

1 Einleitung

Die submerse Kultivierung filamentöser Mikroorganismen gehört zu den größten Herausforderungen der Bioverfahrenstechnik. Zahlreiche Chemikalien werden zwar jährlich im Tonnenmaßstab auf diese Weise hergestellt [20, 25, 50], die Verfahrensentwicklung ist jedoch bislang im wesentlichen über empirische Optimierung der Produktivität erfolgt. Dabei wird nach dem Prinzip des „trial and error“ eine Vielzahl von möglichen Parametern variiert und nach dem Ergebnis der Kultivierung bewertet. Die komplexe Wirkungsweise der Einflussfaktoren bleibt dabei weitestgehend unbeachtet. In so genannten black box- Modellen finden die Ergebnisse derartiger Optimierungsversuche ihren Niederschlag. Eine Übertragung auf andere Organismen und Zielprodukte ist oftmals unmöglich.

Die fortschreitende Entwicklung molekularbiologischer Methoden eröffnet interessante Perspektiven für die weitere Anwendung filamentöser Mikroorganismen [29, 68]. Die Möglichkeit, deren Potential als Expressions- und Sekretionssystem rekombinanter Proteine auszuschöpfen, wird jedoch durch die zeit- und kostenintensive Verfahrensentwicklung nach dem oben beschriebenen Schema behindert. Dementsprechend sind zunehmend prognostizierende Modelle erforderlich, die die Wirkung von Kultivierungsparametern erklären und einen gezielten Eingriff in bestimmte Teilprozesse erlauben. Die Gliederung einer Kultivierung in mehrere Teilprozesse erscheint notwendig, um die große Komplexität der zugrunde liegenden Wechselwirkungen überhaupt erfassen zu können. Dabei sind zunächst kultivierungsbedingtes Biomassewachstum und die daraus folgende Produktbildung zu betrachten. Der Zusammenhang dieser Prozesse wird durch morphologieabhängige Stofftransportprozesse determiniert [38, 70].

1 Einleitung

Wachstum bedeutet bei Myzelbildnern immer auch morphologische Entwicklung. Ein Zusammenhang zwischen Wachstum, Stofftransport und Produktbildung ist jedoch nur dann zu finden, wenn geeignete Morphogenesemodelle zur Verfügung stehen, die den Einfluss von Kultivierungsparametern wiedergeben. Zwar wird die Entwicklung filamentöser Mikroorganismen bereits seit langer Zeit untersucht und mit Modellen gedeutet [67, 86], jedoch beruhen diese zumeist auf charakteristischen morphotypisierenden Mittelwerten. Die Unterschiede in einer Myzelpopulation bleiben bislang in der Regel unberücksichtigt. Darauf ist die begrenzte Deutungskraft und Anwendbarkeit der meisten bestehenden Morphogenesemodelle für technische Prozesse zurückzuführen. Ziel ist es somit, die Dynamik des Myzelwachstums über geeignete Populationsbilanzen zu beschreiben [60].

Die Entwicklung einer Myzelpopulation beginnt bereits beim Animpfen eines Bioreaktors mit Sporen. Hierbei kommt es zu Aggregationsprozessen, die die Zahl und Größe der entstehenden Biopartikel maßgeblich festlegen. Dennoch liegen bislang allenfalls qualitative Kenntnisse über die Sporenaggregation vor [56]. Ziel dieser Arbeit ist es daher ein Sporenaggregationsmodell zu erarbeiten, dass am Beispiel des koagulativen Myzelbildners *Aspergillus niger* den Verlauf kinetischer Daten erklärt und wiedergibt. Aus der Messung der Aggregationskinetik soll auch der direkte Einfluss wesentlicher Kultivierungsparameter auf diesen Prozess quantitativ bestimmt werden. Konkret stehen dabei die Sporenkonzentration im Inokulum, die Flüssigkeitsdynamik und der pH-Wert des Mediums im Zentrum des Interesses. Dabei soll nicht nur deren Einfluss auf die Sporengesamtkonzentration und auf charakteristische Längen von Hyphenaggregaten bestimmt werden. Vielmehr ist die Entwicklung der gesamten Partikelpopulation über die ersten Stunden der Kultivierung wiederzugeben. Die eingehende Beschreibung der Prozesse, die zu Beginn einer Kultivierung von filamentösen Mikroorganismen ablaufen, ist als Beitrag zu einem umfassenden Morphogenese- und Produktionsmodell für die submerse Kultivierung derartiger Organismen zu verstehen.

