
1. Einleitung und Zielsetzung

Die weltweite Nachfrage nach nachhaltigen Produktionsprozessen wächst stetig. Filamentöse Bakterien und Pilze übernehmen dabei zunehmend die Rolle universeller und effizienter Zellfabriken. In zahlreichen biotechnologischen Industriezweigen werden sie beispielsweise zur nachhaltigen Synthese von organischen Säuren, Antibiotika oder Enzymen eingesetzt. Bereits heute wird ein Großteil der bekannten Antibiotika durch filamentöse Bakterien wie Actinomyceten hergestellt [1–3]. Auch für Produkte fungalen Ursprungs wird weiterhin ein signifikanter Umsatzanstieg an den Märkten prognostiziert [4].

Allerdings stellt die Erzielung hoher Produktausbeuten mit filamentösen Mikroorganismen oftmals eine Herausforderung dar. Im Gegensatz zu einzelligen prokaryotischen Produzenten kann ihr zelluläres Erscheinungsbild, das durch filigrane Hyphen geprägt ist, stark variieren – von dispersem Mycel über Klumpen bis hin zu Pelletstrukturen. Die optimale Morphologie für eine hohe Produktivität ist dabei stark stammspezifisch sowie prozess- und produktabhängig. Neben der konventionellen prozesstechnischen Steuerung wurden daher in jüngerer Vergangenheit ergänzende *Morphology Engineering*-(ME)-Strategien entwickelt, die eine gezielte Einflussnahme auf die Morphologie und damit die Erhöhung finaler Produktkonzentrationen und Produktivitäten ermöglichen. Dazu gehört beispielsweise die Supplementation von Metalloxiden, Salzen oder oberflächenaktiven Substanzen [5,6].

Als prokaryotisches Modell für ME-Strategien zur Steigerung der Synthese des antibiotischen Sekundärmetaboliten Rebeccamycin hat sich der Actinomycet *Lentzea aerocolonigenes* bewährt. Es wurde nachgewiesen, dass sich im Schüttelkolbenmaßstab durch die Supplementation von Mikro- und Makropartikeln aus Glas sowie des Emulgators Lecithin eine signifikante Verbesserung der Kultivierungsergebnisse erzielen lässt [7–12]. Aufgrund der ausgeprägten Schersensitivität dieses filamentösen Organismus gestaltet sich ein Scale-up in den Reaktormaßstab als herausfordernd. Die fragile Hyphenstruktur von Actinomyceten reagiert empfindlich auf konventionelle Begasung, da die Blasenbildung am Gaseintragssystem bzw. der hydraulische Sprung des Gases an der Flüssigkeitsoberfläche zu strukturellen Schäden führen kann. Ein erster Ansatz für ein blasenfreies Begasungssystem für die Kultivierung von *L. aerocolonigenes* im Bioreaktor wurde von Schinner (2020) entwickelt [12]. Dieses Membranbegasungssystem erwies sich jedoch als langfristig unzuverlässig und ungeeignet für parallele Kultivierungen. Ein Ziel dieser Arbeit bestand daher zunächst in der Entwicklung, Charakterisierung (hinsichtlich volumenbezogenem Sauerstofftransferkoeffizienten $k_{L,a}$, Sauerstofftransferrate OTR , volumenbezogenem Leistungseintrag P_V und Mischzeit t_M) sowie der Implementierung eines neuartigen Membranbegasungssystems für einen konventionellen 3 L-Bioreaktor zur Kultivierung von *L. aerocolonigenes* (**Kap. 4.1**). Im Hinblick auf ein potenziell anschließendes Downstream

Processing sollte zudem eine Strategie zur Isolierung von Rebeccamycin erarbeitet und eine erste Charakterisierung des antimikrobiellen Potenzials dieses Wirkstoffs durchgeführt werden.

