

Wirkstoffe aus Pilzen mariner Habitats:
Mikrobiologische und biotechnologische Untersuchungen zur
Sekundärstoffproduktion am Beispiel *Penicillium janczewskii* H-TW5/869

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Master sc. agr. Jingmin Cai
geboren am 16. Juli 1963 in Hefei, China

Gutachter

1. Prof. Dr. Susanne Grabley (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. Wolfgang A. Knorre (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
3. Prof. Dr. Herwig Brunner (Universität Stuttgart)

Tag des Rigorosums: 14. 03. 2002

Tag der öffentlichen Verteidigung: 22. 03. 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	7
2.1	Chemikalien	7
2.2	Natürliches Seewasser und Künstliches Seewasser	7
2.2.1	Seewasser	7
2.2.2	Künstliches Seewasser AS III (Rippka et al. 1979)	7
2.3	Nährmedien	7
2.3.1	Kartoffel – Dextrose Medium (pg)	7
2.3.2	Schaumann Medium (SM)	8
2.3.3	B1 Medium	8
2.3.4	Stärke Medium (S)	8
2.3.5	Algen Antibiotika Medium (AB-Anti)	8
2.3.6	HPG-Medium	8
2.3.7	Czapek Hefeextrakt Agar Medium (CHA)	9
2.3.8	Malz Extrakt Agar Medium (MEA)	9
2.3.9	25% Glycerol Nitrat Agar (G25N)	9
2.3.10	Hefe - Stickstoff Basis (DIFCO)	9
2.3.11	Feststoffsubstrate	9
2.4	Mikroorganismen	10
2.4.1	Mikroorganismen für spezielle Tests	10
2.4.2	Terrestrische Penicillien	10
2.4.3	Marine Pilze	10
2.4.3.1	Isolierung der Pilze	10
2.4.3.2	Identifizierung der Pilze	11
2.4.3.3	Ausgewählte marine Pilze zur Kultivierung	11
2.5	Stammhaltung	12
2.6	Kultivierung der marinen Pilze	12
2.6.1	Standkultur	12
2.6.2	Schüttelkultur	12
2.6.2.1	Herstellung einer Sporensuspension von H-TW5/869	12

2.6.2.2	Kultivierungsbedingungen	12
2.6.3	Kultivierung im Bioreaktor	13
2.6.3.1	Vorkultur	13
2.6.3.2	10 l Bioreaktor: allgemeine Kultivierungsbedingungen	13
2.6.4	Feststoffsubstrat-Fermentation	13
2.7.	Proben - Aufarbeitung	13
2.7.1	Aufarbeitung der Proben aus dem Kulturüberstand	14
2.7.2	Aufarbeitung der Proben aus der Biomasse	14
2.7.3	Aufarbeitung der Proben aus der Feststoffkultur	14
2.8	Analytische Methoden	14
2.8.1	Bestimmung der Biotrockenmasse	14
2.8.2	Berechnung der spez. Wachstumsrate	15
2.8.3	Berechnung der Biomasseausbeute ($Y_{x/s}$)	15
2.8.4	Berechnung der Produktausbeute ($Y_{p/s}$)	15
2.8.5	Berechnung der spezifische Substrataufnahmerate q_s	16
2.8.6	Berechnung der spezifische Produktbildungsrate q_p	16
2.8.7	Bestimmung der Seewassersalinität	16
2.8.8	Bestimmung der Glukosekonzentration	17
2.8.9	Bestimmung der Konzentration der reduzierenden Zucker	17
2.8.9.1	Bestimmung der Konzentration der reduzierenden Zucker nach Miller	17
2.8.9.2	Bestimmung der Konzentration der reduzierenden Zucker nach Vukeli ^①	17
2.8.10	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)	17
2.8.11	Bestimmung der Ammoniumkonzentration	18
2.8.12	Biologische Aktivität	18
2.8.12.1	Antimikrobiologische Wirkungstest	18
2.8.12.2	Cytotoxische Aktivitäten	19
2.8.12.2.1	Cytotoxisches Test mittels CHO-K1 Zellen	19
2.8.12.2.2	Cytotoxischer Test mittels <i>Artemia salina</i>	19
2.8.13	Dünnschichtchromatographie	19
2.8.14	Strukturaufklärung	20
2.8.15	Produktbestimmung mittels HPLC	20
3	Ergebnisse aus der Zusammenarbeit im Verbundprojekt	22
3.1	Darstellung des Verbundprojektes	22
3.2	Marine Pilze	23

3.3	Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der antimikrobiellen Aktivität der Isolate und dem Habitat der marinen Pilzen	24
3.4	Chemisches und Biologisches Screening	24
3.5	Kultivierung und Produktgewinnung	25
3.6	Stammauswahl für die weitere Durchführung dieser Arbeit	28
3.6.1	Bewertung der Aktivität des Isolates H-TW5/869	29
3.6.2	Strukturaufklärung der Naturstoffe des Isolates H-TW5/869	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Identifizierung des Isolates H – TW5/869	31
4.1.1	Morphologische Charakterisierung	31
4.1.2	Identifizierung nach John I. Pitt	32
4.2	Substratverwertung des Isolates H-TW5/869	33
4.3	Untersuchung des Phoma-Pattern der Isolate TM 76, H-TW5/869 und DSM 847	36
4.4	Die Sekundärmetabolite von Stamm H-TW5/869 und ihre biologische Aktivitäten	37
4.5	Einfluß von Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin auf die DQ1-Bildung und Wachstum des Organismus	40
4.6	Vergleich der Metabolitsynthese von H-TW5/869 mit zwei terrestrischen Stämmen DSM 847 und DSM 62867	42
4.7	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens und der Dihydroquinolinon Produktion von <i>Penicillium janczewskii</i> H-TW5/869	46
4.7.1	Einfluß verschiedener Medien auf das Wachstum und die Dihydroquinolinon (DQ1) Bildung	46
4.7.2	Untersuchung des Prozeßverlaufs in Schüttelkulturen	47
4.7.3	Untersuchung des Prozeßverlaufs im 10 l Bioreaktor	48
4.7.4	Optimierung des Wachstums und der DQ1-Produktion	49
4.7.4.1	Wachstum von H-TW5/869 auf der Agarplatte in Abhängigkeit von der Salinität und der Temperatur	50
4.7.4.2	Einfluß der Salinität auf das Wachstum und die Dihydroquinolin Produktion in der Standkultur	51
4.7.4.3	Einfluß der Salinität auf das Wachstum von H-TW5/869 und die DQ1-Produktion in der Schüttelkultur	53

4.7.4.4	Einfluß des Anfangs-pH auf das Wachstum und die DQ1-Produktion	59
4.7.4.5	Einfluß der Stickstoffquelle auf das Wachstum und die DQ1 Produktion	60
4.7.4.5.1	Einfluß der Zugabe von Aminosäuren	60
4.7.4.5.2	Einsatz anderer Stickstoffquellen	62
4.7.4.6	Einfluß der Konzentration des pg-Mediums und der Mediumzufütterung auf das Wachstum und die DQ1 Bildung	63
4.7.5	Optimierung der DQ1-Produktion in Schüttelkulturen durch statistische Versuchsplanung (Orthogonale Faktorisierung) (OF)	66
4.7.6	Optimierung der Belüftung	66
4.7.7	Produktion von DQ1 unter optimierten Bedingungen im 10 l Bioreaktor	67
4.7.8	Fed Batch Kultur in einem 10 L Bioreaktor	69
4.8	Feststoffsubstratfermentation (SSF) des marine Pilzisolates H-TW5/869	71
5	Diskussion und Ausblick	76
5.1	Marine Pilze, eine gute Ressource für neue Naturstoffe	76
5.2	Vergleich des marine Isolates <i>Penicillium janczewskii</i> (H-TW5/869) und des terrestrischen Stammes <i>Penicillium janczewskii</i> (DSM 847)	77
5.2.1	Substratverwertung	77
5.2.2	<i>Phoma</i> -Pattern	78
5.2.3	Vergleich der sekundären Metabolite von dem terrestrischen <i>Penicillium janczewskii</i> (DSM 847) und dem marinen <i>Penicillium janczewskii</i> (H-TW5/869)	79
5.3	Gruppen der Sekundärmetabolite des Pilzisolates H-TW5/869	79
5.4	Einfluß von Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin auf die DQ1 Bildung	81
5.5	Prozeßgrößen für das Wachstum und die DQ1 Bildung	82
5.6	Abhängigkeit der DQ1-Bildung von der Wachstumsrate	85
6	Zusammenfassung	86
7	Literatur	89
8	Abkürzungsverzeichnis	99

1 Einleitung

Seit der Entdeckung des Penicillins und seiner Wirksamkeit werden weltweit Naturstoffe für pharmakologische Anwendungen gesucht. Etwa 30% der in der Praxis verwendeten Medikamente sind von Naturstoffen entwickelt (Grabley & Thiericke, 1999 a). Bis heute sind über 150,000 Naturstoffe aus Pflanzen, Tieren und den Kulturen von Mikroorganismen isoliert und charakterisiert (Steglich et al., 1997). Weniger als 10% der Naturstoffe sind aus marinen Lebewesen isoliert (Lindequist et al., 1999). Etwa 50,000 Substanzen stammen aus Mikroorganismen (Fenical & Jensen, 1993; Berdy, 1995), davon sind bisher nur ca. 235 neue Naturstoffe aus marinen Pilzen in der Literatur beschrieben.

Die Entdeckung der Naturstoffe aus dem Meer ist der Vielfalt der Biodiversität der marinen Lebewesen nicht entsprechend. Das Meer bedeckt etwa 70% unserer Erdoberfläche und besteht aus vielen verschiedenen Habitaten, von der Ufernähe bis hin zur Hochsee, vom tropischen Meer bis zu Polarzonen, heißen Quellen und der Tiefsee. Das Hauptproblem für die Naturstoffsuche aus marinen Organismen, die Testung ihrer biologischen Wirkung und insbesondere für die Produktion des Naturstoffes ist fast immer die schwierige Beschaffung ausreichender Materialmengen unter Schonung der natürlichen Vorkommen. Außerdem ist der Stand der Forschung und die Kenntnisse über marine Naturstoffe und ihre Biosynthese naturgemäß nicht so weit entwickelt wie die der terrestrischen Naturstoffproduzenten. Durch Vergleich mikroskopischer und genetischer Untersuchungen wurde festgestellt, dass zur Zeit nur ganz wenige marine Mikroorganismen im Labor kultiviert werden können. Schätzungsweise 99-99,9 % der vermuteten marinen Mikroorganismen sind nicht kultivierbar. Solche technischen Probleme verhindern noch die Nutzung mariner Naturstoffe in der pharmazeutischen Industrie.

Trotz der Schwierigkeiten zeigt die marine Naturstoffforschung viel versprechende Ergebnisse. Einige ungewöhnliche Strukturen und wichtige biologische Wirkungen mariner Naturstoffe sind beschrieben. Die meisten dieser Verbindungen sind aus marinen Tieren isoliert. Als Beispiele werden die Strukturen der beiden interessanten Substanzen Ecteinascidin 743 und Bryostatin 1 in Abb. 1.1 dargestellt. Die beiden Substanzen besitzen gute Antitumorwirkungen und sind schon in der zweiten klinischen Prüfung. Ecteinascidin 743, isoliert aus Tunicate *Ecteinascidia turbinata*, ist ein Alkaloid, und zeigte eine gute anti-mitotische Wirkung (Typ IV: microtubule network disorganisation) (Munro et al. 1999).

Bryostatin 1 wurde aus dem Moostierchen *Bugula neritina* isoliert. Es ist den makrocyclischen Lactonen zuzuordnen und zeigt bei Krebs wie Leukämie, Lymphomen, Melanomen und Soliden-Tumoren eine gute Wirkung (Pluda et al., 1996). Bryostatin 1 kann die Aktivität von Proteinkinase C hemmen. Das könnte die mechanistische Basis für die Antitumoraktivität sein.

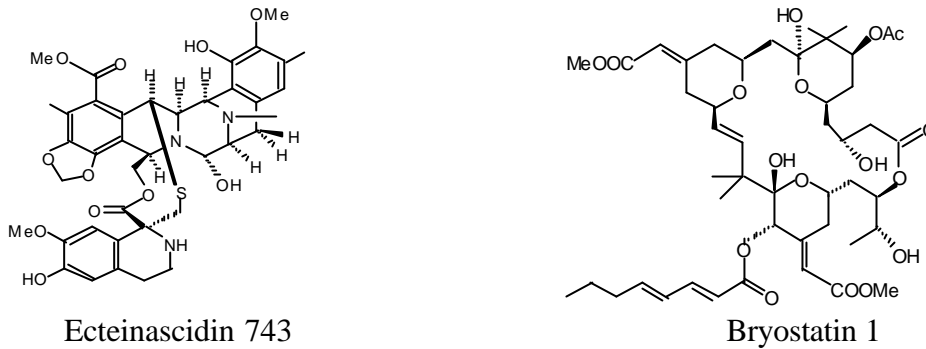


Abb. 1.1: Molekülstruktur von Ecteinascidin 743 und Bryostatin 1

Marine Naturstoffe sind von Faulkner (1977, 1984, 1986, 1987, 1988, 1990, 1991, 1992a, 1992b, 1993, 1994, 1995, 1996, 1997, 1998, 1999, 2000a, 2000b, 2000c, 2001), Liberra & Lindquist (1995), König & Wright (1996, 1998), Pietra (1997), Biabani (1998) und in der Datenbank MarLit zusammengefaßt.