2 Stand des Wissens

2.1 Kultivierung von Myzelbildnern

2.1.1 Bedeutung filamentöser Mikroorganismen

Kaum eine Gruppe von Mikroorganismen ist in Hinblick auf ihren technischen Einsatz so häufig aufzufinden wie die der Myzelbildner [25, 50]. Dies liegt nicht allein an der Vielzahl verschiedener Organismen, die unter diesem Oberbegriff zusammengefasst werden. Damit sind sowohl Prokaryoten, etwa Streptomyzeten, als auch Eukaryoten, meist filamentöse Pilze, gemeint. Verbindendes Merkmal dieser phylogenetisch kaum verwandten Arten ist ihre besondere Form des apikalen Wachstums. Wo höchst unterschiedliche Organismen derart ähnliche Phänotypen entwickelt haben, ist meist auf die Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen zu denken. So gehören Myzelbildner allgemein in Hinblick auf ihre Stellung im Nährstoffkreislauf zu den abbauenden, saprophen Organismen [1]. Dies erklärt mitunter auch ihre häufige technische Anwendung.

Saprophile Mikroorganismen weisen einen vielseitigen Stoffwechsel auf. Zahlreiche ihrer Abbauenzyme, darunter Amylasen, Pectinasen und Proteasen, werden in industriellen Prozessen technisch hergestellt und genutzt [25]. Darüber hinaus zeichnen sich Myzelbildner in der Regel durch hervorragende Sekretionssysteme aus, die sie einsetzen, um die Bioverfügbarkeit ihrer Nährstoffe sicherzustellen [12]. Dies hat sich ebenfalls als Vorteil in technischer Hinsicht erwiesen, da die Ausschleusung eines Produktes aus der Zelle dessen Aufarbeitung wesentlich

erleichtert. Im Konkurrenzkampf um Nährstoffe mit anderen Mikroorganismen haben Myzelbildner weitere interessante Eigenschaften entwickelt. Die Ansäuerung des Mediums beispielsweise ist Grundlage für die technische Herstellung von Zitronensäure oder Gluconsäure, beides organische Säuren, die im Tonnenmaßstab aus Myzelbildnern, wie *Aspergillus niger*, gewonnen werden [50]. Auch die Produktion von Antibiotika (Penicillin, Cephalosporin) beruht maßgeblich auf der Kultivierung filamentöser Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Penicillium chrysogenum* bzw. *Acremonium chrysogenum* [20].

Das Potential von Myzelbildnern wird durch die vielen genannten, bereits bestehenden Einsatzgebiete jedoch bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Filamentöse Pilze zeichnen sich beispielsweise als Eukaryoten durch die Fähigkeit zur posttranslationalen Glycosylierung von Proteinen aus [68]. Dies ist wichtig, da nur bei Anwesenheit von Glycosylresten therapeutisch wirksame Proteine über längere Zeit im Blutkreislauf des Menschen verbleiben können. Das Glycosylierungsmuster von filamentösen Pilzen ist dem von Säugerzellen weitaus ähnlicher als das von Hefen. In umfangreichen Arbeiten wird derzeit versucht, die Glycosilierungsreaktionen der Organismen weiter aneinander anzupassen [52].

Von großem Interesse ist allgemein die Verwendung des effizienten Sekretionsystems von Myzelbildnern für die technische Herstellung artfremder, so genannter heterologer Proteine [73]. Bei ersten Ansätzen hierzu werden Wirtschaftlichkeitskriterien hinsichtlich Produktausbeuten allerdings noch nicht erfüllt. Dies liegt sowohl an mangelnder Erfahrung in der genetischen Modifikation der entsprechenden Organismen, als auch an der Kultivierungsproblematisität, die im Folgenden weiter erörtert wird.

2.1.2 Morphologie und Produktivität

Die Wirtschaftlichkeit industrieller Prozesse etwa zur Herstellung von Zitronensäure mit *Aspergillus niger* oder zur Herstellung von Penicillin mit *Penicillium*-Stämmen beruht auf deren sehr hohen Produktbildungsraten [50]. Anders wäre die Synthese dieser Bulkchemikalien im Tonnenmaßstab nicht über mikrobielle Ver-

fahren zu bewerkstelligen. Zur Steigerung der Ausbeuten sind über Jahrzehnte Kultivierungsverfahren in Hinblick auf diese Zielgröße optimiert worden. Dabei wurde das Wachstum des Pilzes im besten Fall unter dem Aspekt der Gewinnung von Biomasse berücksichtigt. Der Zusammenhang zwischen morphologischer Entwicklung und Produktivität ist jedoch dabei in der Regel unberücksichtigt geblieben [32]. Als Ergebnis empirischer Parameteroptimierung wurden dementsprechend submerse Kultivierungsverfahren entwickelt, die zu sehr unterschiedlichen makroskopisch sichtbaren Morphologien führen. So wird Zitronensäure oder Phytase mit *Aspergillus niger* in Form von kugelförmigen Partikeln, so genannten Pellets, produziert [62, 63]. Dagegen sind für die Penicillinherstellung Verfahren beschrieben worden, bei denen die Pelletbildung von *Penicillium chrysogenum* unterbunden und freies Myzel gebildet wird [20]. Die empirisch ermittelten optimalen Kultivierungsstrategien lassen sich folglich kaum verallgemeinern oder auf neue potentielle Anwendungen eines Myzelbildners übertragen.