Bei filamentösen Pilzen dienen verschiedene *Aspergillus niger*-Stämme als etablierte Modellorganismen für ME-Strategien, insbesondere zur Verbesserung der Synthese ihrer charakteristischen Modellenzyme, zu denen beispielsweise Pektinasen, Proteasen und Lipasen gehören [13,14]. Sowohl für *A. niger* als auch für *L. aerocolonigenes* stellt in submerser Kultur das Pellet die bevorzugte Morphologie dar. Pelletgröße und -struktur gehören zu den Schlüsselfaktoren für eine effiziente Substratversorgung mit Sauerstoff als wachstumslimitierendes Substrat über Diffusionsprozesse innerhalb der sphärischen Mycel-Agglomerate und folglich für eine hohe Produktivität. ME-Strategien setzen gezielt an diesen morphologischen Eigenschaften an, um beispielsweise die Pelletgröße zu reduzieren oder die Hyphendichte so zu modifizieren, dass eine möglichst optimale Versorgung der Biomasse bis in die inneren Schichten des Pellets gewährleistet wird. Eine detaillierte Untersuchung und Charakterisierung der morphologischen Struktur sowie der inneren molekularen Transportprozesse waren bislang nur eingeschränkt möglich. Mit der kürzlich entwickelten Mikrocomputertomographie (μ -CT) [15] und der bewährten Sauerstoff-Mikroelektrodenteknik (O_2 - μ T) [16,17] stehen derzeit zwei fortschrittliche Methoden für die Charakterisierung der Pelletstruktur zur Verfügung. Mit diesen Methoden sollen in der vorliegenden Arbeit mikro- und makromorphologische Eigenschaften von Pellets detailliert charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Zusammenhänge zwischen Morphologie, Substratversorgung und Produktivität durch die isolierte und kombinatorische Anwendung von μ -CT und O_2 - μ T umfassend zu untersuchen. Zum einen sind grundlegende Erkenntnisse über zentrale Pelletcharakteristika bereitzustellen, zum anderen anhand von verschiedenen Beispielen das Potenzial von ME als präzises Werkzeug für die Intensivierung filamentöser Bioprozesse zu schärfen. Daher werden in **Kap. 4.2** beispielhaft für den Stamm *A. niger* SKAn1015 die synchrotronbasierte μ -CT zur detaillierten Analyse der Mikro- und Makromorphologie eingeführt. Darüber hinaus wird untersucht, wie sich die Supplementation von Glasmikropartikeln als ME-Strategie auf die Morphologie auswirkt. Weiterhin wird in **Kap. 4.3** erstmals O_2 - μ T für die Aufnahme von Sauerstoffprofilmessungen (*Profiling*) in Actinomyceten eingesetzt und die Auswirkung zugesetzter Mikropartikel auf die Sauerstoffversorgung analysiert. Anschließend wird diese Technik auch auf die *A. niger*-Stämme SKAn1015 und den hochverzweigten (hyperbranching) Stamm MF22.4 mit und ohne ME-Applikation übertragen, wobei die nicht-supplementierten Pelletstrukturen zusätzlich mittels μ -CT charakterisiert werden. Zur Charakterisierung von Transportvorgängen im Inneren von Pellets wird in **Kap. 4.4** die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten mittels O_2 - μ T eingesetzt. Für verschiedene prokaryotische und eukaryotische Pellets wird der

Diffusionsfaktor f_D bestimmt und in Kombination mit μ -CT-Analysen eine umfassende morphologische Betrachtung der Pelletsysteme vorgenommen.

Mithilfe dieser drei experimentellen Ansätze basierend auf μ -CT und O_2 - μ T (Sauerstoff-*Profiling* und Diffusionsfaktor-Bestimmung) und den zum Teil neu implementierten ME-Strategien werden anhand filamentöser prokaryotischer und eukaryotischer Modellorganismen die innere und äußere Pelletstruktur und Substratversorgung charakterisiert und Werkzeuge zur umfassenden Untersuchung von Pelletstruktur und -simulation vorgelegt.

2. Theoretische Grundlagen

Filamentöse Pilze und Bakterien spielen als mikrobielle Zellfabriken eine Schlüsselrolle in zahlreichen Bereichen der biotechnologischen Industrie. Dies ist insbesondere auf den steigenden Bedarf an nachhaltigen, bioökonomischen Wertstoffproduktionsprozessen zurückzuführen [18], wie sie von der Weißen Biotechnologie adressiert werden. Ein weiterer Treiber ist die sich zuspitzende Antibiotikakrise, ausgelöst durch die zunehmende Zahl antibiotikaresistenter Krankheitserreger [19–21]. Die Kultivierung filamentöser Pilze dient unter anderem der Produktion verschiedener Primärmetabolite, wie Enzymen oder organischen Säuren, sowie von Sekundärmetaboliten, darunter insbesondere antibiotisch wirksame Verbindungen. Der überwiegende Teil der heute bekannten Antibiotika wird jedoch aus filamentösen Bakterien, insbesondere aus Actinomyceten, gewonnen [1–3]. Um filamentöse Mikroorganismen gezielt und effizient nutzen zu können, ist es unerlässlich, Lücken im Bereich der angewandten Mikrobiologie und der Bioprozesstechnik filamentöser Mikroorganismen zu schließen [18].