Da die meisten in der Literatur beschriebenen marinen Naturstoffe aus marinen Invertebraten und Pflanzen isoliert sind, bleibt die Frage offen, ob diese Naturstoffe von den Pflanzen oder den Invertebraten selbst gebildet werden. Beispielsweise sind Schwämme, die eine gute Quelle für neue Naturstoffe sind, mit verschiedenen Bakterien, Pilzen und Algen assoziiert (Proksch 1991, Schmidt, et al., 2000). Aus den isolierten Mikroorganismen wurden viele neue Substanzen gewonnen und beschrieben (Bergman & Feeney, 1951, Hüners 1999, Höller, 1999a, 1999b). Von dem marinen Schwamm *Halichondria panicea* wurde ein symbiotisches Bakterium von der Gattung *Rhodobacter* nachgewiesen (Althoff et al., 1998). Im Prinzip stellt also der Schwamm einen Wirt für eine komplizierte Biogemeinschaft dar. In einigen Fälle ist es schon bekannt oder wahrscheinlich, dass die Mikroorganismen für die Naturstoffbildung in den Invertebraten verantwortlich sind (Haygood et al., 1999). Die Arbeitsgruppe von Haygood hat nachgewiesen, dass das Bryostatin vom bakteriellen Symbiont „*Candidatus Endobugula sertula*“ biosynthetisiert wird (Davidson et al., 2001). Daher wird jetzt versucht, die verantwortlichen Gene zu isolieren und mit gentechnisch manipulierten Bakterien

Bryostatatin zu produzieren. Das würde ein wesentlicher Fortschritt für die pharmazeutische Produktion des Bryostatins bedeuten.

Im Vergleich zu zahlreichen Naturstoffen mit interessanten chemischen Strukturen aus terrestrischen Pilzen, sind nur wenige Naturstoffe aus marinen Pilzen beschrieben. Die in Abb. 1.2 dargestellten Ergebnisse einer Literatur- und Datenbank-Recherche zeigen eine deutliche Zunahme bei der Entdeckung der neuen Naturstoffe aus marinen Pilzen seit 1995. Die bisherigen Publikationen über neue Naturstoffe aus marinen Pilzen zeigen 3 Phasen. Vor 1985 sind nur etwa sechs neue Verbindungen aus marinen Pilzen beschrieben worden. Von 1985 bis 1995 ist eine langsame Steigerungsrate zu beobachten. In diesen 10 Jahren sind 74 neue Naturstoffe aus marinen Pilzen beschrieben, davon über 55% von japanischen Arbeitsgruppen. Die Zeit ab 1995 zeigt ein großes Interesse der Wissenschaftler verschiedener Länder an diesem Gebiet. Insbesondere ist in den letzten beiden Jahren jeweils über ca. 30 neue Substanzen aus marinen Pilzen berichtet worden.

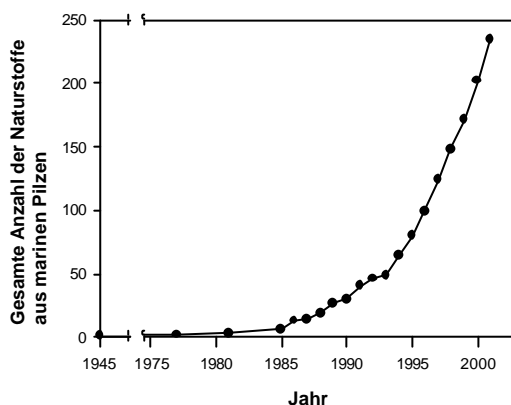


Abb. 1.2: Entwicklungstendenz der Entdeckung der neuen Naturstoffe aus marinen Pilzen

Der erste wichtige Naturstoff aus einem marinen Pilz wurde im Jahr 1945 beschrieben. Cephalosporin C (Abb. 1.3) ist ein wichtiger Naturstoff und Ausgangspunkt für partialsynthetische Derivate. Der produzierende Pilz *Acremonium chrysogenum* wurde aus Seewasserproben vor der Küste Sardinien gewonnen (König, 1992).

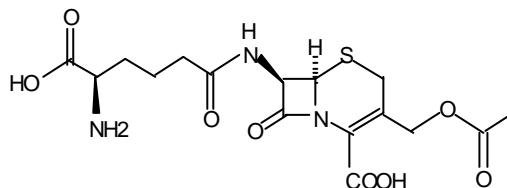


Abb. 1.3: Molekülstruktur von Cephalosporin C

Die marinen Pilze stellen keine taxonomisch-systematische, sondern eine ökologisch-physiologisch definierte Gruppe innerhalb der Pilze dar. Die Definition „marine Pilze“ wurde

von Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979) eingeführt und von Schaumann (1993) weiter entwickelt. Als **obligat marine Pilze** gelten diejenigen, die ausschließlich in marinen oder ästuarin-brackigen Lebensräumen wachsen und sporulieren, als **fakultativ marine Pilze** diejenigen, die in limnischen oder terrestrischen Lebensräumen zu Hause sind, aber auch in marinen Habitaten wachsen (und dort möglicherweise auch sporulieren). Als **marine Isolate** wurden diejenigen bezeichnet, die als reine Kultur aus marinen Habitaten isoliert wurden und im marinen Medium (möglicherweise auch in anderen) wachsen können. Sie werden nicht als echt marin akzeptiert, wenn ihr aktives Wachstum und ihre metabolische Teilnahme im marinen Ökosystem nicht nachgewiesen ist. Wenn es nachgewiesen ist, dann wird der Pilz der Gruppe von fakultativ oder obligat marinen Pilze zugeordnet. Es sind etwa 900 Arten von marinen Pilzen beschrieben, von denen die meisten zu den Ascomyceten gehören (Molitoris, 1995). Schaumann (1993) schätzt ab, dass es mindestens 6000 höhere Pilzarten gibt.

Bis jetzt gibt es noch wenige Erfahrungen mit der Kultivierung mariner Pilze. Ihre Kultivierung ist bisher im wesentlichen aus der Erfahrung mit terrestrischen Pilzen übernommen worden. Ob marine Pilze, insbesondere obligat marine Pilze, mit den zur Zeit angewandten Kultivierungsverfahren zur Sekundärmetabolitbildung angeregt werden können, ist auch noch nicht klar. Fenical hat berichtet, dass die von marinen Mikroorganismen gefundenen Naturstoffe bei Schüttelkulturen oft nicht reproduziert werden kann (Fenical, Fachtagung in Greifswald, 1999). Die meisten Arbeitsgruppen benutzen deswegen zur Zeit nur die Standkultur, die keine großen Kultivierungsvolumina zulässt.

Hauptsächlich werden Reinkulturen für die Naturstoffsuche verwendet. Allerdings sind viele marine Pilze aus komplizierten Biogemeinschaften isoliert worden. Die Bedeutung der Naturstoffe von marinen Organismen in ihren Habitaten ist bis jetzt unklar. Es stellt sich die Frage, ob eine Kofermentation für die marine Naturstoffsuche sinnvoll ist? Die Arbeitsgruppe Fenical hat einen interessanten Versuch präsentiert: Ein aus der Alge *Rosenvingea* sp. isolierter mariner Pilz (Gattung *Pestalotia*) konnte das neue Antibiotikum Pestalone nur produzieren, wenn der Pilz mit marinen Bakterien CNJ-328 ko-kultiviert wurde (Cueto et al., 2001).

Es gibt bisher nur wenig Literatur über die Optimierung der Naturstoffproduktion von den marinen Pilzen. (Tsai et al, 1997, Zaehle, 1997, Helmholz, 1998)

Nach der ersten Auffindung der neuen Naturstoffe in unserem Verbundprojekt wurde das Thema zur Promotionsarbeit auf das marine Isolat *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 konzentriert. Der Stand der Naturstoffsuche aus marinen Isolaten *Penicillium* sp. ist in

Tab 1.1 dargestellt. Zum Zeitpunkt Ende 2001 waren weltweit 36 neue Substanzen aus marinen *Penicillium* sp. isoliert worden, ca. 14% der gesamten neu gefundenen Substanzen aus marinen Pilzen.

Tab. 1.1: Naturstoffe vom marinen Isolat *Penicillium* sp.

Isolat	Material	Naturstoff	Biologische Aktivität	Jahr	Literatur
<i>Penicillium brevi-compactum</i>		Piperazinediones A-C		1990	Ayer et al.
<i>Penicillium fellutanum</i>	Fisch <i>Apogon endekataenia</i>	Fellutamides A, B	Cytotoxisch	1991	Shigemori et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Alge <i>Enteromorpha intestinalis</i>	Communesins A, B	Cytotoxisch	1993	Numata et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Sediment	Epolactaene	Neurotrophisch	1995	Kekeya et al.
<i>Penicillium</i> sp.		Penochalasin A-C		1996	Numata et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Alge <i>Enteromorpha intestinalis</i>	Penostatins A-D	Cytotoxisch	1996	Takahashi et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Sediment	Acetophthalidin	Inhibitor des Zyklus von Säugerzellen	1996	Cui et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Alge <i>Enteromorpha intestinalis</i>	Penostatins F-I	Cytotoxisch	1998	Iwamoto et al.
<i>Penicillium brevi-compactum</i>	Alge Sargassum	Cis-bis(methylthio)silvatin	Cytotoxisch	1998	Amagata et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Sediment	NI 15501 A	Antibiotika	1998	Onuki et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Alge <i>Avrainvillea longicaulis</i>	11,11'-dideoxyverticillin A(1); 11'-deoxyverticillin A(2)	Cytotoxisch	1999	Son et al.
<i>Penicillium</i> sp.	bivalve <i>Mytilus</i>	Coruscol A		2000	Kagata et al.
<i>Penicillium</i> sp.	marine bivalve <i>Mytilus</i>	Sculezonones A, B		2000	Komatsu et al.
<i>Penicillium</i> sp. (strain #386)		Penicillazine (1)		2000	Lin et al.
<i>Penicillium steckii</i>		Tanzawaic acid E, F 3,7-dimethyl-1,8-dihydroxy-6-methoxyisochroman (3)		2000	Malmstrom et al.
<i>Penicillium</i> sp.	Alge	Penochalasin D-H	Cytotoxisch	2001	Iwamoto et al.

Diese Arbeit wurde im Verbundprojekt „Wirkstoff aus marinen Pilzen“ durchgeführt. Der Projektpartner AWI hat 516 marine Pilze aus der Nordsee, Polargewässern und der Norwegischen See für das Screening zur Verfügung gestellt. Als Ergänzung wurden von uns 146 marine Pilze aus der Nordsee, einschließlich dem Jadebusen, der Ostsee und dem Mittelmeer isoliert, so dass insgesamt 662 Pilzisolat zur Verfügung standen.

Nach einem chemischen Screening beim HKI und einem biologischen Screening (BRAIN, HKI) und einer Bewertung wurden Pilzisolat mit hohen Bewertungen für Massenkultivierungen ausgewählt.

Die anzuwendenden Kultivierungsmethoden (Bioreaktorkultur, Standkultur, Feststofffermentation) waren vorweg mit eigenen Pilzisolaten untersucht und allgemeine günstige Bedingungen für die Sekundärstoffproduktion festgestellt worden. Außerdem mußten Aufarbeitungsverfahren ausgewählt und geprüft werden.

Das Rohprodukt wurde im HKI gereinigt und reine Substanzen isoliert und anschließend die Strukturaufklärung durchgeführt. Das erste Isolat, aus dem die Bildung neuer Wirkstoffe nachgewiesen worden waren, wurde als Stamm für die Vertiefung der Durchführung dieser Arbeit ausgewählt.

Der marine Pilz wurde mit einem Identifizierungsprogramm identifiziert. Einige wichtige physiologische Größen wie Substratverwertung, Phoma-Pattern und Sekundärmetabolite wurde mit dem terrestrischen Isolat verglichen. Typische marine Eigenschaften des marine Isolates wurden charakterisiert und mit dem terrestrischem Isolat verglichen. Unter besonderer Beachtung der Meeresbedingungen wurde die Optimierung der Produktbildung durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsrate und der Produktbildung wurde untersucht. Als neue Kultivierungsmethode der marinen Pilze für die Suche der Naturstoffe wurde die Bildung von Sekundärmetaboliten des Pilzisolates mit verschiedenen Feststoffsubstraten untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen geliefert: Difco-Laboratories, Detroit/USA; Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm; Grüssing, Filsum; Merck, Darmstadt; Riedel de Haen, Seelze; Sigma Chemical Company, USA.

2.2 Natürliches Seewasser und Künstliches Seewasser

2.2.1 Seewasser

Seewasser wurde aus dem Jadebusen gewonnen. Das Seewasser wird erst durch einen Sandfilter gefiltert, bei 4°C 1 Woche gelagert und dann noch einmal durch einen Wattefilter gereinigt. Die Salinität des Seewassers liegt bei 3%.

2.2.2 Künstliches Seewasser AS III (g/l) (Rippka et al. 1979)

NaCl 29.5; MgCl₂ * 6 H₂O 2.0; MgSO₄ * 7 H₂O 3.5; KCl 0.5; CaCl₂ * 2 H₂O 0.5; Zitronensäure 0.003; Na₂CO₃ 0.052; K₂HPO₄ 0.015; Eisen (III) citrat 0.005; EDTA 0.00075; Spurenelemente 1 ml.