Der Grund hierfür ist die Unkenntnis über die genaue Wirkung von Kultivierungsparametern. Schon eine einfache Korrelation zwischen Morphologie und Produktbildung ist aufgrund der sehr großen Anzahl überlagerter Einflussparametern kaum möglich. Die Erkenntnis, dass Produktsekretion überwiegend aus den Hyphenspitzen erfolgt, legt etwa die Vermutung nahe, ein stark verzweigter Myzelbildner wäre als Produktionsstamm besser geeignet als ein unverzweigt wachsender [81]. Eindeutig bestätigt werden konnte diese Vermutung bislang jedoch nicht, da zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vorliegen, die zum einen die oben genannte Hypothese belegen [79]. Jedoch konnte in anderen Experimenten, bei denen die Verzweigungsrate von Produktionsstämmen durch Mutation variiert wurde, keine Veränderung der Produktivität nachgewiesen werden [8]. Es ist davon auszugehen, dass in letzterem Fall die Anzahl der Hyphenspitzen für die Produktbildung nicht determinierend war.

Da die Synthese des gewünschten Produktes intrazellulär abläuft, ist natürlich zunächst der Stoffwechsel des Wirtsorganismus von Interesse [35]. In Anlehnung an die Modellierung der Stoffwechselaktivität von Bakterien [19] und Hefen [26] werden derzeit Methoden zur Quantifizierung der metabolischen Prozesse in fila-

mentösen Pilzen entwickelt [74]. Es bestehen bereits komplexe Modelle zur Simulation des Stoffwechsels von *Aspergillus niger* [16, 34]. Sie sind allerdings in jedem Fall auf die Angabe von Substratkonzentrationen zu Beginn der Kultivierung angewiesen, die durch den Nährstofftransport in die Zelle determiniert werden.

Die Beschreibung des Stofftransports in Kultursuspensionen filamentöser Mikroorganismen stellt dabei eine große Herausforderung dar. Hier ist vermutlich auch der wesentliche Einfluss der morphologischen Entwicklung auf die Produktivität filamentöser Mikroorganismen zu suchen. Dabei ist die Transportbarriere von der Gestalt des eingesetzten biologischen Systems abhängig.

Suspensionen von freiem Myzel zeichnen sich durch strukturviskoses, d.h. nicht-Newton'sches Fließverhalten mit hohen Viskositäten aus [11, 61]. Dies führt bei der Kultivierung im Rührreaktor beispielsweise dazu, dass in der Umgebung des Rührers zwar noch eine ausreichende Durchmischung vorherrscht, außerhalb jedoch Totzonen entstehen können. Stofftransport ist in diesen Zonen lediglich über Diffusion und die Ausbildung von Konzentrationsgradienten möglich. Eine Beschreibung der physikalischen Abläufe setzt allerdings genaue Kenntnisse über Strömungsfelder in Bioreaktoren voraus. Methoden zu deren Bestimmung sind zwar bereits etabliert, jedoch bislang kaum für die Beschreibung der Kultivierung von Myzelbildnern eingesetzt worden. Eine zweite Problematik besteht in der Ermittlung der Viskosität der Suspension. Diese hängt von Wachstum und Morphologie der Organismen ab [57]. Zwar existieren empirische Näherungsformeln, die diesen Zusammenhang zu beschreiben versuchen, das Ergebnis ist jedoch meist ungenau und die statistische Signifikanz der berechneten Werte wird in den meisten Publikationen nicht angegeben. Bislang beruht die Abschätzung der Viskosität der Kultivierungssuspension auf Mittelwerten von bildanalytisch bestimmten Größen, wobei der Konsistenzindex als Funktion geometrischer Abmessungen eines durchschnittlichen Bioaggregates beschrieben wird [3, 24]. Die Variation der Hyphenlängen und Spitzenzahl einer Hyphenpopulation ist bislang fast vollständig unberücksichtigt geblieben [70]. Folglich haben sich Stofftransportvorgänge in Kultursuspensionen aus freiem Myzel bislang einer mathematischen

Beschreibung vollständig entzogen. Eine notwendige Grundlage hierfür ist die Erfassung der Morphogenese der Myzelbildner.