2.1 Filamentöse Mikroorganismen

Eine Besonderheit filamentöser Mikroorganismen – unabhängig davon, ob sie prokaryotischer oder eukaryotischer Natur sind – liegt in ihrer komplexen, fadenförmigen Struktur, die sie bei submerser Kultivierung ausbilden. Auf mikromorphologischer Ebene liegt dem Wachstum filamentöser Mikroorganismen zugrunde, dass reife Sporen anschwellen und einen ersten Keimschlauch ausbilden, wodurch das Wachstum schlauchförmiger *Hyphen* eingeleitet wird. Es folgt das apikale Wachstum an der Spitze, die Bildung von *Septen* und die Hyphenverzweigung (*Branching*) [22–24], sodass ein verzweigtes Hyphennetzwerk, das sogenannte *Mycel*, entsteht. Das Mycel wächst zunächst exponentiell mit konstanter Wachstumsgeschwindigkeit, bis eine Substratlimitierung eintritt und die Hyphendichte sowie der Durchmesser fortan weitgehend konstant bleiben [25]. Je nach Organismus und Struktur der Zellwand kann die Wanddicke bei Pilzen zwischen 0,04 und 1 μm betragen [26–28]. Ein wesentlicher Unterschied filamentös wachsender Pilze und Bakterien zeigt sich im Hyphendurchmesser: Während bei Pilzhypen typischerweise Durchmesser von 2 bis 10 μm beobachtet werden, erreichen bakterielle Hyphen lediglich Durchmesser zwischen 0,5 und 1 μm [29–31]. Zur quantitativen Beschreibung des mikromorphologischen Wachstums dienen unter anderem folgende Parameter: die Gesamthyphenlänge L_{Hyph} [μm], der Hyphendurchmesser d_{Hyph} [μm], die Spitzenanzahl n [-], die spezifische Wachstumsrate μ_{Hyph} [h^{-1}], die Spitzenwachstumsrate q_{Spitze} [$\mu\text{m h}^{-1}$] und die Verzweigungsrate k_{bran} [$\mu\text{m}^{-1} \text{h}^{-1}$], die *hyphal growth unit HGU* [μm] (durchschnittliche Länge einer Hyphenspitze) und die *hyphal branch unit HBU* [μm] (durchschnittliche Hyphenlänge je Verzweigung) [32,33]. Weitere Details

zum mikromorphologischen Wachstum und der Bestimmung mikromorphologischer Parameter wurden kürzlich in [32] zusammengestellt.

Die Makromorphologie der Biomasse variiert bei submerser Kultivierung – abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren wie den Kultivierungsbedingungen sowie stammspezifischen Eigenschaften (z. B. pH-Wert, mechanischer Stress, Hydrophobizität, Inokulum, Vitalität, Medienzusammensetzung, Reaktorgeometrie) – und reicht dabei von dispersem Mycel über sogenannte *Clumps* bis hin zu annähernd sphärischen Pellets (**Abb. 2.1**) [1,32,33]. Grundsätzlich kann in der initialen Kultivierungsphase zwischen drei Aggregationstypen in Bezug auf die Pelletbildung unterschieden werden:

- Koagulativ: Sporen aggregieren, keimen und wachsende Hyphen bilden Pellets.
- Hyphen-koagulativ: Disperse Sporen keimen, Hyphen aggregieren und bilden Pellets.
- Nicht-koagulativ: Pelletbildung erfolgt aus Keimung und Wachstum einer einzelnen Spore.

