

# Akustische-Resonanz-Mischtechnik in der Submerskultivierung höherer Pilz

## Einleitung

Filamentöse Pilze sind aus der industriellen Biotechnologie nicht mehr wegzudenken (Meyer 2013). Sie dienen der Herstellung rekombinanter Proteine und Sekundärmetabolite oder als Schutzkulturen. Gerade für die rekombinante Produktion eukaryotischer Enzyme sind sie mittlerweile von großer Bedeutung, wie z.B. in der Lebensmittelindustrie (Fraatz et al. 2014). Filamentöse Pilze werden vorwiegend submers in flüssigen Medien kultiviert. Hier wachsen sie entweder in Form freier filamentöser Hyphen oder als Hyphenaggregate den sogenannten Myzelpellets (Paul und Thomas 1998, Rühl und Kües 2009). Da die Pelletmorphologie sowohl das Wachstum als auch die Produktbildung entscheidend beeinflussen kann, ist die Auswahl eines geeigneten Kultivierungssystems maßgeblich für den Erfolg einer Prozessentwicklung. Klassische Kultivierungsverfahren haben dabei ihre jeweiligen Vor- und Nachteile. Bei Kulturkolben im Orbitalschüttler ist die Belastung durch Scherkräfte relativ gering, allerdings sind hier meist der Sauerstoffeintrag und die Maßstabsvergrößerung limitierende Faktoren. Bei Rührkesselreaktoren ist bei entsprechendem Lufteintrag die Sauerstoffversorgung gewährleistet, jedoch kann es zu hohen Scherkräften kommen, welche die Morphologie und damit die Produktivität negativ beeinflussen können (Lin et al. 2010). Eine innovative Möglichkeit für den Labormaßstab bietet das RAMbio®-System der Firma applikon® Biotechnology, welches auf der Akustischen-Resonanz-Mischtechnik (engl. Resonant Acoustic® Mixing Technology, ARM) basiert. Hierbei werden Kolben in vertikale Schwingungen mit niedriger Frequenz im akustischen Bereich (ca. 60 Hz) und hoher Amplitude versetzt. Das ganze System wird dabei im Resonanzzustand gehalten, um eine effektive und energiesparende Durchmischung zu gewährleisten. Durch die Art der Vermischung wird die Oberfläche der Kulturflüssigkeit stark vergrößert, so dass ein erhöhter Sauerstofftransfer bei niedrigem volumetrischem Leistungseintrag möglich ist. Darüber hinaus verfügt das RAMbio®-System über ein spezielles Pumpsystem (Oxy-Pump® Stopper), welches einen aktiven Gasaustausch zwischen Kopfraum des Kolbens und der Umgebung ermöglicht. Das neuartige Kultivierungssystem könnte somit die Vorteile von Orbitalschüttler und Rührkessel in sich vereinen. In einer Pilotstudie wurde das Potential des RAMbio®-Systems für die Submerskultivierung von filamentös wachsenden Organismen ermittelt und mit Ergebnissen aus Kultivierungen in Orbitalschüttler und Rührkessel verglichen.