Zusammensetzung der Spurenelementlösung: H₃BO₃ 2860.0 mg; MnCl₂ * 4 H₂O 1810.0 mg; Na₂MoO₄ * 2 H₂O 390.0 mg; ZnSO₄ * 7 H₂O 222.0 mg; CuSO₄ * 5 H₂O 79. mg; Co(NO₃) * 6 H₂O 49.9 mg; Bidest. H₂O 1000 ml.

2.3 Nährmedien

Alle Medien werden 15-20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten und Schrägar wird dem Medium jeweils 20 g l⁻¹ Difco Agar hinzugefügt.

2.3.1 Kartoffel – Dextrose Medium (pg)

Standard Medium von DIFCO. Vor dem Autoklavieren wird 24 g Kartoffel-Dextrose-Pulver in 1 l Wasser (oder Seewasser) suspendiert und gekocht, damit das Pulver komplett gelöst wird.

Das Medium wird für die Kultivierung der Isolate in größeren Volumen eingesetzt.

2.3.2 Schaumann Medium (g/l) (SM)

NH₄NO₃ 1.0, Glucose 1.0, Pepton 0.5, Hefeextrakt 0.1, Vitaminlösung 1ml

pH – Korrektur auf 7.2–7.4

Vitaminlösung: Vitamin B₁ 50 mg, B₁₂ Vitamin H 50 mg, Bidest. H₂O 1000 ml.

Das HPGS Medium wird für die Pilzisolierung und Konservierung verwendet.

2.3.3 B1 Medium (g/l)

Glucose 5.0, Pepton 2.0, Hefeextrakt 1.0, mit Seewasser oder künstlichem Seewasser

pH – Korrektur auf 7.2

Das Medium wurde für die Kultivierung der Isolate in größeren Volumen verwendet.

2.3.4 Stärke Medium (g/l) (S)

Stärke 10; Mais geschrotet 3; Glucose 1; (NH₄)₂SO₄ 6; Pepton 0.5; KH₂PO₄ 2.4; K₂HPO₄ 2.1, Seewasser

2.3.5 Algen Antibiotika Medium (AB-Anti)

30 g frische Braunalgen (Fucus) wird in 1 l Seewasser 10 min gekocht. Nach dem Filtrieren werden Antibiotika hinzugefügt.

Zusammensetzung der Antibiotikallösung (Ende Konzentration, ppm) (Tan & Stalpers, 1987):

Penicillin-G 50, Streptomycin 30-50, Aureomycin 10-50, Neomycin 100, Rifampicin 5, Chloramphenicol 50, Novobiocin 100 oder Vanomycin 10.

Die Braunalgen wurden an der Nordseeküste gesammelt.

Das AB-Anti diente als Medium für die eigene Isolierung mariner Pilze.

2.3.6 HPG-Medium (g/l)

Hefeextrakt 3.0, Pepton 5.0, Glukose 1.0, Bedist. Wasser.

pH – Einstellung auf 7,2 –7,4

Das Medium wurde für Hemmungstest eingesetzt.

2.3.7 Czapek Hefeextrakt Agar Medium (g/l) (CHA)

K₂HPO₄ 1.0, Czapek Konzentrat 10ml, Hefeextrakt 5.0, Sucrose 30, Agar 15, Bidest. Wasser.
Czapek Konzentrat: NaNO₃ 30g, KCl 5g, MgSO₄·7H₂O 5g, FeSO₄·7H₂O 0.01, ZnSO₄·7H₂O 0.01, CuSO₄·5H₂O 0.05, Bidest. Wasser.

Das Medium wurde für die Identifizierung von H 145 verwendet.

2.3.8 Malz Extrakt Agar Medium (g/l) (MEA)

Malz Extrakt (Prüvler) 20, Pepton 1.0, Glukose 20, Agar 20, Bidest. Wasser.

Das Medium wurde für die Identifizierung von H 145 verwendet.

(ME = ohne Agar)

2.3.9 25% Glycerol Nitrat Agar (g/l) (G25N)

K₂HPO₄ 0.75, Czapek Konzentrat 7.5ml, Hefeextrakt 3.7, Glycerol, p. A. 250, Agar 12, Bidest. Wasser 750ml.

Das Medium wurde ebenfalls für die Identifizierung von H 145 verwendet.

2.3.10 Hefe - Stickstoff Basis (DIFCO)

Hefe Stickstoff Basis enthält alle essentiellen Nährstoffe und Vitamine, die zur Kultivierung von Hefe erforderlich sind, mit Ausnahme einer Kohlenstoffquelle. Die Inhaltsstoffe sind von bekannter chemischer Zusammensetzung.

Gebrauchsfertiges Medium: Aseptisch 0.5 ml der 10fach konzentrierten Lösung in 4.5 ml steriles Wasser pipettieren. End-pH Wert: 5.5.

Dieses Medium wurde zum Testen der Substratverwertung des Pilzes angewendet.

2.3.11 Feststoffsubstrate

In der Tabelle 2.1 sind die Medien beschrieben, die zur Feststoffsubstrat-Fermentation getestet wurden. Dafür wurden Mischungen aus dem Feststoffsubstraten Weizenkleie, Stärke, Algen und Sägemehl hergestellt und Seewasser beigegeben.

Tab. 2.1: Zusammensetzung des Feststoffsubstrates

Medium	Weizenkleie (g)	Algen (g)	Stärke (g)	Sägemehl (g)	Glukose (g)	Seewasser (ml)
WAS	3	3	1.5	-	-	11.5
WASG	3	3	1.5	-	0.5	11.5
W	7.5	-	-	-	-	11.5
WG	7.5	-	-	-	0.5	11.5
WASS	2	2	1.5	2	-	11.5
WASSG	2	2	1.5	2	0.5	11.5
WSS	4	1.5	-	2	-	11.5
WSSG	4	1.5	-	2	0.5	11.5

2.4 Mikroorganismen

2.4.1 Mikroorganismen für spezielle Tests

Als Indikatormikroorganismen wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt:

Bacillus subtilis ATCC 23350; *E. coli* ATCC 23716 und SG 458 (HKI Teststamm); *Micrococcus luteus* ATCC 4698; *Candida boidinii* ATCC 18810; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p und SG 511(HKI Teststamm); *Mycobacterium vaccae* SG 987(HKI Teststamm); *Sporobolomyces salmonicolor* (HKI Teststamm).

2.4.2 Terrestrische Penicillien

Penicillium simplicissimum DSM 62867; *Penicillium janczewskii* DSM 847

2.4.3 Marine Pilze

2.4.3.1 Isolierung der Pilze

Die meisten für den Versuch verwendeten marinen Pilze (516 Isolate) wurden von der Forschungsgruppe Dr. K. Schaumann (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven, AG Marine Mykologie) zur Verfügung gestellt. 146 eigene marine Isolate wurden aus den Küstenbereichen der Nordsee, Ostsee und dem Mittelmeer

gewonnen. Das Isolierungsverfahren ist in Abb. 2.1 dargestellt. Die eigenen Isolate sind mit TM bezeichnet.

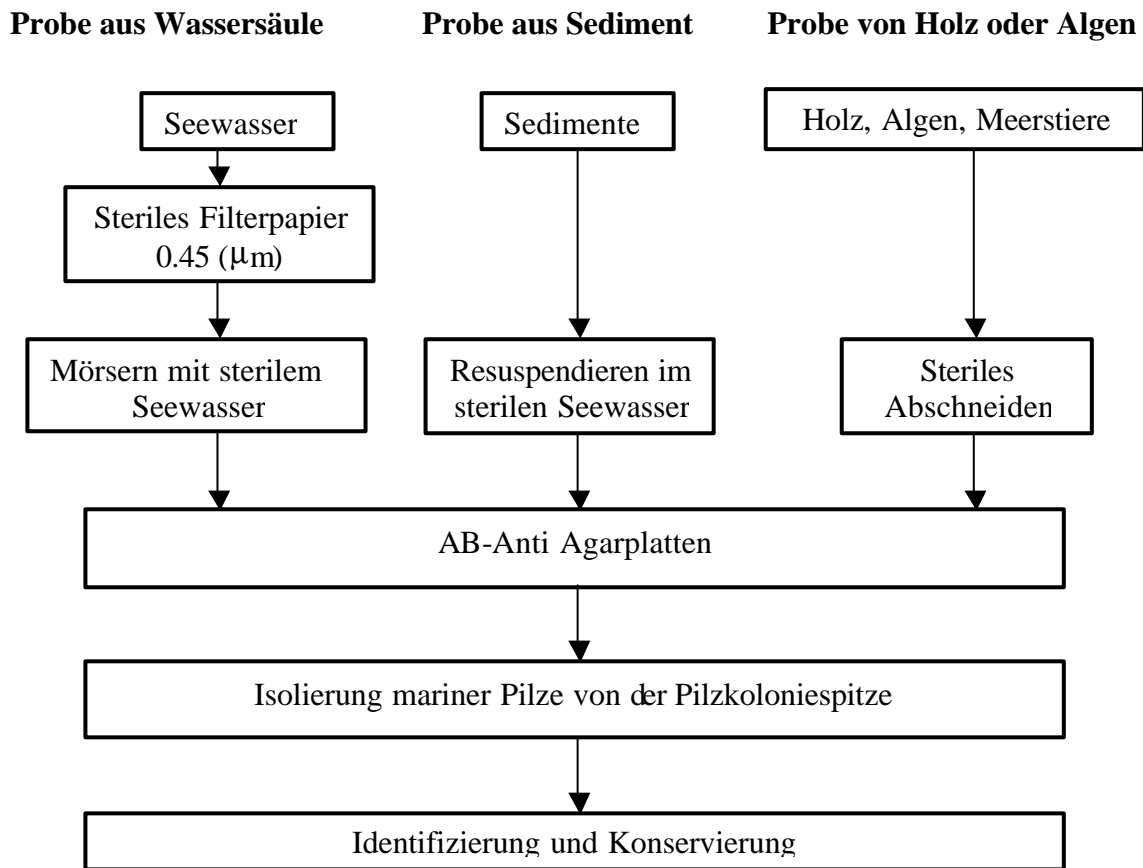


Abb. 2.1: Das Isolierungsverfahren der marinen Pilze

2.4.3.2 Identifizierung der Pilze

Die Pilze aus der KMPB (Kultursammlung Mariner Pilze in Bremerhaven) wurden von Dr. Schaumann und Dr. Schünke identifiziert. Die eigenen Isolate wurden nach dem Buch von Kohlmeyer: *Marine Fungi, The higher fungi*, (Kohlmeyer et al. 1979) und (Kohlmeyer et al. 1991) identifiziert. Das *Penicillium* sp. wurde nach dem Buch (*The Genus PENICILLIUM and its teleomorphic states, Eupenicillium and Talaromyces*) Pitt 1979 identifiziert.

2.4.3.3 Ausgewählte marine Pilze zur Kultivierung

Um die neuen Naturstoffe isolieren und ihre Struktur aufklären zu können, wurde 25 Stämme in Bioreaktoren oder in Standkulturen von 10 l bis 40 l kultiviert (Tab. 3.3).

2.5 Stammhaltung

Die isolierten Stämme wurden eine Woche auf Schrägagar kultiviert. Für kurzzeitige Konservierungen wurden die Schrägagarröhrchen bei 4 °C gelagert und jeden Monat einmal überimpft. Nach dem Kultivieren werden die Stämme im sterilem Glycerin gehalten, so dass sie einige Monate konserviert gehalten werden können. Die Langzeitkonservierung sollte mit flüssigem Stickstoff erfolgen.

2.6 Kultivierung der marinen Pilze

Die marinen Pilze wurden in Standkulturen, Schüttelkulturen, und in 10 l Bioreaktoren submers und im Feststoffsubstrat kultiviert.

2.6.1 Standkultur

Die Standkultur wurde im Fernbachkolben (1L Medium/1.8L Kolben) durchgeführt. 12-14 Probenstücke der Agarkulturen (ca. 5mm x 5mm) wurden als Impfkultur verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 25°C. Die Kultivierungsdauer variierte bei den unterschiedlichen Pilzstämmen.

2.6.2 Schüttelkultur

Die Schüttelkultur wurde in Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt. Sie wurde für die Optimierung der Kultivierungsbedingungen und Mediumszusammensetzung, sowie als Vorkultur für 10 L Fermentationen eingesetzt.

2.6.2.1 Herstellung einer Sporensuspension von H-TW5/869

Nach einer siebentägigen Kultivierung bildet H-TW5/869 Sporen. Die Sporen von einer Agarplatte wurden gesammelt und in 30 ml sterilem Seewasser mit 40 ml Glaskügelchen (Ø 4mm) 30 Minuten durch Schütteln suspendiert. Die Sporenkonzentration wurde auf $3 - 4 \times 10^6$ Sporen/ml eingestellt.

2.6.2.2 Kultivierungsbedingungen

5 ml Sporensuspension wurden 100 ml Medium hinzugefügt, und bei 100 Upm und 25°C

kultiviert. Die Kultivierungsdauer, sowie die anderen Parameter wurden dem Untersuchungsbedarf angepaßt.