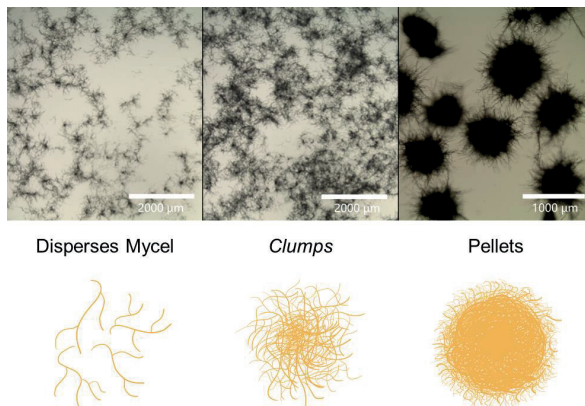


Abbildung 2.1: Die drei Hauptformen der filamentösen Makromorphologie. Mikroskopische Aufnahmen (oben) und schematische Darstellung (unten). Modifiziert nach [32].

In zahlreichen Bioprozessen konnte gezeigt werden, dass kleine Pellets mit geringer Hyphendichte von Vorteil sind. Die in diesem Fall niedrigviskose Kulturbrühe mit annähernd newtonschem Fließverhalten ermöglicht eine gute Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Kulturmedium [33–35] und reduziert Mischinhomogenitäten [6]. Bei vorliegender Pelletmorphologie mit dichten inneren Hyphenstrukturen kann jedoch der Stofftransport ins Pelletinnere behindert sein. Eine daraus resultierende Substratlimitierung wirkt sich in der Regel negativ auf die Synthese bestimmter Produkttypen aus [16,33].

Wie in [32] diskutiert wurde, ist ein Einzelpellet mit dem Radius r_{Pellet} im homogen durchmischten Bioreaktor umgeben von der maximalen Substratkonzentration S in der Bulk-Phase (s. **Abb. 2.2**). In der äußeren Pelletschicht beginnt die Substratkonzentration aufgrund

des Substratverbrauchs durch die lokalen Hyphen entlang des Pelletradius zu sinken. Der Stofftransport innerhalb der dichten Hyphen erfolgt überwiegend diffusiv, wobei er maßgeblich von der Pelletporosität bzw. der Hyphendichte abhängig ist [16,17,36]. In Pellets mit geringer Hyphendichte können zusätzlich hydrodynamische Effekte, z. B. Turbulenzen, eine Rolle spielen und zu konvektivem Stofftransport führen [16,17]. Am kritischen Pelletradius r_{krit} sinkt die Substratkonzentration gegen null. Die Schichtdicke Δr_{aktiv} , definiert als die Differenz zwischen r_{Pellet} und r_{krit} , gilt als metabolisch aktive und substratversorgte Pelletschicht. In dieser Zone erfolgt exponentielles Biomassewachstum ohne Substratlimitierung. Das Wachstum im Pelletzentrum ($r < r_{\text{krit}}$) wird hingegen durch die Substratlimitierung eingeschränkt und kann zur Lyse der Biomasse im Pelletkern führen [16,24,33,37].

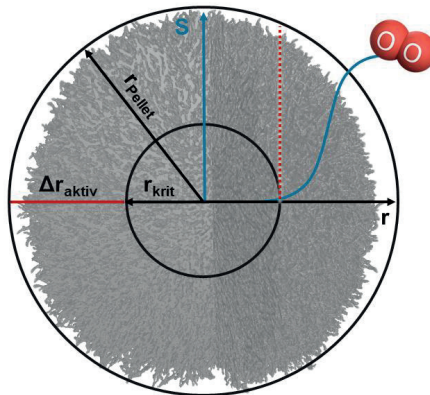


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Massentransportlimitierung in einem Pellet. Exemplarisch ist das Eindringprofil des wachstumslimitierenden Substrats Sauerstoff in das Innere des Pellets bis zum Erreichen des kritischen Pelletradius r_{krit} dargestellt, bei dem die Konzentration des Substrats gegen null geht. Modifiziert nach [32].

2.1.1 *Lentzea aerocolonigenes* und Rebeccamycin

Bei *Lentzea aerocolonigenes* DSM 44217 handelt es sich um einen obligat aeroben, grampositiven Actinomyceten, der ursprünglich aus einer Bodenprobe in Panama isoliert wurde [38–40]. Die Spezies sporuliert und zeigt – wie viele Actinomyceten – ein komplexes filamentöses Wachstum [38]. Auch bei *L. aerocolonigenes* konnte gezeigt werden, dass die Produktbildung eng mit der Morphologie gekoppelt ist, wobei die Produktsynthese vorrangig in Form von Pellets (**Abb. 2.3A**) erfolgt [7,9–11].