## Material und Methoden

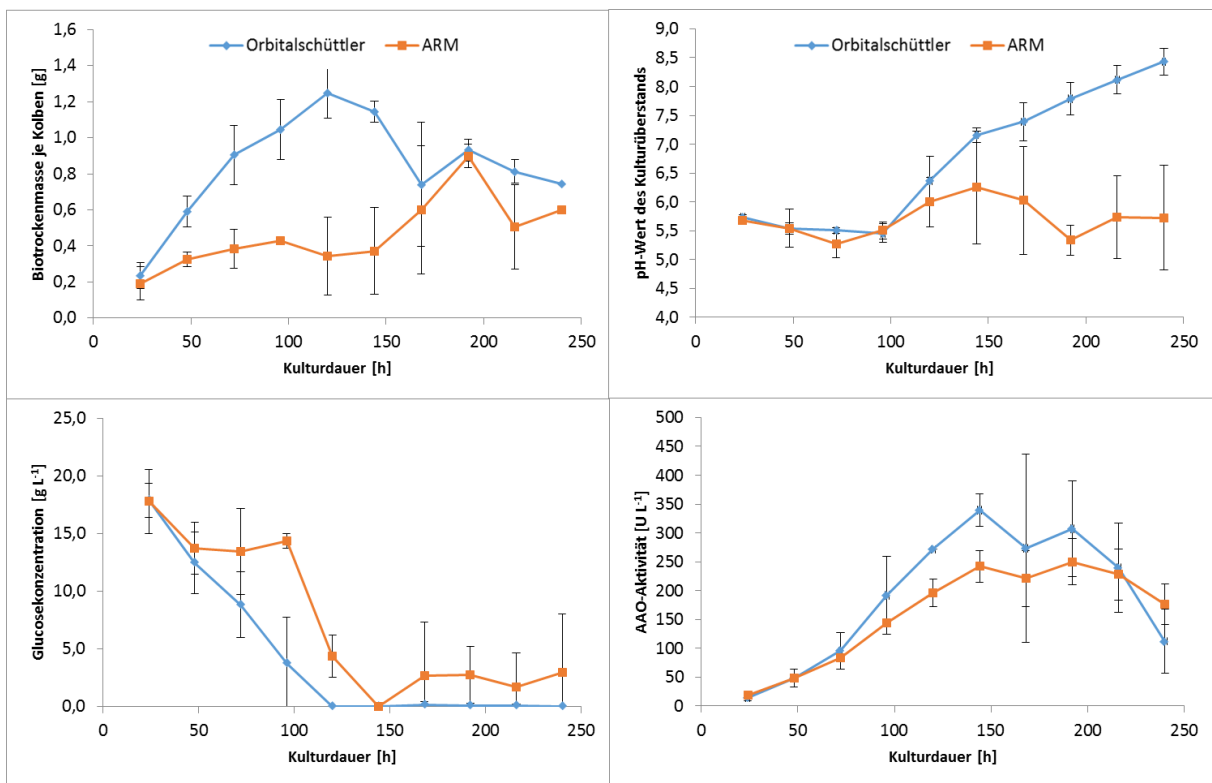
Ein Transformant des Modellpilzes *C. cinerea*, der eine heterologe Arylalkohol-Oxidase produziert, wurde in einem Vollmedium mit Glucose als C-Quelle sowohl im RAMbio®-System als auch im herkömmlichen Orbitalschüttler kultiviert. Für die Kultivierung kamen 250 mL Erlenmeyerkolben zum Einsatz, die mit Oxy-Pump® Stopper (Abbildung 1) ausgestattet und mit 100 mL Medium gefüllt waren.



