Es folgt die Ausbildung des Keimfadens durch die Sporenwand. Dieser Prozess wird durch Kombination zweier Aktionen bewerkstelligt: der enzymatischen Degradation einer kleinen Region der Wand und den physikalischen Druck, der durch den Protoplasten ausgeübt wird. Der Keimfaden wächst schließlich zu einer Hyphe heran, die sich durch apikales Wachstum auszeichnet, was wiederum u. a. durch in der Hyphenspitze lokalisierte Vesikel ermöglicht wird, deren Ansammlung als apikaler vesikulärer Komplex bezeichnet wird [Tariq 2008].

Die Gesamtheit der Hyphen, die sich in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen mehr oder weniger verzweigen können, bildet eine netzwerkartige Struktur aus, die als Myzel bezeichnet wird [Schlegel und Zaborosch 1992]. Dabei sind die Hyphen in regelmäßigen Intervallen durch Septen kompartimentiert, die Poren enthalten, so dass eine Verbindung zwischen den Kompartimenten besteht. Hierdurch wird beispielsweise eine cytoplasmatische Strömung ermöglicht [Tariq 2008].

Der Aufbau der bereits erwähnten Zellwand ist sehr komplex. Mehrere Schichten aus Proteinen, Glycoproteinen, Chitin und Glucan sind zu einem Netzwerk verbunden, welches zum einen zur Stabilität der Hyphen und ihrer Gestalt

beiträgt, zum anderen aber auch Schutz gegenüber äußeren Faktoren bietet. Dabei ist die Zellwand nicht als starres Gebilde zu verstehen, sondern als hochdynamische Struktur, die als Antwort auf veränderte zelluläre Prozesse sowie äußere Bedingungen einem permanenten Wandel unterliegt [Damveld 2005c]. Darüber hinaus bindet die Zellwand zahlreiche hydrolytische Enzyme, die vor allem an der Erschließung polymerer Nahrungsquellen beteiligt sind.

Die dynamische Struktur der Pilzzellwand sowie die Zusammensetzung der an ihr haftenden Oberflächenproteine führt zu einer hohen morphologischen Diversität. Neben der dispersen myzelaren Wuchsform treten als anderes Extrem pilzliche Aggregate, sogenannte Pellets auf. Verfahrenstechnisch bieten beide Wuchsformen sowohl Vor- als auch Nachteile. Bei der Kultivierung in Myzelform treten mitunter hohe Viskositäten in der Kulturbrühe auf, die die Durchmischung des Reaktorinhalts problematisch machen. In diesen Fällen kommt es zur Ausbildung von Konzentrationsgradienten innerhalb des Reaktors. Bei einer Pelletkultivierung hingegen weist die Kulturbrühe annähernd Newton'sches Fließverhalten geringer Viskosität auf, was eine homogene Durchmischung des Reaktorinhaltes ermöglicht. Aber auch hier kommt es zur Ausbildung von Konzentrationsgradienten, die allerdings innerhalb des Aggregats selbst zu finden sind und je nach struktureller Beschaffenheit der Pellets unterschiedlich ausgeprägt sein können [Kossen 2000, Hille 2008].

Die Wahl der für das gewünschte Produkt optimalen Morphologie erfolgt aufgrund der Unkenntnis entsprechender Zusammenhänge oftmals empirisch [Grimm et al. 2005, Grimm 2006]. Für filamentöse Mikroorganismen werden in biotechnologischen Produktionsprozessen disperse Myzelstrukturen, Pellets aber auch heterogene Morphologien vorgefunden. In Myzelkultivierungen führte die Erkenntnis, dass die Sekretion produzierter Proteine vorwiegend an den Spitzen der Pilzhyphe erfolgt, zu Ansätzen, die die Selektion oder auch Mutation von Stämmen verfolgten, die sich durch eine erhöhte Verzweigungsrate auszeichnen, wobei diese Strategie nicht zwingend mit höheren Produktausbeuten einherging [Bocking et al. 1999]. Bei Pelletkultivierungen liegt der Fokus der Betrachtungen der Morphologieausprägung vorwiegend auf der Aggregatgröße und -struktur, die

vor allem die Substratversorgung durch auftretende Stofftransportlimitierungen beeinflussen [Hille et al. 2006] und im Submersverfahren im Wesentlichen durch die Intensität des Rührens variiert werden können. Aber auch hier gibt es bezüglich der anzustrebenden Morphologie widersprüchliche Resultate, da die erhaltenen Produktivitäten durchaus unterschiedlich ausfallen [Wang et al. 2003, El-Enshasy et al. 2006, Papagianni et al. 1999, Li et al. 2002, Jafari et al. 2007, James et al. 2007]. Generell ist zu bemerken, dass für die Produktivität eines Mikroorganismus nicht allein die Morphologie eine Rolle spielt. Zahlreiche andere Faktoren, vor allem auf molekularer Ebene, wie z. B. die genetische Konstitution, sind für eine effiziente Proteinproduktion von Bedeutung (Kapitel 2.2)

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Prozesscharakterisierung bei Pelletkultivierungen durchgeführt, so dass im folgenden Kapitel auf die die Pelletentstehung und -morphologie beeinflussenden Parameter eingegangen wird.