L. aerocolonigenes ist ein natürlicher Produzent des Sekundärmetaboliten Rebeccamycin [41] (**Abb. 2.3B**), einer gelblich-kristallinen Substanz aus der Klasse der Indolcarbazole mit stark hydrophoben Eigenschaften [38,39]. Während Rebeccamycin in

Wasser quasi unlöslich ist ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$), zeigt es eine Löslichkeit in organischen Lösemitteln wie Tetrahydrofuran, Dimethylsulfoxid (DMSO) [38,39] oder Ethylacetat [7]. Rebeccamycin wurden antitumorale (Topoisomerase-I-Hemmer) sowie antibiotische Eigenschaften gegen grampositive Bakterien nachgewiesen, weshalb es potenziell für medizinische Anwendungen von Interesse ist [38,39]. Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit ergeben sich jedoch pharmakokinetische Herausforderungen, die die Eignung von Rebeccamycin für die humanpharmazeutische Anwendung einschränken. Daher wurden durch einfache chemische Modifikationen Rebeccamycin-Analoga mit vergleichbarer Wirksamkeit, aber verbesserter Löslichkeit und geringerer Hydrophobizität entwickelt – beispielsweise Becatecarin (**Abb. 2.3C**) [42,43]. Die Rebeccamycin-Analoga konnten im Labor bzw. in den klinischen Studien der Phase I und II erfolgreich gegen verschiedene Tumorerkrankungen getestet werden, darunter Dickdarm-, Brust-, kleinzelligem Lungenkrebs und metastasierendem Nierenzellkrebs [44–48]. Darüber hinaus wurde für das Rebeccamycin-Analogen Edotecarin eine antivirale Wirksamkeit gegen SARS-CoV-2 veröffentlicht [49].

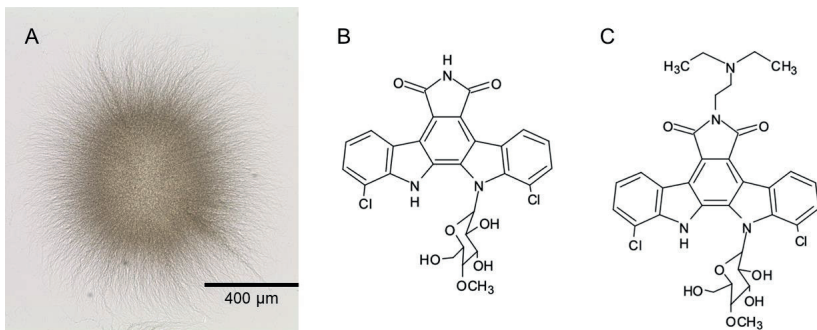


Abbildung 2.3: (A) Mikroskopische Aufnahme eines Pellets von *L. aerocolonigenes*, chemische Strukturen von (B) Rebeccamycin und (C) Becatecarin.

Die biotechnologische Herstellung von Rebeccamycin, gefolgt von der chemischen Modifikation zu therapeutischen Analoga, ist bisweilen gegenüber einer rein chemischen Synthese oder einer heterologen Produktion von Vorteil [12,41]. Allerdings wurden in klinischen Studien relativ hohe, patientenspezifische Wirkstoffmengen für einen therapeutischen Erfolg berichtet [38,39,41,45,47,48]. Die dafür erforderlichen Produkttitere konnten, wie von Pommerehne et al. (2019) zusammengefasst, mittels biotechnologischer Produktion mit *L. aerocolonigenes* bislang nicht erreicht werden. Infolgedessen wurden erste Ansätze des *Morphology Engineering* (ME) im Schüttelkolbenmaßstab erprobt, um die Produktausbeute gezielt zu steigern (s. **Kap. 2.2 ff.**) [7,9–11].