**Abbildung 1:** RAMbio®-System mit Submerskulturen von *C. cinerea* in Erlenmeyerkolben mit Oxy-Pump® Stopper

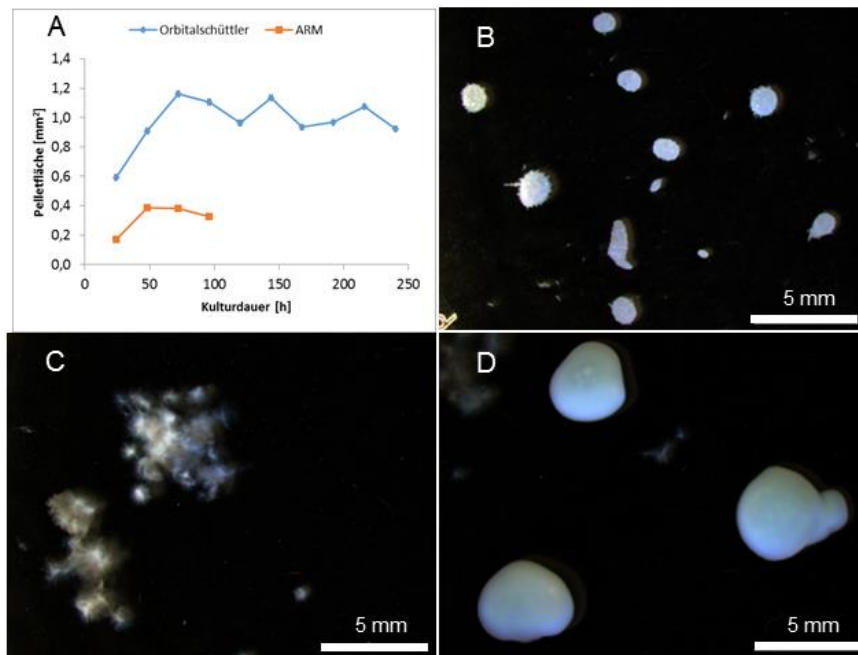
## Ergebnisse und Diskussion

In Vorversuchen erwiesen sich eine Kultivierungstemperatur von 30 °C, eine Luftfeuchtigkeit von 80 % und eine Beschleunigung von 6 g als bestmögliche Bedingungen für die ARM-Kultivierung. Bei höheren Temperaturen kam es trotz der aktiven Befeuchtung zu erhöhten Flüssigkeitsverlusten in den Kultivierungskolben; bei Beschleunigungen über 6 g wurde dieser Effekt noch verstärkt. Ein Vergleich beider Mischtechniken zeigt vor allem einen deutlichen Unterschied in den Wachstumsparametern Biomasse und Glucoseverbrauch, wobei die Werte vor allem im ARM zum Teil sehr hohe Standardabweichungen aufwiesen (Abbildung 2). Dies spiegelt sich auch im pH-Wert der Kulturen wieder. Der pH-Wert in Kulturen des Orbitalschüttlers steigt stetig an was auf eine Lyse der Pilzhyphen schließen lässt. Im ARM bleibt der pH-Wert hingegen relativ stabil, auch wenn der Unterschied zwischen den Kulturkolben zum Teil fast zwei pH-Einheiten umfasst. Dies kann auch die stabileren Enzymaktivitäten in den ARM-Kulturen im Vergleich zu denen des Orbitalschüttlers erklären (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Kulturparameter der Kultivierung von *C. cinerea* pYIG1 in 250 mL Erlenmeyerkolben auf einem Orbitalschüttler (150 rpm) und im ARM (6 g) bei 30 °C

Die über die Biomasse berechnete Wachstumsrate des Pilzes bezogen auf die ersten 4-5 Kulturstage ist im Orbitalschüttler dreimal höher ( $\sim 100 \text{ mg h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ) als in den ARM-Kulturen ( $\sim 32 \text{ mg h}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ), die getestete Enzymaktivität allerdings nur um das 1,5 fache. Um einen besseren Einblick über die Verteilung der Biotrockenmasse in der Kultur zu bekommen, wurden die Kulturen unter einem Mikroskop mit Hilfe einer Digitalkamera erfasst und ausgewertet. Dabei zeigten die Kolben des Orbitalschüttlers eine anfänglich stetige Zunahme der sichtbare Pelletgröße (zweidimensional), die sich jedoch bereits nach drei Tagen auf einen Wert von ca.  $1,0 \text{ mm}^2$  stabilisierte (Abbildung 3A). Die Morphologie in den ARM-Kolben folgte wie der Biotrockenmasse entsprechend einem geringeren Anstieg bis auf ca.  $0,4 \text{ mm}^2$ , jedoch war aufgrund des sehr heterogenen Wachstums nach vier Tagen keine sinnvolle Auswertung mehr möglich, da sich die Pellets aus einem Kolben sehr stark unterschieden (Abbildung 3B-D) und es zum Teil zu Agglomeraten und extrem großen Pellets von über  $70 \text{ mm}^2$  kam.



**Abbildung 3:** Gemittelte Fläche der Aufsicht der Pellets von *C. cinerea* über den Kulturverlauf im Orbitalschüttler und ARM (A). Pellets an Kulturtag 6 des Orbitalschüttlers (B) und des ARM (C+D).

Aus diesem Pilotversuch zur Kultivierung eines *C. cinerea* Transformanten im ARM lässt sich schließen, dass filamentöse Organismen durch die akustische Resonanz in ihrem submersen Wachstum stark beeinflusst werden. Ein homogenes Wachstum, das sich durch einheitliche Pelletgröße und –morphologie auszeichnet, konnte nur in den ersten Kulturtagen beobachtet werden. Dies bereitet vor allem Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit von Prozessparametern. Ein Wachstumsmodell konnte somit für den eingesetzten Pilz im ARM nicht erstellt werden. Daher scheint der ARM unter den getesteten Bedingungen für eine Kultivierung des filamentösen Modellorganismus *C. cinerea* nicht geeignet zu sein.

## Literatur

Fraatz MA, Rühl M, Zorn H (2014) Food and feed enzymes. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* 143:229-256.

Galperin I, Javeed A, Luig H, Lochnit G, Rühl M (2016) An aryl-alcohol oxidase of *Pleurotus sapidus*: heterologous expression, characterization and application in a 2-enzyme system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100:8021-8030.

Lin P-J, Scholz A, Krull R (2010) Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal* 49:213-220.

Meyer V (2013) Morphologische Formfindung in Hyphenpilzen — gleich oder ungleich? *Biospektrum* 19:489-491.

Paul GC, Thomas CR (1998) Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 60:1-59.

Rühl M, Kües U (2009) Automated image analysis to observe pellet morphology in liquid cultures of filamentous fungi such as the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 3:241-253.