2.6.3 Kultivierung im Bioreaktor

2.6.3.1 Vorkultur

Die Vorkultur für die 10 l Bioreaktorkultivierung wurde in 5 Schüttelkolben mit 200 ml Medium gewonnen. Nach einer Kultivierung von 60 Stunden wurden die Kulturen unter der Cleanbench in einem Animpfkolben zusammengefügt. Damit wurde für den 10 l Bioreaktor ein Inokulum von 10 % eingesetzt.

2.6.3.2 10 l Bioreaktor: allgemeine Kultivierungsbedingungen

Der 10 l Bioreaktor wurde zur Gewinnung von Biomasse und Produkten eingesetzt, sowie für Untersuchungen zur Optimierung der Kultivierung mariner Pilze in gerührten und belüfteten Bioreaktoren. Unabhängige Prozeßgrößen, wie die Rührerdrehzahl, die Belüftungsrate (Luftdurchsatz), Anfangs-pH und Temperatur wurden nach Bedarf eingestellt. Der Sauerstoffpartialdruck und der pH-Wert wurden on-line gemessen. Die Bestimmung anderer abhängiger Prozeßgrößen wird in 2.9 beschrieben.

2.6.4 Feststoffsubstrat-Fermentation

Die Feststoffsubstrat-Fermentation wurde im Erlenmeyerkolben durchgeführt. 7.5 g Feststoffmedium wurde in 100 ml Erlenmeyerkolben eingesetzt. Nach der Mischung mit 11.5 ml Seewasser wurden die Kolben im Autoklav bei 120°C 25min autoklaviert. 2 ml Sporensuspension wurde hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 25°C für 4 Tage.

2.7 Proben - Aufarbeitung

Um die Produktkonzentration zu bestimmen, wurde die Kulturprobe aufgearbeitet. Dazu wurden der Überstand und die Biomasse getrennt bearbeitet.

2.7.1 Aufarbeitung der Proben aus dem Kulturüberstand

Die Aufarbeitung erfolgte durch Festphasen-Extraktion. Die Inhaltsstoffe von 90 – 100 ml Überstand wurden zunächst an einer 1 ml AmberchromTM 161C Säule (SUPELCO, USA) adsorbiert. Nach dem Waschen mit 50 ml bidest. Wasser wurden die Substanzen mit 10 ml Methonal eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer getrocknet und die Probe wurden dann mit 2 ml Methanol gelöst.

2.7.2 Aufarbeitung der Proben aus der Biomasse

Die Biomasse (ca. 1g) wurde zunächst mit gereinigtem Seesand gemörsert und mit 100 ml Methanol 24 h extrahiert. Die Probe wurde dann 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend filtriert. Nach dem Trocknen im Rotationsverdampfer wurde die Probe mit 50 ml bidest. Wasser resuspendiert und durch eine 3 ml AmberchromTM 161C Säule adsorbiert und mit 20 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsverdampfer getrocknet. Die Probe wurde dann im 2 ml Methanol gelöst.

2.7.3 Aufarbeitung der Proben aus der Feststoffkultur

Die Kultur (7.5 –8.0 g trockenes Medium) wurde mit 100 ml Methanol gemischt und 24 h extrahiert. Die Probe wurde dann 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach dem Filtrieren wurde das Filtrat im Rotationsverdampfer getrocknet. Das trockene Substrat wurde mit 150 ml bidest. Wasser gelöst. Die Lösung wurde über eine 3 ml AmberchromTM 161C Säule gegeben. Die Säule wurde mit 20 ml bidest. Wasser gespült und dann mit 20 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Rotationsdampfer getrocknet. Die Probe wurde dann im 2 ml Methanol gelöst. Für die HPLC Analyse wurde die Probe zehnfach verdünnt.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden dem Bioreaktor oder Kolben zu ausgewählten Zeitpunkten Proben entnommen (2 mal 10-20 ml) und durch abgewogenes Filterpapier filtriert. Nach dem Spülen mit destilliertem Wasser wurde das Papier im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und anschließend im

Exsikkator abgekühlt. Die erneute Wägung des Papiers führte zur Ermittlung der Biotrockenmasse.

2.8.2 Berechnung der spez. Wachstumsrate

Für eine exponentielle Wachstumsphase gilt folgende Differentialgleichung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

wobei μ die relative Wachstumsrate ist. Die exponentielle Wachstumsfunktion ergibt sich bei $\mu = \text{konstant}$ durch Integration der Gleichung (1)

$$X_{t_{i+1}} = X_{t_i} \cdot e^{\mu(t_{i+1} - t_i)} \quad (2)$$

und Auflösung nach μ

$$\mu = \frac{\ln X_{i+1} - \ln X_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (3)$$

μ = relative Wachstumsrate (h^{-1})

X_{i+1} = Biomassekonzentration zur Zeit t_{i+1} (g BTM/l)

X_i = Biomassekonzentration zur Zeit t_i (g BTM/l)

t_i, t_{i+1} = Zeitpunkte der Messung (h)

2.8.3 Berechnung der Biomasseausbeute (Y x/s)

Der Ausbeute (Y x/s) ist der Quotient aus der gebildeten Biomasse durch das verbrauchte Substrat im Zeitintervall ($t_{i+1} - t_i$).

$$Y_{x/s} = \frac{X_{i+1} - X_i}{C_{s,i} - C_{s,i+1}} \quad (4)$$

X_{i+1}, X_i = Biomassekonzentration zum Zeitpunkt t_i und t_{i+1} (g BTM/l)

$C_{s,i}, C_{s,i+1}$ = Substratkonzentration zum Zeitpunkt t_i und t_{i+1} (g/l)

t_i, t_{i+1} = Zeitpunkte der Messung (h)

2.8.4 Berechnung der Produktausbeute (Y p/s)

Die Produktausbeute (Y p/s) ist der Quotient aus dem gebildeten Produkt durch das verbrauchte Substrat im Zeitintervall ($t_{i+1} - t_i$).

$$Y_{p/s} = \frac{P_{i+1} - P_i}{C_{s,i} - C_{s,i+1}} \quad (5)$$

P_{i+1}, P_i = Produktkonzentration zum Zeitpunkt t_i und t_{i+1} (g/l)

$C_{s,i}, C_{s,i+1}$ = Substratkonzentration zum Zeitpunkt t_i und t_{i+1} (g/l)

t_i, t_{i+1} = Zeitpunkte der Messung (h)

2.8.5 Berechnung der spezifische Substrataufnahmerate q_s

Die spezifische Substrataufnahmerate ist definiert als

$$q_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{dC_s}{dt} \quad (6)$$

und läßt sich durch die Differenzenformel

$$q_s = \frac{1}{\left[\frac{X_i + X_{i+1}}{2} \right]} \cdot \frac{C_{s,i} - C_{s,i+1}}{t_{i+1} - t_i} \quad (7)$$

annähern.

$$\begin{aligned} q_s &= \text{spezifische Substrataufnahmerate (g Substrat/g BTM/h)} \\ X_{i+1}, X_i &= \text{Biomassekonzentration zum Zeitpunkt } t_i \text{ und } t_{i+1} \text{ (g BTM/l)} \\ C_{s,i}, C_{s,i+1} &= \text{Substratkonzentration zum Zeitpunkt } t_i \text{ und } t_{i+1} \text{ (g/l)} \end{aligned}$$

In den Berechnungen wird Glukose als Hauptsubstrat gewählt.

2.8.6 Berechnung der spezifische Produktbildungsrate q_p

Die spezifische Produktbildungsrate ist definiert als

$$q_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dC_p}{dt} \quad (8)$$

und läßt sich durch die Differenzenformel

$$q_p = \frac{1}{\left[\frac{X_i + X_{i+1}}{2} \right]} \cdot \frac{C_{p,i+1} - C_{p,i}}{t_{i+1} - t_i} \quad (9)$$

annähern.

$$\begin{aligned} q_p &= \text{spezifische Produktbildungsrate (g Produkt/g BTM/h)} \\ X_{i+1}, X_i &= \text{Biomassekonzentration zum Zeitpunkt } t_i \text{ und } t_{i+1} \text{ (g BTM/l)} \\ C_{p,i}, C_{p,i+1} &= \text{Produktkonzentration zum Zeitpunkt } t_i \text{ und } t_{i+1} \text{ (g/l)} \end{aligned}$$

2.8.7 Bestimmung der Seewassersalinität

Die Wasserprobe wurde auf die Glasoberfläche des Salinitätmeters (Reichert-Jung, Cambridge Instruments Inc, USA) gegeben und die Brechung des Lichtes auf der Salinitäts-Skala abgelesen.

2.8.8 Bestimmung der Glukosekonzentration

Die Glukosebestimmung erfolgte durch eine enzymatische Methode mit dem Kit (Test-Kombination D-Glukose, Boehringer Mannheim). 0.1 ml Probelösung wurde mit 1.0 ml Lösung 1 und 1.9 ml bidest. Wasser gemischt. Nach 3 min wird die Extinktion der Mischung (E1) bei 340 nm gemessen. Die Reaktion startet durch Zugabe von Suspension 2. Nach der Mischung wird 10-15 min gewartet und die Extinktionen der Lösungen (E2) gemessen. Die Ermittlung der Glukosekonzentration erfolgt mit einer Standard-Kurve für Glukoselösungen.

2.8.9 Bestimmung der Konzentration der reduzierenden Zucker

2.8.9.1 Bestimmung der Konzentration der reduzierenden Zucker nach Miller (1959)

DNS Reagenz: Kaliumnatriumtetrat 182 g; 3,5-Dinitrosalicylsäure 6,3 g; 2N Natriumhydroxid 262 ml; Phenol 5 ml; Natriumnitrit 5 g; auf 1000ml mit dest. Wasser auffüllen.

1.5 ml Kulturüberstand wird 3 ml DNS Lösung hinzugefügt und 10 min in Wasser gekocht. Nach einer Zugabe von 15 ml bidestilliertem Wasser wird die Extinktion der Probe bei 545 nm gegen den Blindwert ermittelt. Dabei wird Glucose als Standardlösung für eine Kalibrierungskurve eingesetzt.

2.8.9.2 Bestimmung der Konzentration der reduzierenden Zucker nach Vukeli^① (1992)

Modifiziertes DNS Reagenz: 3,5-Dinitrosalicylsäure 10 g; Kaliumnatriumtetrat 300 g; NaOH 16 g; auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen. Die Lösung wird im Kühlschrank gelagert.

400 µl Zuckerproben werden mit 400 µl Reagenz vermischt. Die Probe wird 5 min in kochendem Wasser gehalten und dann sofort in kaltem Wasser abgekühlt. Die Messung der Extinktion wird bei 547 nm durchgeführt. Glucose wird als Standardlösung für eine Kalibrierkurve eingesetzt.

Vorteil des modifizierten Reagenz ist, dass kein Sondermüll entsteht.

2.8.10 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Der Kulturüberstand wird durch einen 0.2 µm Filter gefiltert. 200 µl Probe und 800 µl

Reagenz werden in einer Küvette gemischt und nach 10 min Wartezeit bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen. Die Kalibrierung erfolgt mit Rinder-Serum-Albumin als Standardprotein. Diese Methode umfaßt einen Meßbereich bis max. 100 µg Protein/ml.

Reagenz: Coomassie Blue G 250 100mg, Methanol 50 ml, H₃PO₄ 1000ml, auf 100 ml mit bidest. Wasser auffüllen.

2.8.11 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

Die Ammoniumbestimmung erfolgt durch Ammonium-Test Spectroquant[®] (Merck). 5 ml verdünnte Probe wird mit 0.6 ml NH₄-1B und 1 Microlöffel NH₄-2B gemischt. Nach 5 min werden 4 Tropfen NH₄-3B zugegeben. Nach 5 min Wartezeit wird die Probe bei 690 nm photometrisch gegen die Blindprobe gemessen.

Der Meßbereich liegt zwischen 0.03-3 mg/l.

2.8.12 Biologische Aktivität

Zur Untersuchungen der biologischen Aktivität der Kultur und Substanzen wurden die antimikrobiologische Aktivität und die cytotoxische Aktivität getestet.

2.8.12.1 Antimikrobiologische Wirkungstest

Zur Ermittlung der antimikrobiologischen Wirkung der Probe wird ein Agardiffusionstest durchgeführt. Auf die Agarplatten werden 1 ml Indikatorbakteriensuspension (1×10^8 Bakterien/ml) übergeimpft. 10 –15 µl Testprobe wird auf ein aufgelegtes steriles Tesplättchen (Cellulosefilter, Ø 6 mm) pipettiert. Die Agarplatten werden entsprechend der Wachstumsbedingungen der Indikatorbakterien kultiviert. Nach Beendigung der Kultivierung wird der Hemmhofdurchmesser ermittelt.

Die Tests mit den HKI Teststämmen wurden im HKI durchgeführt. Der Unterschied zwischen der eigenem Arbeit und dem HKI-Verfahren ist: Nach dem Animpfen von Indikatormikroorganismen wurden in der Mitte der Agarplatte Löcher von 9 mm Durchmesser für die Probe gesaugt. Die Probemenge ist 50 µl.