2.1.2 *Aspergillus niger*

Der filamentöse Ascomyceten-Pilz *Aspergillus niger* wurde im Laufe des letzten Jahrhunderts zu einer vielseitigen Zellfabrik mit einem jährlichen Marktvolumen in Milliardenhöhe entwickelt. Ausschlaggebend dafür ist insbesondere seine außerordentliche sekretorische Kapazität sowie die mutagenetische Zugänglichkeit, wodurch eine Vielzahl industriell relevanter Substanzen, wie z. B. organische Säuren, Proteine und Sekundärmetabolite, biotechnologisch produziert werden können. Ein zentrales Anwendungsgebiet stellt die industrielle Produktion von Enzymen dar, wo allen voran die Synthese von Glucoamylasen, aber auch von Lipasen, Cellulasen, Proteasen u. v. m. weit verbreitet sind [18,50,51].

Im Rahmen dieser Arbeit werden drei *A. niger*-Stämme in Bezug auf die Charakterisierung morphologischer Eigenschaften und morphologischer Veränderungen zur Verbesserung der Produktivität beleuchtet. Der rekombinante Stamm *A. niger* SKAn1015 (im Folgenden auch als SKAn1025 bezeichnet, **Abb. 2.4A**) ist für die Produktion des Enzyms β -Fructofuranosidase (FFase, EC 3.2.1.26) bekannt. Das entsprechende Fructofuranosidase-Gen *suc1* wird unter Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors exprimiert [52,53]. Das Enzym katalysiert die Konversion des Disaccharids Saccharose zu Fructooligosacchariden. SKAn1015 wurde durch Transformation von Zuccaro et al. (2008) aus dem Stamm AB1.13 abgeleitet [52]. Aufgrund des industriellen Interesses, jedoch zunächst suboptimalem Produktionsprozess [53], rückte die Kultivierung dieses Stammes in den Fokus mehrerer Studien zur Optimierung der Prozessbedingungen sowie zur gezielten Beeinflussung der Morphologie, beispielsweise durch Medienoptimierung [53], den Einfluss mechanischen Stresses [54], der Zugabe von Salz [14] oder Mikropartikeln (s. **Kap. 2.2**) [13,55].

Der Δ *racA*-Stamm *A. niger* MF22.4 (im Folgenden auch als MF22.4 bezeichnet, **Abb. 2.4B**) dient der rekombinanten Produktion von Glucoamylase (Glucan-1,4-Glucosidase, GluA), einem Enzym, das die α -1,4-glycosidischen Bindungen zwischen Glucose-Monomeren, z. B. in Stärke oder Maltose, hydrolysiert [56]. Da die Enzymsekretion in filamentösen Pilzen primär über die Hyphenspitzen erfolgt, wurde dieser Stamm durch Deletion der Rho-GTPase RacA von Fiedler et al. (2018) mutagenetisch erzeugt. RacA ist üblicherweise für die Regulation der Actinpolymerisation und -depolymerisation an der Hyphenspitze verantwortlich [57]. Der resultierende Phänotyp zeigt ein hochverzweigtes (sogenanntes *hyperbranching*-) Wachstumsverhalten mit einer rund 20 % erhöhten Spitzenanzahl im Vergleich zum parentalen Stamm sowie einer gesteigerten Hyphendichte und Verzweigungsrate. Aufgrund der gesteigerten Spitzenanzahl konnte eine vierfach erhöhte Enzymproduktion nachgewiesen werden [58,59].

Der rekombinante Stamm *A. niger* AB1.13 (im Folgenden auch als AB1.13 bezeichnet) ist ein Produktionsstamm für GlaA mit Uridin-Auxotrophie und Protease-Defizienz. Er wurde ursprünglich von Mattern et al. (1992) durch UV-Bestrahlung aus dem parentalen Stamm AB4.1 generiert [13,58].

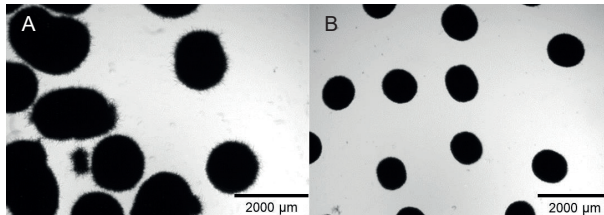


Abbildung 2.4: Mikroskopische Pellet-Aufnahme von (A) SKAn1015 und (B) MF22.4.