### 2.1.3 Pelletkultivierung

Filamentöse Mikroorganismen weisen verschiedene Pelletbildungsarten auf. Beim nicht-koagulativen Mechanismus, der bei einigen Streptomycceten auftritt, können die Aggregate aus einzelnen Sporen entstehen. Ein weiteres Beispiel für die Pelletbildung ohne vorherige Sporenaggregation, und die sich durch die Anlagerung von Hyphen und Myzelästen aneinander auszeichnet, zeigt sich bei der Kultivierung von *Penicillium chrysogenum*. Die koagulativen Myzelbildner, zu denen auch *A. niger* gehört, weisen wiederum einen Mechanismus auf, bei dem sich zunächst Sporen zu Sporenpaketen aneinander lagern (Interaktion Spore-Spore) bis sich ein Gleichgewicht zwischen aggregierten und dispersen Sporen eingestellt hat. Auf diesen als primäre Aggregation bezeichneten Prozess folgt das Auskeimen und damit die Entstehung von Hyphen. Die sich anschließende sekundäre Aggregation ist durch die Interaktion Spore-Hyphe charakterisiert, die in einer Flockenbildung resultiert. Durch fortschreitendes Wachstum und die Ausbildung von Verzweigungen kommt es schließlich zur Pelletbildung (**Abbildung 2.1**) [Grimm 2006, Kelly 2006].



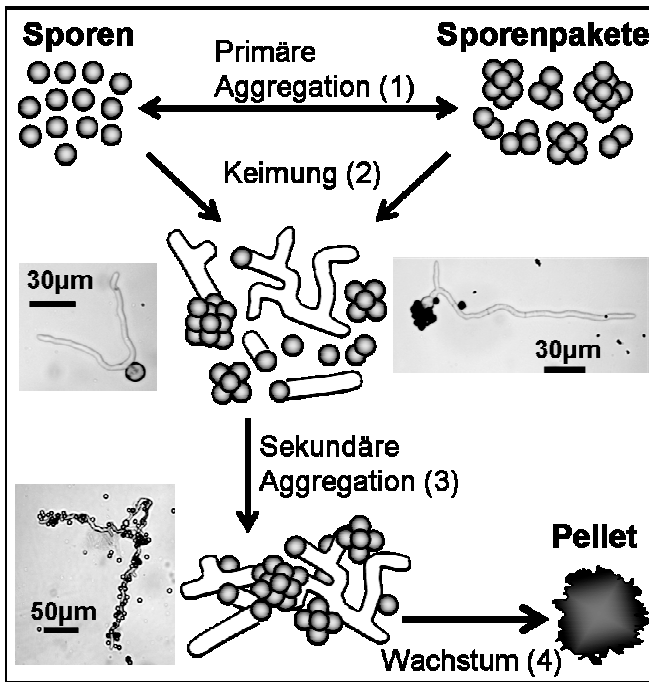


Abbildung 2.1: Aggregationsmodell nach Grimm (2006)

Die beschriebenen Aggregationsprozesse werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst [Reichl et al. 1992]. So haben die Konzentration des Inokulums, der pH-Wert, das Kultivierungsmedium aber auch die genetische Konstitution des Stammes große Auswirkungen auf den Prozess der primären Aggregation [Grimm 2006]. Hierbei spielt vermutlich u. a. das Muster der auf der Sporenoberfläche anhaftenden Proteine, welches durch die Bandbreite genannter Faktoren sehr variabel ausgeprägt sein kann, eine große Rolle. Mit fortschreitendem Aggregationsprozess und zunehmender Größe der Flocken wächst auch die Beeinflussung der Aggregate durch die im Bioreaktor herrschende, durch Rührorgane und Begasungseinheiten hervorgerufene Fluidodynamik [Grimm 2006, Kelly 2006].

Neben anderen Faktoren wurde der Einfluss der Drehgeschwindigkeit der Rührorgane intensiv untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass diese signifikante Änderungen in der Morphologie und Produktivität bedingt [Papagianni 1999, Kelly 2006]. Außerdem haben Studien ergeben, dass sich Änderungen in der Zellwandzusammensetzung ergeben und dass bestimmte Strukturen der Zellwand in Resistenzmechanismen gegenüber der mechanischen Beanspruchung involviert zu sein scheinen [Reichle und Alexander 1965]. Bezüglich der Auswirkungen der mechanischen Belastung auf die Aggregate geht man davon aus, dass die Pellets weniger einen Bruch erfahren, sondern dass sich durch das Abscheren exponierter Hyphen eine Veränderung in ihrer Morphologie vollzieht [Cui et al. 1998]. So entstehen mit zunehmender Scherung im Reaktor Pellets mit geringeren Durchmessern und einer kompakteren Struktur im Randbereich aufgrund höherer Verzweigungsraten [Rodriguez Porcel et al. 2005, Kelly 2006].

Wegen des bereits erwähnten Zusammenhangs zwischen Produktivität und Morphologie ist gerade bei biotechnologischen Produktionsprozessen eine Kontrolle der morphologischen Entwicklung oft erwünscht, wird aber durch die komplexen Vorgänge erschwert [Cui et al. 1998]. Hinzu kommt, dass aussagekräftige, zum Beschreiben der Morphologie geeignete Messparameter oft nur unter großem Aufwand zugänglich sind. Viele Studien, die sich mit der Charakterisierung der Morphologie von Biopellets befassen, nutzten dazu Parameter wie den Pelletdurchmesser, die Länge der vom Pelletrand exponierten Hyphen, die mittlere Biomassedichte eines Pellets oder auch auf Größenverteilungsmessungen basierende Populationsbilanzen [Kelly 2006, Casas Lopez et al. 2005, Rodriguez Porcel et al. 2005].

Allerdings sind diese Parameter allein nicht aussagekräftig genug, um von einer morphologischen Ausprägung auf die resultierende Produktivität schließen zu können. Eine wichtige Größe, die zusätzlich zu berücksichtigen ist, ist die Pelletstruktur, insbesondere die Biomasseverteilung im Randbereich der Aggregate, da diese die vorliegenden Transport- und Verbrauchsdaten der zur Verfügung stehenden Substrate determiniert und somit die Produktivität der