2.8.12.2 Cytotoxische Aktivitäten

2.8.12.2.1 Cytotoxisches Test mittels CHO-K1 Zellen

Die Cytotoxizität der Extrakte und reiner Substanzen wird mit Hilfe von CHO-K1 Zellen getestet. Bei vitalen Zellen wird das Tetrazoliumsalz durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen in einen wasserlöslichen Formazanfarbstoff umgesetzt. Die Menge an gebildetem Farbstoff wird spektralphotometrisch bestimmt und korreliert mit der Anzahl an vitalen Zellen. Die Messung wird mit einem ELISA-Reader bei 450 und 690 nm durchgeführt. Durch Bezug auf die unbehandelten Kontrollzellen werden die Proben in Rankingschritte eingeteilt: Ranking 0 \cong 100-80% der Kontrollgruppe; Ranking 1 \cong 80%-60% der Kontrollgruppe; Ranking 2 \cong 60%-20% der Kontrollgruppe; Ranking 3 \cong <20% der Kontrollgruppe.

Der Test wird in der BRAIN Aktiengesellschaft Biotechnology Research and Information Network (Arbeitsgruppe Dr. Krohn) durchgeführt.

2.8.12.2.2 Cytotoxischer Test mittels *Artemia salina*

Die Salinenkrebse-Eier (*Artemia salina*) werden in Seewasser zum Schlüpfen gebracht. Bei kräftiger, grobperliger Durchlüftung und einer Temperatur von 24 °C schlüpfen die Nauplien in 24 Stunden. Die Extrakte oder reinen Substanzen werden in ein 10 ml Becherglas geführt. Nach Verdampfung von Methanol wird 3 ml Seewasser zugegeben. 15 Krebse werden pro Becherglas eingesetzt. Nach 24 h und 48 h wird die Todesrate bestimmt (Hüners 1999).

2.8.13 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wird für das chemische Screening zur Beobachtung eines Fermentationsprozesses, zur Reinheitsprüfung und zur Identifizierung der Substanzen eingesetzt. Als stationäre Phase werden Fertigfolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm (Merck) verwendet. Die mobile Phase ist ein Gemisch aus Chloroform und Methanol im Verhältnis von 9:1 oder ein Gemisch aus Butanol: Eisessig: Wasser im Verhältnis von 4:1:5. Die Proben von 5-10 μ l werden auf das Dünnschichtchromatogramm gegeben. Nach der Entwicklung werden die Dünnschichtchromatogramme unter UV-Licht (254 nm und 366 nm) angesehen und anschließend mit folgenden Reagenzien besprüht.

a) isaldehyd: 0.2 ml Anisaldehyd wird in 20 ml Spüflösung (Methanol 85%, HAc 10%,

H₂SO₄ 5%)) gemischt. Nach dem Ansprühen wird auf 100°C bis zur maximalen Farbintensität der Flecken erwärmt. Das Farbspektrum ist von grün bis violett.

Ehrlich: 0.1g Ehrlich wird in 100 ml Spüflösung (Methanol 75ml, HCl 25 ml, 36-37%) gelöst. Nach dem Besprühen wird auf 100°C bis zur maximalen Farbintensität der Flecken erwärmt.

2.8.14 Strukturaufklärung

Die Reinigung und Strukturaufklärung der Sekundärmetabolite des Pilzes H 145 wurde im HKI von der Arbeitsgruppe Dr. Sattler mit Hilfe folgender Verfahren durchgeführt.

NMR-Spektroskopie; Massenspektroskopie; IR-Spektroskopie.

2.8.15 Produktbestimmung mittels HPLC

Die Konzentration der Produkte wurde mittels hochauflösender Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über den Vergleich der Peakflächen mit den Standards (Tab. 2.2). Die HPLC-Graphik der isolierten reinen Substanzen ist in Abb. 2.2 dargestellt.

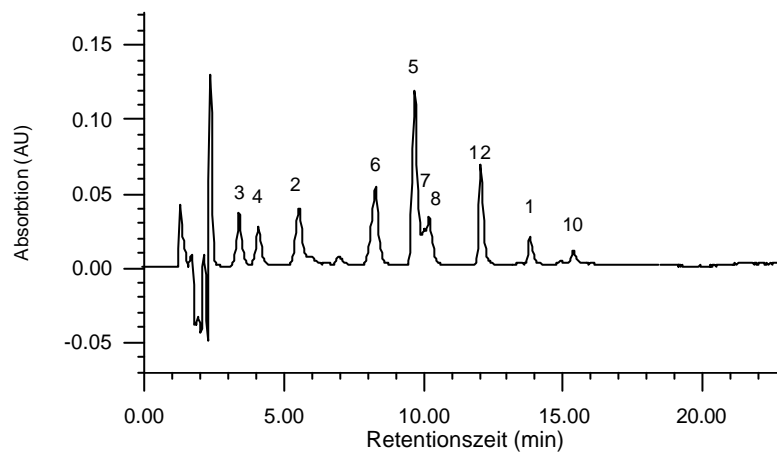


Abb. 2.2: Die HPLC-Graphik der isolierten reinen Substanzen (254 nm)

Tab.2.2: Die HPLC-Meßbedingung

Gerät:		
Membran Degasser:	Thermo Separation Products	
Gradientenpumpe:	Constametric 4100, LCD Analytical	
Autosampler:	Series AS 100, The Separation Products	
Detektors:	La Chrom L-7450, Interface D-7000, Merck-Hitachi	
Säule:	Vertex-Säule 250 x 3 mm, Nucleosil C18 5 µm	
Vorsäule:	Patronensäule 5 x 4 mm, Nucleosil 100 C18 5 µm	
Wellenlänge:	254 nm	
Injektionsvolumen:	20 µl	
Flußrate	0.8 ml/min	
Timetable		
	0.1% H ₃ PO ₄ (A);	100% Acetonitril (B)
Zeit (min)		
0	65 %	35 %
8	40 %	60 %
12	35 %	65 %
16	33.5 %	66.5 %
21	0	100 %
Stoptime	26 min	
Standard	1: 3-Methoxy-4-hydroxy-6-isopentenyl-4-(4'-methoxy-phenyl)-quinolinon 2: 3-Methoxy-4-hydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-quinolinon 3: 3S*, 4R* -Dihydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-quinolinon 4: 3R*, 4S* - Dihydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-quinolinon 5: 1,3,6-Trihydroxy-8-methylxanthon 6: 2,2',4,4',6-Pentahydroxy-6'-methylbenzophenon 7: Griseofulvin 8: 5',6'-Dehydro-griseofulvin 9: 2,4',6-Trihydroxy-2',4-dimethoxy-6'-methylbenzophenon 10: Compactin 12: H 68	

3 Ergebnisse aus der Zusammenarbeit im Verbundprojekt

3.1 Darstellung des Verbundprojektes

In Deutschland wurde Anfang der 90-er Jahre die Meeresbiotechnologie bekanntgemacht (Meiners, 1990) und als eine neue Fachrichtung in der Biotechnologie etabliert (Meiners, 1996). Dadurch sollte u. a. die Chance erhöht werden, neue Naturstoffe aus marinen Organismen, z. B. von marinen Pilzen, zu finden.

Die Meeresbiotechnologie ist zur Zeit ein weltweit interessierendes Forschungsthema. Die Initiierung des Verbundprojektes, in dessen Rahmen diese Arbeit angefertigt wurde, erfolgte bereits 1996 während einer Fachtagung „Chancen für eine wirtschaftliche Nutzung der Meeresbiotechnologie in Norddeutschland“ (Meiners, 1996; Grabley, 1996; Schaumann, 1996). Damals kamen zum ersten Mal in Deutschland Biotechnologen, Naturstoffchemiker und Meeresforscher zusammen, um ein Konzept für einen Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie zu entwickeln (Meiners, 1997 a, 1997 b). Zur Zeit gibt es zwei große Förderprogramme zu diesem Thema in Deutschland: 1. „Forschungsschwerpunkt Meeresbiotechnologie“, seit 1998, Ministerium für Wissenschaft und Kultur: Niedersachsen-Vorab der Volkswagenstiftung; 2. „Marine Naturstoffforschung“, seit 1998, im Bundesministerium für Forschung und Bildung (BMBF) Forschungsprogramm.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Verbundprojektes „Wirkstoffe aus marinen Pilzen“ (BMBF-Programm) durchgeführt. Das Verbundprojekt ist 1998/1999 begonnen worden. Bis jetzt wurden **20 neue Naturstoffe** aus marinen Pilzen gewonnen; dies entspricht etwa **8%** der bisher aus marinen Pilzen beschriebenen neuen Naturstoffe. Das Arbeitsschema des Verbundprojektes ist in Abb. 3.1 dargestellt. Die marinen Pilze wurden hauptsächlich vom AWI und teilweise von der FHO isoliert und in Volumen von 250 ml kultiviert. Die Kulturextrakte wurden im HKI und bei BRAIN nach dem chemischen und biologischen Screening bewertet. Die FHO untersuchte verschiedene Kultivierungsverfahren für die positiv bewerteten Stämme im 10-50 l-Maßstab. Nach der Aufarbeitung des Kulturüberstandes und der Biomasse wurden die Proben an das HKI übergeben. Dort wurden die Reinsubstanzen isoliert und anschließend ihre Struktur aufgeklärt. Die biologische Aktivität der Reinsubstanzen wurde dann weiter getestet und bewertet.

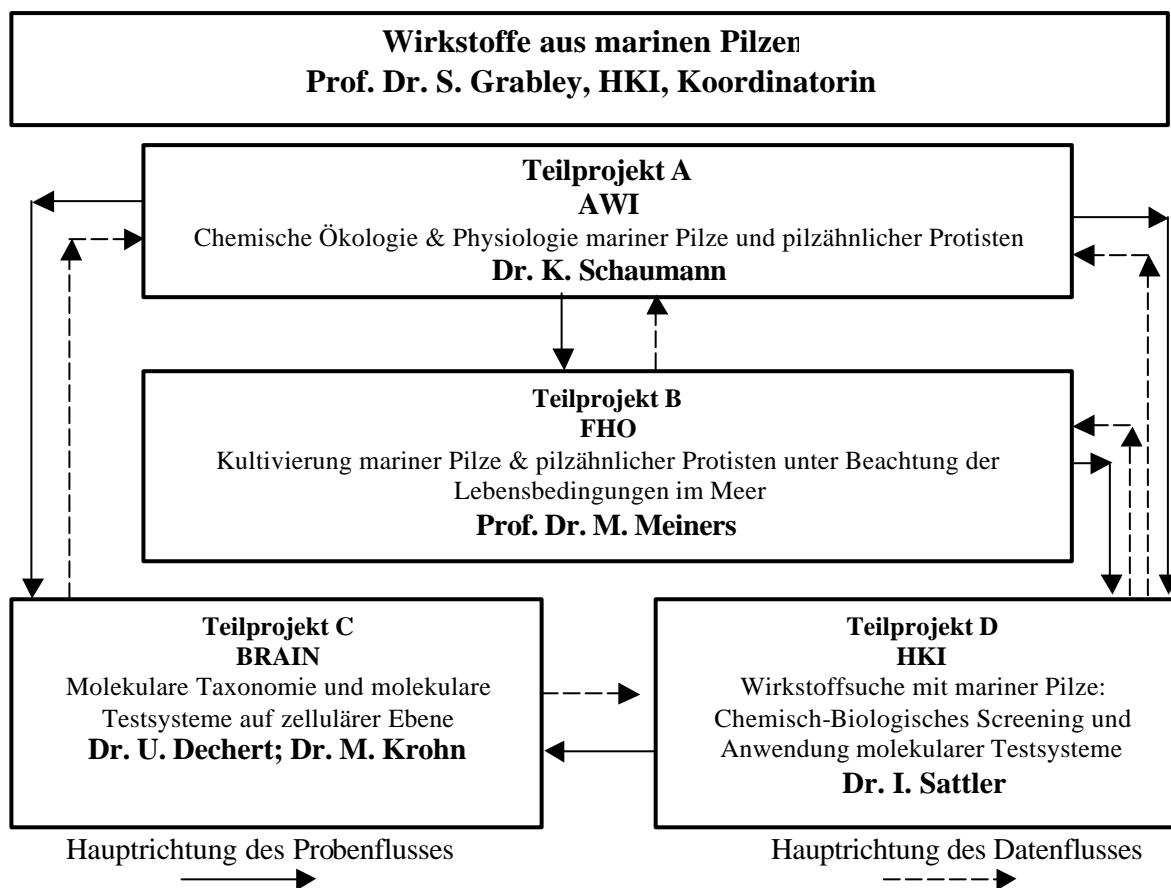


Abb. 3.1: Das Arbeitsschema des Verbundprojektes

3.2 Marine Pilze

Im Rahmen dieser Arbeit standen 662 Isolate für Untersuchungen zur Verfügung, deren Verteilung in obligat marine, fakultativ marine, marine Isolate und nicht identifizierte Isolate in Tabelle 3.1 aufgeführt ist.

Tab. 3.1: Verteilung der verwendeten marinen Pilze

	Obligat marine Pilze	Fakultativ marine Pilze	Marine Isolate	Nicht identifizierte marine Isolate	Gesamtzahl
AWI	48	26	32	410	516
FHO	2	-	56	88	146

3.3 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der antimikrobiellen Aktivität der Isolate und dem Habitat der marinen Pilzen

Um den Zusammenhang zwischen dem Potential der Antibiotikabildung und den Habitaten festzustellen, wurden 146 eigene Isolate von verschiedenen Fundorten im Küstenbereich untersucht. 25 Isolate zeigten eine antimikrobiologische Wirkung (gegen eine oder mehrere von folgende Indikatorbakterien: *Bacillus subtilis* (ATCC 23350); *E. coli* (ATCC 23716); *Micrococcus luteus* (ATCC 4698); *Candida boidinii* (ATCC 18810); *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Abb.3.2 zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden bioaktiver Naturstoffe höher ist, die marinen Pilze von engen Biogemeinschaften zu isolieren als aus der Wassersäule.