2.2 Morphology Engineering

Ein detailliertes Verständnis der mikro- und makromorphologischen Prozesse ist essenziell für einen erfolgreichen Kultivierungsprozess, insbesondere aufgrund des direkten Zusammenhangs zwischen Morphologie und Produktivität filamentöser Mikroorganismen [33]. Ob eher eine Pelletmorphologie oder das Wachstum in Form von dispersem Mycel in submersen Kulturen zu besseren Kultivierungsergebnissen führt, ist stammspezifisch und muss für jeden Mikroorganismus individuell ermittelt werden. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Strategien entwickelt, um gezielte Veränderungen der filamentösen Morphologie herbeizuführen und auf diese Weise den Kultivierungsprozess zu intensivieren [55], etwa mit dem Ziel, die Produkttiter auf ein industriell relevantes Niveau zu steigern.

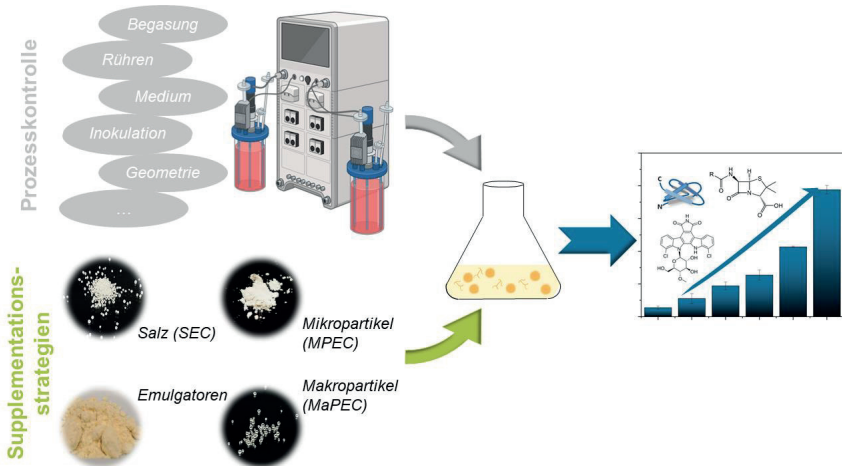


Abbildung 2.5: Darstellung der Einflussmöglichkeiten auf die Kultivierung filamentöser Mikroorganismen. Durch die Veränderung von Kultivierungsparametern auf Ebene der Prozesskontrolle oder durch verschiedene Supplementationsstrategien (*Morphology Engineering*) kann Einfluss auf die Kultivierung, die Morphologie des Mikroorganismus und letztlich auf die Produktbildung genommen werden.

Wie in **Abb. 2.5** illustriert ist, spielen klassische Strategien, wie die Anpassung der Prozessparameter (z. B. Sporenkonzentration, pH-Wert und -Shift oder durch rührer- und begasungsinduzierten mechanischen Stress), eine zentrale Rolle und wurden für filamentöse Mikroorganismen bereits umfassend beschrieben [33]. Darüber hinaus beeinflussen weitere Faktoren die Morphologie, wie das Alter des Mikroorganismus, genetische Faktoren, das Kulturmedium (u. a. Zusammensetzung, Stofftransport, rheologische Eigenschaften), die Kultivierungstemperatur sowie die Reaktor- und Rührergeometrie betreffen [7,59]. Neuere Ansätze zur gezielten morphologischen Beeinflussung haben sich von den klassischen Kultivierungsprozessparametern abgewandt und konzentrieren sich auf die Supplementation von Additiven, die das Kultivierungssystem maßgeblich verändern können. Unter der Bezeichnung *Morphology Engineering* wurden inzwischen mehrere Supplementationsstrategien entwickelt, von denen einige im Folgenden näher diskutiert werden [6]. Das übergeordnete Ziel besteht dabei darin, die Pelletmorphologie dahingehend zu modifizieren, dass die mit **Abb. 2.2** diskutierte potenzielle Substratlimitierung, z. B. von Sauerstoff, vermindert wird. Dies kann erreicht werden, indem sich durch die Modifikation der Pelletgröße oder Hyphenstruktur eine Annäherung von Δr_{aktiv} gegen r_{Pellet} einstellt, sodass der Anteil aktiver Biomasse maximiert wird.