Die beschriebene Problematik entfällt weitgehend bei der Kultivierung von Pellets. Die Kultursuspension weist in diesem Fall meist Newton'sches Fließverhalten bei deutlich geringeren Viskositäten auf. Dagegen stellt die Biomasse der Pellets den ausschlaggebenden Transportwiderstand dar [14, 23, 36]. Die Charakterisierung dieser Transportbarriere ist wesentlich ausführlicher untersucht worden als die des freien Myzels. Sauerstoff wurde schon sehr früh als limitierender Nährstoff identifiziert. Die Messung von Sauerstoffkonzentrationsprofilen in Pellets unterschiedlicher myzelbildender Organismen mit Mikroelektroden ist seit geraumer Zeit etabliert [38, 40, 78]. Mit zunehmender Biomassedichte kann eine geringere Eindringtiefe des Sauerstoffs verfolgt und quantifiziert werden. Daraus ergibt sich bei größeren Pellets eine Unterversorgung der Zellen im Kernbereich. Eine Berechnung der Eindringtiefe des Substrates ist jedoch nicht trivial. Dies liegt wesentlich an der Pelletmorphologie. Zahlreiche Modelle gehen von einer mittleren Biomassedichte aus [15, 22]. Demgegenüber ist die Pelletstruktur allerdings sehr heterogen und weist Regionen großer Hyphendichte, vornehmlich an der Peripherie, neben Gebieten deutlich geringerer Dichte im Inneren auf [21]. Eine Korrelation der Sauerstoffprofile mit der mittleren Biomasse der Pellets ist folglich irreführend. Neuere Ansätze stellen daher den Zusammenhang zwischen Sauerstoffkonzentrationsabnahme und Hyphenverteilung in radialer Richtung dar, wobei die Hyphendichte bildanalytisch erfasst wird [38]. Die Verteilung der Hyphen in einem Pellet wird dabei von den Kultivierungsbedingungen bestimmt. So ist auch in Hinblick auf den Stofftransport in Pellets die morphologische Entwicklung von Myzelbildnern zu berücksichtigen.

2.1.3 Morphogenese filamentöser Mikroorganismen

Während das Wachstum einzelliger Kulturen im Wesentlichen durch die Verdopplung der Zellzahl beschrieben werden kann, ist bei Myzelbildnern von einer morphologischen Entwicklung auszugehen. Die Beschreibung dieser Morphogenese

beruht in der Regel auf einer bildanalytischen Untersuchung, die die Struktur der wachsenden Biomasse widerspiegelt [66]. Die digitale Bearbeitung von mikroskopischen Bildern ermöglichte in den 1970er Jahren erstmals den Zugang zu entsprechendem Datenmaterial [47, 55]. Die aufwendige und zeitintensive Auswertung der Bilder konnte jedoch erst durch die Einführung automatisierter rechnergestützter Verfahren Ende der 1980er Jahre erleichtert werden [2].

Die grundlegende Erfassung der Morphologie eines wachsenden Myzels ist mit zwei Parametern hinreichend möglich (s. **Abbildung 2.1**). Die Gesamthyphenlänge L_{Myzel} [μm] gibt die Summe der Längen aller einzelnen Hyphen L_{Hyp} eines Myzelbaumes wieder. Daneben wird die Anzahl der Spitzen n [-] für die Charakterisierung der Morphologie berücksichtigt [76]. Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung der Morphologie ist die so genannte *hyphal growth unit* (HGU) [10]:

$$\text{HGU} \equiv \frac{L_{\text{Myzel}}}{n} \quad (2.1)$$

Die HGU stellt demzufolge die mittlere Länge einer Hyphe in einem Myzel dar. Im Verlauf einer Kultivierung strebt sie gegen einen konstanten, charakteristischen Wert [7].