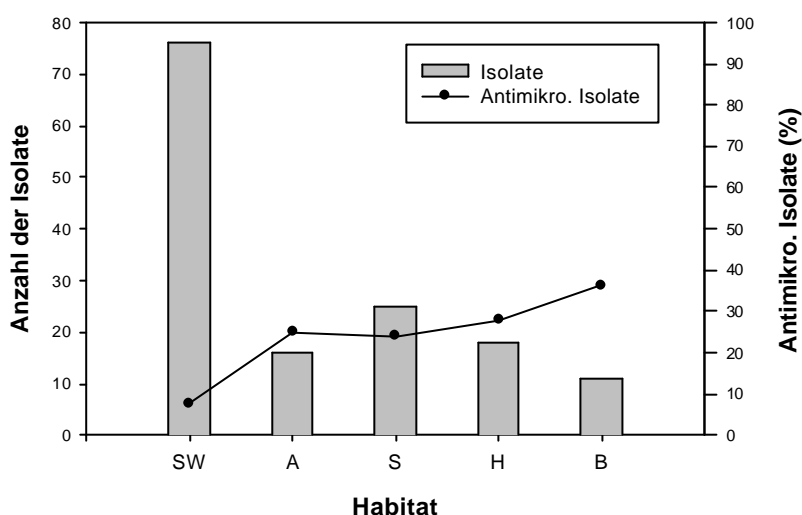


Abb 3.2: Darstellung des Zusammenhangs zwischen antimikrobieller Aktivität und Habitat der Isolate
SW = Wassersäule; A = Algen; S = Sediment; H = Holz; B = Balanus

3.4 Chemisches und Biologisches Screening

Zur Suche nach neuen bioaktiven Naturstoffen aus marinen Pilzen wurden chemische und biologische Screeningverfahren (Grabley et al., 1991; Grabley et al., 1996; Grabley & Thiericke 1999 b, Grabley et al., 2000) zur Bewertung und Auswahl von Stämmen eingesetzt.

Das chemische Screening wurde auf der Basis der Dünnschicht-Chromatographie am HKI durchgeführt. Die Probenaufarbeitung erfolgte aus dem lyophilisierten Zellmaterial mittels Methanol-Extraktion und aus dem Filtrat nach einer Festphasenextraktion am Adsorberharz Amberchrom CG 161 mit Methanolelution. Die DC-Analyse wurde nach etablierten

Verfahren auf Kieselgel-Platten mit Entwicklung in Chloroform/Methanol = 9:1 und Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:5 (Obere Phase) durchgeführt. Die Chromatogramme wurden nach Eigenfarbe der Substanzen, UV-Löschung (254 nm und 366 nm) und Anfärbung mit Sprühreagenzien (Anisaldehyd/H₂SO₄, Ehrlich's Reagenz und Orcin) ausgewertet.

Die Verteilung der Bewertungsergebnisse zeigt Tabelle 3.2. Über 72 % der Stämme sind mit 0, 1 oder 2 bewertet worden. Weniger als 6.5 % der gesamten Pilzstämme wurden mit 4 bewertet. Durch die chemische Bewertung wurde die Anzahl der Kandidaten schnell eingegrenzt. Die Auswahl der zu bearbeitenden Isolate erfolgt nach folgenden Kriterien: Isolate mit der Bewertung 0 bis 2 wurden zunächst nicht bearbeitet, bei Isolaten mit der Bewertung >2 wurden zusätzlich die Ergebnisse der cytotoxischen Wirkung sowie Ergebnisse zur molekularen Taxonomie, die bei Brain untersucht wurden, herangezogen.

Tab. 3.2: Ergebnis des chemischen Screenings und biologischen Screenings

Bewertung	0	1	2	3	4
Chemisches Screening ^a Stämme Anzahl (535)	28	82	273	117	35
Cytotoxische Wirkung ^b Stämme Anzahl (486)	162	68	72	184	

a: Die Bewertung der detektierten Produktmuster erfolgte durch Einordnung in 5 Kategorien: 0 = sehr schwache Produktbanden; 1 = schwache Produktbanden; 2 = das Produktmuster ist ähnlich wie bei anderen Stämmen; 3 = Produktmuster mit 1-3 Hauptbanden; 4 = komplexes Produktmuster.

b: Cytotoxische Wirkung: 0 = 100-80 % Kontrolle; 1 = 80-60 % Kontrolle; 2 = 60-20 % Kontrolle; 3 = < 20% Kontrolle (Siehe 2.8.12.2.1).

Beim biologischen Screening wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich die Cytotoxizität der Extrakte berücksichtigt. Die Testung der cytotoxischen Wirkung wurde von BRAIN an CHO-K1 Zellen vorgenommen, dabei wurden von 486 Isolaten 38 % der Isolate mit 3, dem höchsten Wert, bewertet. Dieser Wert läßt vermuten, dass die Chance relativ groß ist, aus den hier untersuchten marinen Pilzen Substanzen mit einer cytotoxischen Wirkung zu finden.

3.5 Kultivierung und Produktgewinnung

Beim Beginn der Suche neuer Naturstoffe müssen die ersten Kultivierungen unter nicht

optimierten Bedingungen durchgeführt werden. Daher muß mit allgemeinen Bedingungen begonnen werden, die für marine Pilze geeignet sind und allgemein anerkannte Bedingungen der Sekundärmetabolitsynthese beachten werden, wie z. B. eine geringe Wachstumsrate oder eine Wachstumslimitierung.

Aufgrund unserer Beobachtungen wurde später bei der Kultivierung folgendes beachtet:

1. Als Vorversuche wurden mehrere eigene Isolate wie *Aspergillus* sp. TM 118, *Asteromyces cruciatus* TM 76 verwendet. Das Isolat TM 118 wurde mit einem selbst entwickeltem AB Medium als Standkultur in insgesamt 9 l Volumn und das Isolat TM 76 wurde mit pg Medium im 10-l-Bioreaktor kultiviert. Die im HKI abgeleiteten Isolierungsergebnisse zeigten, dass für die Breitstellung relevanter Mengen von Inhaltsstoffen aus marinen Pilzen ein Kulturvolumen von 40-50 l verfügbar sein sollte.
2. In der Bioreaktorkultur ist eine Pelletbildung für die Naturstoffsynthese nicht unbedingt ungünstig. Z. B. wurde der Pilz *Asteromyces cruciatus* TM 76 in einem 10 l Bioreaktor kultiviert und die Pelletbidung durch die Zugabe von Carboxymethylcellulose kontrolliert. Eine Verhinderung der Pelletbildung erhöhte das Wachstum und die Fettsäurebildung, hemmte aber die Bildung der interessanten Produkte.
3. Das Wachstum der marinen Pilze sollte in der Produktionsphase relativ klein sein. Bei schnell wachsenden Pilzen konnte durch Erniedrigung der Temperatur die Naturstoffbildung verbessert werden. Z. B. konnte bei der Kultivierung von *Verticillium lecanii* KMPB H 889 bei 25°C durch die Variation der Belüftung und Rührung keine positive Wirkung auf die Produktivität erhalten werden, dagegen war in einer Fermentation bei 15 °C eine deutliche Verbesserung zu beobachten (siehe Abb. 5.3).
4. Die Standkultur ist einfacher durchzuführen, aber nicht unbedingt eine optimierbare Kultivierungsmethode. Die oft beobachtete bessere Naturstoffbildung der marinen Pilze in der Standkultur hängt offenbar mit der langsameren Wachstumsrate zusammen.
5. Die Feststoffsubstratfermentation zeigte sich als eine gute Methode bei der Kultivierung der marinen Pilze zur Naturstoffsuche. Z. B. konnte der Pilz *Asteromyces cruciatus* TM 76 in einem 2 l Feststoffsubstratbioreaktor mehr antimikrobielle Substanzen bilden als in der Flüssigkultur. Auch bei der späteren Optimierung des Pilzes *Penicillium janczewskii* KMPB HTW5/869 war die Produktivität in der Festsubstratfermentation (SSF) für fast alle Sekundärmetabolite gut (siehe 4.8).

Nach der chemischen Bewertung (3 oder 4) und cytotoxischen Bewertung (3) wurden 28 Stämme ausgewählt und davon bisher 25 in Volumen von 10-50 l kultiviert (Tab 3.3). Bis

Dezember 2001 lagen von 21 Isolaten die Ergebnisse vor. Die Kultivierungen wurden als Standkultur oder im Bioreaktor durchgeführt. Anschließend wurden die Biomassen und der Kulturüberstand durch ein Filter getrennt. Die Aufarbeitung des Kulturüberstandes erfolgt durch Festphasen-Extraktions-Verfahren (siehe 2.7); dadurch werden die meisten Zucker und Proteine beseitigt. Die Eluate und die Biomasse wurden bei -80°C gefroren und gefriertrocknet an den Projektpartner übergeben. Dort wurden die Naturstoffe chromatographisch gereinigt und die Strukturaufklärung durchgeführt.

Tab 3.3: Kultivierung der ausgewählten Stämmen und neue gefundene Substanzen

Nr.	Stamm	Fundort und Material	Kultivierung	BTM (g)	Rückstand (g)	Neue Substanz
1	<i>Aspergillus</i> sp. TM 118	Wilhelmshaven Muschelbank	Standkultur; 9 x 0.9l 25°C; 31d, AB+ Medium	5.2	0.81	-
2	<i>Aspergillus</i> sp. KMPB d 7,3,6	Framstrasse Wasser, 5m	Standkultur; 36 x 0.7l; 25°C; 24d, B1 Medium	77.2	24.31	-
3	<i>Aspergillus</i> sp. KMPB d 32,2,3	Framstrasse Wasser, 5m	Standkultur; 36 x 0.7l; 25°C; 17d; B1 Medium	120.0	3.20	-
4	<i>Aspergillus</i> sp. KMPB d 28,2,3	Framstrasse Eis	Standkultur; 36 x 0.7l; 25°C; 53d; B1 Medium	82.2	4.75	-
5	<i>Aspergillus</i> sp. KMPB H TW6/245	- -	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 33d; pg Medium	310.0	7.29	-
6	<i>Aspergillus</i> sp. KMPB d 3,2,2	Norwegische See, Wasser	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 28d; pg Medium	214.0	8.70	7
7	<i>Aspergillus</i> sp. KMPB d 32,4,2	Boreas-Becken, Westrand, Eis	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 28d; pg Medium	168.9	3.67	2
8	<i>Aspergillus</i> sp. KMPB d 27,2,9	Framstrasse Eis	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 30d; pg Medium	119.6	17.67	6
9	<i>Asteromyces cruciatus</i> TM 76	Helgoland Wasser	Bioreaktor; 2 x 10l; 25°C; 100h; B1 Medium	195.0	2.08	-
10	<i>Cephalosporium</i> sp. KMPB d3,1,4	Norwegische See, Wasser	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 47d; pg Medium	255.0	4.43	1
11	<i>Dendryphiella arenaria</i> KMPB H14678	- -	Bioreaktor; 5 x 10l; 25 und 20°C; 80, 84, 100, 100, 146h; pg Medium	366.9	4.37	1
12	<i>Dendryphiella arenaria</i> TM 94	Kopenhagen Sediment	Standkultur; 10 x 1l; 25°C; 19d; pg Medium	6.9	2.23	-
13	Indet. Pilz TM 60	Jadebusen, WHV, Holz	Standkultur; 19 x 0.9l; 25°C; 30d; AB+ Medium	14.4	1.39	-
14	Indet. Pilz TM 124	Wilhelmshaven Muschelbank	Standkultur; 10 x 0.9l; 25°C; 36d; AB+ Medium	35.2	0.58	-
15	Indet. Pilz KMPB d20,2,8	Framstrasse Eis	Standkultur; 40 x 1 l; 25°C; 29d; B1 Medium	90.7	11.56	?
16	Indet. Pilz KMPB d 2,1,1	Norwegische See, Sediment	Standkultur; 40 x 1 l; 25°C; 29d; B1 Medium			-

17	Indet. Pilz KMPB d 24,11,3	Framstrasse Eis	Standkultur; 40 x 1 l; 25°C; 29d; B1 Medium	200	4.64	?
18	<i>Oidiodendron tenussimum</i> KMPB H-TW5/575	- -	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 30d; pg Medium	91.4	13.24	-
19	cf. <i>Papulaspora halima</i> KMPB H 14658	Bremerhaven Holz	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 42d, pg Medium	42.5	10.23	?
20	<i>Penicillium janczewskii</i> KMPB H-TW5/869	Helgoland Wasser	Standkultur; 50 x 1l; 25°C; 20d; pg Medium	312.0	13.92	3-1
21	<i>Penicillium</i> sp. KMPB H-TW7/622	- -	Standkultur; 40 x 1l; 25°C; 20d; pg Medium	212.0	5.2	-
22	<i>Remispora maritima</i> KMPB H 458	x = Pr. 211 Holz	Standkultur; 60 x 1l; 25°C, 15°C; pg Medium	158.8	2.59	-
23	<i>Trichoderma</i> sp. KMPB H-TW6/196	-	Standkultur; 42 x 0.7l; 25°C; B1 Medium	170.4	14.98	1
24	<i>Verticillium lecanii</i> KMPB H 889	Helgoland Ammophila	1. Standkultur; 15 x 0.7l; 25°C; 25d; pg Medium 2. Bioreaktor; 6 x 10l; 25°C; 168-312h	75.9 445.7	3.03 6.25	1, Wie 11
25	<i>Verticillium luteoalbum</i> KMPB d 29,1,8	Arktis Wasser	Standkultur; 36 x 1l; 25°C; 36d; B1 Medium	51.2	7.37	?

