

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.