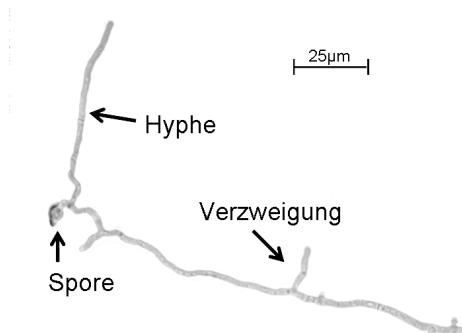


Abbildung 2.1: Wachsender Myzelbaum von *Aspergillus niger*

Zu Beginn der Kultivierung wird für die Zunahme der Gesamthyphenlänge eine exponentielle Wachstumsfunktion angenommen. Dabei wird von einer konstanten spezifischen Hyphenlängenwachstumsrate μ_{Hyp} ausgegangen.

$$\frac{dL_{\text{Myzel}}}{dt} = \mu_{\text{Hyp}} \cdot L_{\text{Myzel}} \quad (2.2)$$

Das allgemeine Wachstum von Myzelbildnern ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zunahme der Biomasse durch Längenwachstum einer jeden Hyphenspitze möglich ist. Gleichzeitig kann die Anzahl der wachsenden Hyphenspitzen durch Verzweigung des Myzelbaumes zunehmen. Dieser Zusammenhang wird durch die folgende Gleichung wiedergegeben, wobei q_{tip} [$\mu\text{m h}^{-1}$] die konstante mittlere spezifische Spitzenwachstumsrate angibt.

$$\frac{dL_{\text{Myzel}}}{dt} = q_{\text{tip}} \cdot n \quad (2.3)$$

Experimentellen Befunden zufolge ist die zeitliche Zunahme der Zahl der Hyphenspitzen n von der Länge des Myzels L_{Myzel} abhängig. Daraus folgt mit der mittleren spezifischen Verzweigungsrate k_{bran} [$\mu\text{m}^{-1} \text{h}^{-1}$]:

$$\frac{dn}{dt} = k_{\text{bran}} \cdot L_{\text{Myzel}} \quad (2.4)$$

Das klassische Modell zur Beschreibung der Hyphenwachstumsprozesse beruht auf der Vorstellung, dass dem Wachstum im wesentlichen die Zellwandsynthese zugrunde liegt [67]. Der Aufbau der Zellwand erfolgt durch die Synthesereaktion aus ihren Bestandteilen, die über Vesikel mit konstanter Geschwindigkeit an die Hyphenspitze transportiert werden. Die Vesikel entstehen im gesamten Hyphenvolumen. Je länger eine Hyphe demnach ist, umso mehr Zellwandbestandteile werden gebildet. Daraus folgt, wie in Gleichung 2.2 bereits für die gesamte Hyphenlänge im Myzel ausgeführt, dass auch das Längenwachstum jedes einzelnen Hyphenastes proportional zur Hyphenlänge ist.

Ab einer bestimmten Hyphenlänge wird davon ausgegangen, dass hinsichtlich des Hyphenwachstums nicht die Synthese der Zellwandbestandteile, sondern ihr Transport an die Hyphenspitze geschwindigkeitslimitierend wird. Dies führt dann zu einer konstanten Hyphenwachstumsgeschwindigkeit:

$$\frac{dL_{Hyp}}{dt} = \text{const} \quad (2.5)$$

Dies bedeutet auch, dass sich Vesikel im Inneren der Hyphen anreichern können, die dann eine verstärkte Verzweigung des Myzels verursachen. Als Konsequenz lässt sich daraus eine exponentielle Zunahme der Anzahl an Hyphenspitzen und folglich eine konstante HGU ableiten.

Zahlreiche Effekte, die durch das beschriebene Modell ungeklärt bleiben, wurden für prokaryotische Myzelbildner am Beispiel der Streptomyzeten in einem umfangreichen Modell wiedergegeben [46, 86, 87]. Es enthält u. a. Annahmen zur Ausbildung von Septen in den Hyphen. Neben dem Hyphenwachstum werden auch der Ort der Verzweigung und die Richtung des Wachstums unter Annahme stochastischer Verteilungen bestimmt. Die Beschreibung der Morphogenese anhand quantitativer Daten der Strukturbiologie hat dagegen erst begonnen [54]. Viele molekulare Details sind zwar nach wie vor unbekannt und entziehen sich folglich auch jeglicher Quantifizierung, allerdings liegen auf zahlreichen Gebieten grundlegende Kenntnisse vor. Dies betrifft sowohl den Ablauf der Zellwandbiosynthese [30], den intrazellulären Transport über Actin Filamente [6], die Positionierung der Zellorganellen mittels Mikrotubuli [39, 84] sowie die allgemeine Regulation über Signaltransduktionskaskaden [17].

2.1.4 Myzelpopulationen

Der Ablauf der morphologischen Entwicklung, wie er in Kapitel 2.1.3 dargestellt wurde, bezieht sich auf ein einzelnes Myzel. Dies entspricht der weitaus üblichsten Beschreibung der Morphogenese und ihrer bisherigen Wiedergabe durch mathematische Modelle. Die Ergebnisse wurden folglich bestenfalls als mittlere oder