? = Arbeit sind noch nicht abgeschlossen.

Aus den Kulturen wurden 80 Substanzen isoliert, darunter waren 21 neue Naturstoffe, von denen jedoch eine Substanz zwischenzeitlich publiziert worden ist. Die **20** neuen Substanzen wurden von acht Stämmen produziert. Die Isolate *Aspergillus* sp. KMPB d 3,2,2 und *Cephalosporium* sp. KMPB d3,1,4 wurden aus der Norwegischen See isoliert. Die Pilze *Aspergillus* sp. KMPB d 27,2,9 und *Aspergillus* sp. KMPB d 32,4,2d wurden aus Eis aus der Framstrasse und vom Westrand des Boreas-Beckens isoliert. Aus diesen vier frischen Isolaten aus kalten Gewässern wurden 16 neue Substanzen erhalten. Es scheint, dass die kalten Gewässer ein gutes Habitat für das Auffinden von Produzenten neuer Naturstoffe ist. Im Gegensatz dazu wurden lediglich 4 neue Substanzen von den konservierten Stämmen aus der Kulturensammlung erhalten.

3.6 Stammauswahl für die weitere Durchführung dieser Arbeit

Aus den Pilzisolaten wurde nach dem chemischen und biologischen Screening, einer ersten

50 l Kultivierung und Strukturaufklärung ein Isolat ausgewählt, das im Weiteren mikrobiologisch und biotechnologisch bearbeitet wurde.

3.6.1 Bewertung der Aktivität des Isolates H-TW5/869

Das Isolat H-TW5/869 zeigte eine sehr hohe chemische Bewertung (4) und eine gute cytotoxische-Wirkung mittels CHO-K1-Zellen und antifungische Wirkung gegen *Sporobolomyces salmonicolor*, und geringe Wirkungen gegen *Candida boidinii* ATCC 18810, *E.coli* ATCC 23716 und *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (FHO Stämme) (Tab. 3.4). Außerdem wurde eine Wirkung im EGFR-Assay (Epidermal Growth Factor Receptor) (BRAIN) festgestellt.

Tab. 3.4: Bewertung des Isolates H-TW5/869

Bewertung		0	1	2	3	4
Chemische Bewertung						X
Biologische Bewertung	Cytotoxische Wirkung					X
	Antimikrobiologische Wirkung	<i>E. coli</i> ATCC 23716	X			
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	X			
		<i>Candida boidinii</i> ATCC 18810		X		
		<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>				X

3.6.2 Strukturaufklärung der Naturstoffe des Isolates H-TW5/869

Die Isolierung der Metabolite erfolgte aus 50 l (50 x 1l/ Fernbachkolben) Standkulturen. Die Abtrennung Biomasse/Flüssigkeit wurde durch Filtration (100 Mesh) vorgenommen. Der Überstand wurde an Amberchrom CG161c adsorbiert. Die Säule wurde mit 5 l bidestilliertem Wasser gewaschen und mit 1 l MeOH eluiert. Nach „Einengen“ und Lyophilisieren wurde ein brauner Rückstand von 14 g erhalten, der zur weiteren Aufarbeitung und Strukturaufklärung dem HKI übergeben wurde.

Aus dem Stamm H-TW5/869 konnten am HKI elf Naturstoffe isoliert werden. Dazu wurden aus dem im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Rohprodukt durch eine Flash-Chromatographie auf RP-18 (MeOH/H₂O Gradient) vier Fraktionen erhalten. Jede Fraktion wurde mit Sephadex LH-20 (3x80 cm, CHCl₃/MeOH = 6:4) gereinigt und mit einer weiteren

Flash Chromatographie auf Silica Gel 60 (CHCl₃/MeOH = 4:1) fraktioniert. Diese Auftrennung ergab elf reine Metabolite. Zehn Molekülstrukturen sind in Abb. 3.3 dargestellt. Die Substanz **3** ist eine isomere Verbindung der Substanz **4**. Die beiden Substanzen sind bisher nicht beschrieben. Die Substanz **1** war aus der Literatur nicht bekannt, wurde aber im Laufe dieser Arbeit von Kusano et al. (2000) veröffentlicht. Der R_f-Wert, der R_t-Wert und die Menge der isolierten Substanzen sind in Tab.3.5 dargestellt.

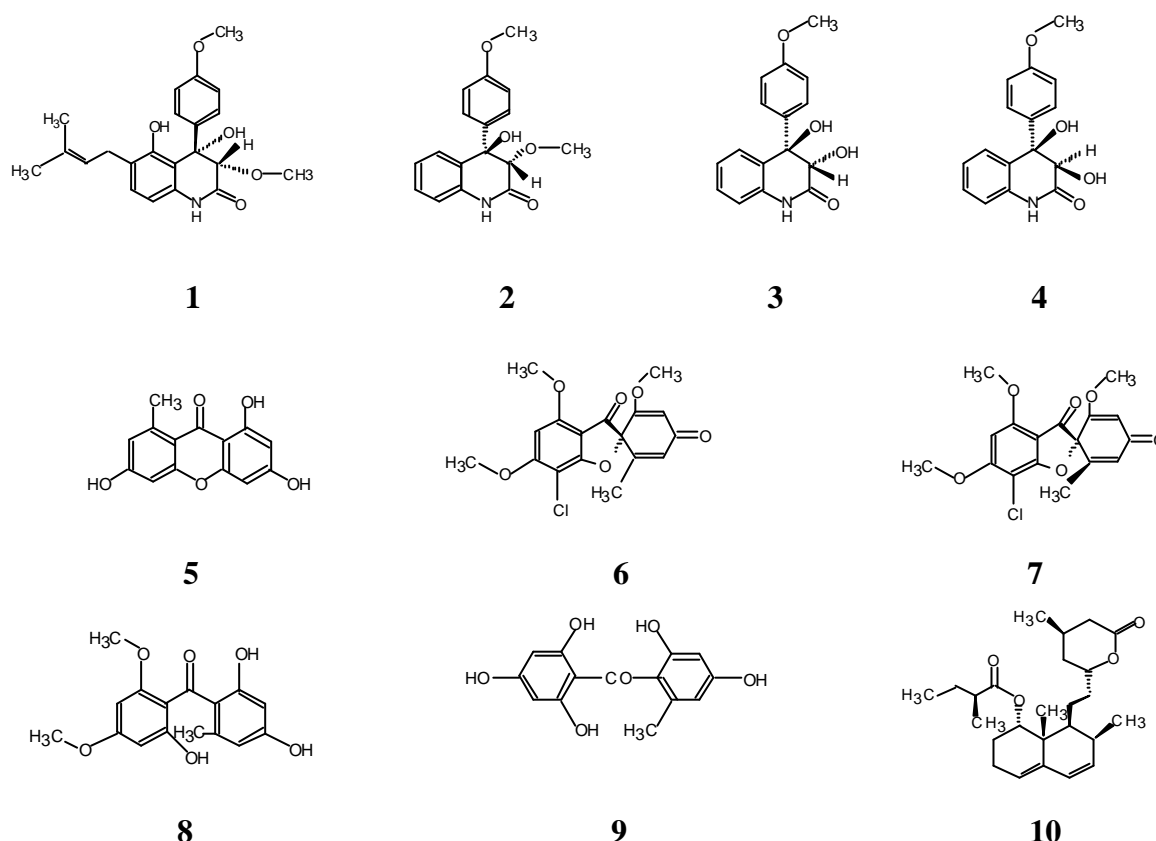


Abb. 3.3: Molekülstrukturen von 10 isolierten Substanzen aus dem Stamm H-TW5/869

Tab. 3.5: R_f /R_t-Werte und die Mengen der Isolierten Substanzen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
R _f -Wert	0.86	0.66	-	-	0.49	0.64	0.81	0.84	0.25	0.50	-
R _t (min)			3.44	4.13							
Menge (mg)	15	20	2	3	15	26	30	6	9	25	250

R_f-Wert-Test: Chloroform/MeOH = 9:1; Chloroform/MeOH 3:1 zur Entwicklung von **9**.

DC (Kieselgel). R_t: Retentionszeit im HPLC-Lauf, HPLC Bedingungen siehe 2.8.15.

Bei den Substanzen **1-4** handelt es sich um Alkaloide, die das besondere Interesse der Verbundpartner weckten. Daher wurden vertiefte Untersuchungen an diesem Isolat durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung des Isolates H – TW5/869

Der Pilz H –TW5/869 wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Schaumann aus dem Gewässer bei Helgoland (54°22'0" N, 8°16'0" E) isoliert und in der AWI Stammsammlung KMPB konserviert.

4.1.1 Morphologische Charakterisierung

Zur Pilzidentifizierung wurde eine morphologische Charakterisierung durchgeführt. Dies erfolgte auf mikroskopischem und makroskopischem Wege.

Dazu wurde das Isolat H-TW5/869 sieben Tage bei 25°C auf CYA Nährboden kultiviert und die Fortpflanzungsorgane, die Konidiophoren und Konidien mikroskopisch aufgenommen. Mycel- und Konidiosporendurchmesser wurden mittels Programm analySIS (Soft Imaging System GmbH) vermessen (Abb.4.1).

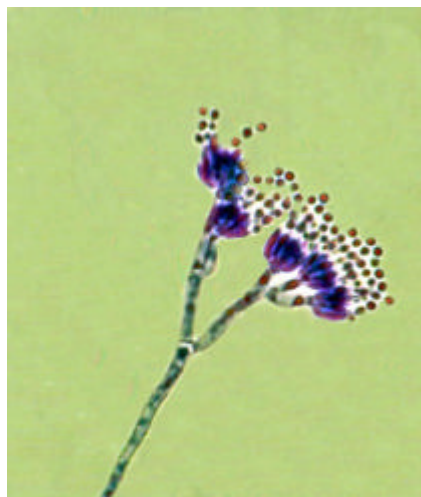


Abb. 4.1: Mikroskopische Aufnahme von Konidiophoren des Isolates H-TW5/869 (x1000)
Färbung: Nilblau (0,05 % Hydrogensulfat)

4.1.2 Identifizierung nach John I. Pitt

Nach der Methode von John I. Pitt wurde das Isolat HTW5/869 bei 5 °C, 25 °C und 37 °C zur Identifizierung auf CYA, MEA und G25N Medien kultiviert. Nach einer Kultivierung von 7 Tagen wurden die Tab. 4.1 aufgelisteten Merkmale erfasst.

Tab. 4.1: PENNAME Datei Tabelle

PENNAME DATA ENTRY			
Diam CYA	34 mm	Diam MEA	31 mm
Diam G25N	18 mm	Germination or growth at 5 (Y/N)	Y
Growth at 37 (Y/N)	Y	If Yes, enter diam 37	10 mm
Conidial colour on CYA	GR	Conidial colour, enter first two letters of	White
BLue GReen BRown OLive GREy		Mycelial colour	WH
Exudate colour	LI	Soluble pigment	N
Reverse colour	PA	Extra colours for these	CLear PAle
Yellow Orange SALmon PInk REd MARoon Purple		Are cleistothecia, sclerotia or gymnothecia present? Y/N	N
Penicillus - enter first letter: Monovert; Irreg. bivert; Bivert, reg.; Tervert; Uncertain	I	Stipe width	1,9 µm
Stipe texture (R/S)	S	Metula length	12 µm
Phialide length	6 µm	Conidia: length	1,9 µm
Width	1,9 µm	Texture (R/S)	R
What is the normal maximum stipe length?		If more the 60 mm enter 100	100
Are metulae apices sometimes enlarged.		i. e. more than 4 mm diam? (Y/N)	N
Are metulae sometimes of unequal length? (Y/N)			N

Das Ergebnis der Identifizierung ist in der Tab 4.2 dargestellt.

Tab.4.2: Ergebnisse der Identifizierung mit dem Programm Penname

Species	Count*
<i>P. janczewskii</i>	0
<i>P. janthinellum</i>	2
<i>P. waksmanii</i>	2
<i>P. melinii</i>	4
<i>E. lapidosum</i>	5
<i>P. canescens</i>	5
<i>P. simplicissimum</i>	5
<i>P. fellutanum</i>	6

* Count = Anzahl der abweichenden Merkmale

Mit dem Identifizierungsprogramm „**Penname**“ wurde das Isolat H-TW5/869 als *Penicillium janczewskii* identifiziert.

4.2 Substratverwertung des Isolates H-TW5/869

Der Pilz H-TW5/869 wurde auf Agarplatten mit verschiedenen Kohlenstoffsubstraten als einziger C-Quelle kultiviert und mit einem terrestrischen *Penicillium janczewskii* (DSM 847) verglichen. Der Durchmesser der Kolonien wurde gemessen und in Abb.4.2 dargestellt. Die Sporenbildung und die Pigmentbildung wurden beobachtet und in Tabelle 4.3 beschrieben.

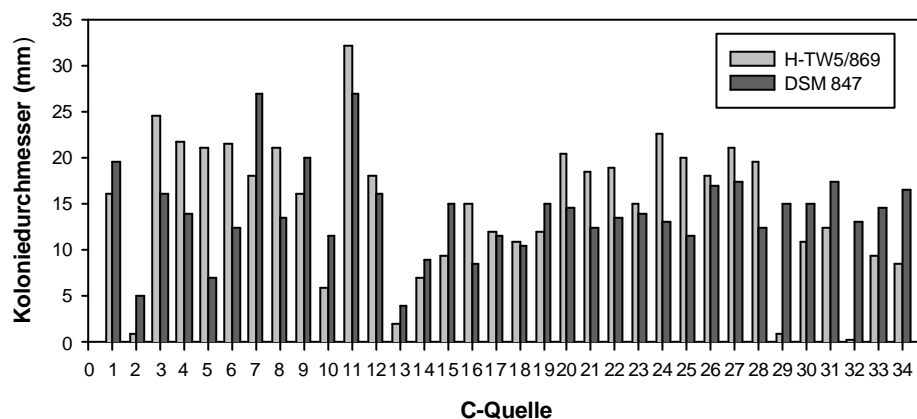


Abb. 4.2: Vergleich des Wachstumes zwischen H-TW5/869 und DSM 847 auf verschiedenen C -Quellen

Das Medium wurde mit künstlichem Seewasser (ohne Zitronensäure) hergestellt. C –Quelle Konzentration war 5g/l. Die Pilze wurden 130 h bei 25°C auf Agarplatten kultiviert. Die C-Quellen sind in der Tab. 4.3 aufgeführt.

Tab. 4.3: Vergleich des makroskopischen Wachstums von H-TW5/869 und DSM 847 auf verschiedenen C-Quellen

C-Quelle	H-TW5/869	DSM 847
Carboxymethylcellulose Natriumsalz	durchscheinend weiß u. grün wenig Mycel	außen weiß durchscheinend; innen grün
Cellulose mikrokristallin	durchscheinend weiß	wenig Mycel; durchscheinend weiß
Stärke	außen grau/weiß/grün; Mitte grün; stumpf	weiß u. glänzend
Cellobiose	außen weiß; Innen dunkelgrün	Außenrand dick weiß; Innen Punkt grün, Oberfläche glänzend
5. Saccharose	Außenrand weiß; innen dunkelgrün	Außenrand grau/weiß; innen weiß
D(+)-Glucose H ₂ O	Außenrand weiß; innen dunkelgrün	außen weiß/grau glänzend; innen weiß
Xylan	Außenrand grau/weiß; Innenkreis grün	Außenkranz grau; Mitte grün
8. Xylose	Außenrand weiß; Innen dunkelgrün	weiß; glänzend
9. Fucoidan	durchscheinend weiß, Mitte wenig grün	durchscheinend weiß
10. Fucose	außen weiß; innen grün	Außenrand durchscheinend weiß; mittlerer Ring weiß; Innenkranz grün
Carrageenan	außen grau u. grün; innen dunkelgrün	außen durchscheinend grau, innen türkis u. weiß
Na- Alginat	außen durchsichtig weiß mit grünen Stippen; innen grün	durchscheinend weiß
13. Chitin	durchscheinend; dunkelgrün wenig Sporen	durchscheinend; weiß wenig Sporen
Chitosan	durchscheinend grau; wenig gewachsen	durchscheinend grau; wenig Mycel
15. N-Acetyl-D-Glucosamine	kleiner weißer Außenrand; innen dunkelgrün	Außenrand weiß; Mitte hellbeige
16. Trehalose	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	weiß
17. D-Mannitol	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	weiß
18. Glycerin	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	außen weiß glänzend; innen türkies
Inulin	Außenrand weiß/grau glänzende; mittlerer Kranz weiß	Außen weiß filamentös Mitte türkies
20. Maltose	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	Weiß
D(-) Sorbit	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	außen glänzend weiß; innen weiß
L(+) Arabinose	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	Außenrand weiß durscheinend; Mitte türkies
L(-) Rhamnose H ₂ O	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	Außenrand weiß durscheinend; Mitte türkies

D(+) Mannose	Außenrand weiß; Mitte dunkelgrün	Weiß
D(-) Fructose	durchscheinend weiß u. grün	außen weiß glänzend; innen türkies
Lactose	außen grau u. weiß; innen grün	außen weiß glänzend; innen weiß
D(-) Galaktose	Außenkranz weiß; innen grün	außen weiß/beige glänzend; Mitte weiß
D(-) Ribose	dunkelgrün	außen durchscheinend weiß/beige; innen türkies
Na – Formiat	durchscheinend weiß	durchscheinend weiß
Na- Acetat	Außenkranz durchsichtig grau/weiß; innen weiß	Außenkranz weiß u. stumpf;
Na- Pyruvat	außen grau/weiß; grün	außen grau/weiß; innen grün
Na – Propionat	nicht gewachsen	außen grau/weiß glänzend; Mitte weiß
di – Na – Succinat	Außenrand weiß/grau; mittlerer Ring weiß; innen	grau/grün stumpf
Na – Lactat	außen durchscheinend weiß; innen grün	Innen weiß mit grün; außen weiß

Die Substratverwertung des marinen Isolates H-TW5/869 und des terrestrischen Isolates DSM 847 sind unterschiedlich, zeigen aber ähnliche Tendenzen. Der terrestrische Stamm kann besser die Polysaccharide, z. B. Cellulose (1,2), Xylan (7) und das Oligosaccharid Inulin (19) verwenden als das marine Isolat. Dagegen wächst das marine Isolat besser auf den Algen-Polysacchariden Carrageenan (11) und Alginat (12). Obwohl der Koloniedurchmesser bei dem Stamm DSM 847 auf Nährböden mit Fucoidan (9), Fucose (10), Chitin (13), Chitosan (14) und N-Acetyl-D-Glucosamine (15) als einziger C-Quelle größer als bei H-TW5/869 ist, zeigt H-TW5/869 hier mehr Sporenbildung und eine relativ dicke Mycelbildung. Die beste C-Quelle für H-TW5/869 ist Carrageenan, ein Polysaccharid aus Braunalgen. Bei diesem Versuch konnte H-TW5/869 besser Stärke (3) und leicht abbaubare Zucker (4-6, 8, 20-28) sowie Polyole (16-18) verwerten als DSM 847. Dies kann aber auch am Nährboden mit künstlichem Seewasser liegen. Dagegen kann DSM 847 im Vergleich zu H-TW5/869 besser Formiat (29), Acetat (30), Pyruvat (31), Succinat (33) und Lactat (34) verwerten. Ein wesentlicher Unterschied der Substratverwertung ist, dass H-TW5/869 auf Propionat (32) als einziger C-Quelle nicht und auf Formiat schlecht wachsen kann.

4.3 Untersuchung des *Phoma*-Pattern der Isolate TM 76, H-TW5/869 und DSM 847

Ritchie (1957) zeigte, dass für einige marine Arten, wie *Phoma* sp. und *Pestalotia* sp. mit steigender Temperatur eine steigende Salinitätstoleranz beobachtet werden kann. Trägt man für die maximalen Koloniedurchmesser die Salzkonzentration gegen die Temperatur bei der Kultivierung auf, so wird ein eindeutiger Zusammenhang beobachtet. Dieses Phänomen wird als *Phoma*-Pattern bezeichnet und ist bei verschiedenen marinen Pilzen nachgewiesen.

In dieser Arbeit wurden *Phoma*-Pattern von dem obligat marinen Pilz *Asteromyces cruciatus* TM 76, dem marinen Isolat *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 und dem terrestrischen Isolat *Penicillium janczewskii* DSM 847 untersucht und verglichen.

Der obligat marine Pilz TM 76 und das marine Isolat H-TW5/869 zeigten zwischen 15 °C und 35 °C ein deutliches *Phoma*-Pattern. Im Gegensatz dazu zeigte das terrestrische Isolat DSM 847 keine ein-ein-deutige Korrelation (Abb. 4.3).

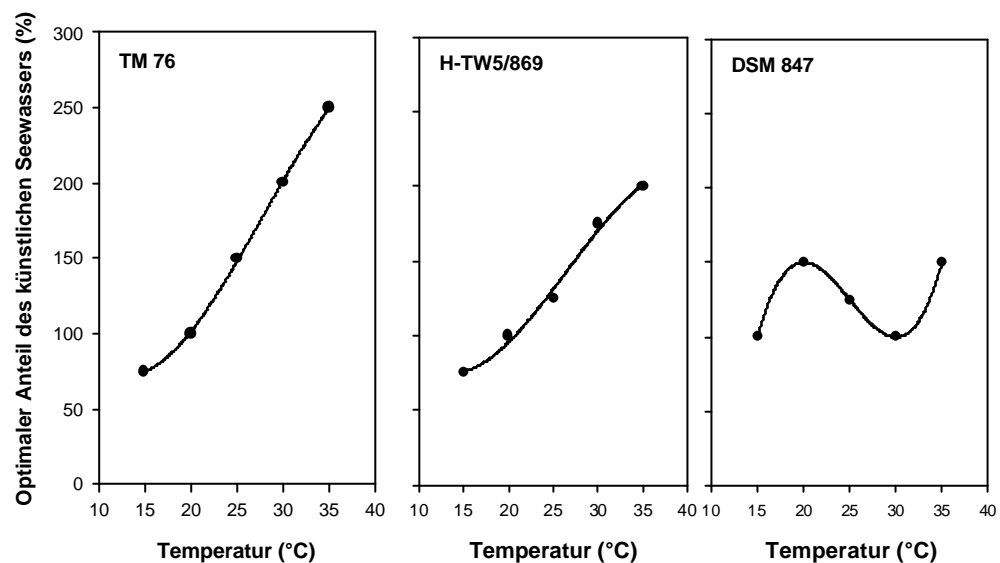


Abb. 4.3: Abhängigkeit des Salinitäts-Optimums von der Kultivierungstemperatur für drei Pilzisolatete bezogen auf die maximale relative Wachstumsrate

4.4 Die Sekundärmetabolite von Stamm H-TW5/869 und ihre biologische Aktivitäten

Penicillium sp. sind gute Naturstoffproduzenten (Mantle, 1987). Über 400 Sekundärmetabolite sind in der Literatur aus *Penicillium* beschrieben. Nach der Entdeckung des ersten wichtigen Antibiotikums Penicillin sind zahlreiche Wirkstoffe aus der Gattung *Penicillium* gewonnen worden. Ayer et al. hat 1990 zum ersten Mal die Piperazinediones A-C als neue Naturstoffe aus einem marinen Isolat von *Penicillium brevi-compactum* erhalten. Bis heute sind mindestens 36 neue Naturstoffe von marinen Penicillien beschrieben. Im Rahmen dieses Verbundprojektes wurden 11 Substanzen aus dem marinen Isolat *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 isoliert und davon 10 Strukturen aufgeklärt (siehe 3.6.2). Außer den Produkten **3** und **4** sind die anderen Substanzen schon von terrestrischen *Penicillium* sp. bekannt (Tab. 4. 4).

Tab. 4.4: Sekundärmetabolit aus dem *Penicillium janczewskii* H-TW5/869

Substanz	Chem. Bezeichnung	Literatur und Stamm
1	3-Methoxy-4-hydroxy-6-isopentenyl-4-(4'-methoxy-phenyl)-quinolinon (DQ1)	<i>Penicillium</i> cf. <i>simplicissimum</i> (Kusano et al., 2000)
2	3-Methoxy-4-hydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-quinolinon (DQ2)	<i>Penicillium</i> sp. (NTC-47) (Hayashi et al., 1997); <i>Penicillium</i> cf. <i>simplicissimum</i> (Kusano et al., 2000)
3	3R*, 4S* - dihydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-Quinolinon (DQ3)	diese Arbeit
4	3S*, 4R* - dihydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-Quinolinon (DQ4)	diese Arbeit
5	1,3,6-Trihydroxy-8-methylxanthon	<i>Lecanora reuteri</i> und <i>Penicillium patulum</i> (Broadbent, 1975)
6	2,4,6-Trihydroxy-2',4'-dimethoxy-6-methylbenzophenon	<i>Penicillium patulum</i> und <i>Penicillium expansum</i> (McMaster et al., 1960)
7	Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx (Oxford et al., 1939), <i>Penicillium nigricans</i> (Wright, 1956), <i>Penicillium janczewskii</i> (Brain et al., 1949), <i>Penicillium urticae</i> (Peter et al., 1989) und <i>Penicillium patulum</i> (Wu et al., 1983).
8	5',6'-Dehydro-Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvum</i> und <i>P. patulum</i> (McMaster et al., 1960)
9	2,2',4,4',6-Pentahydroxy-6'-methylbenzophenone	<i>Penicillium patulum</i> und <i>Penicillium expansum</i> (McMaster et al., 1960).
10	Compactin	<i>Penicillium brevicompactum</i> (Brown et al., 1976)
11	Fettsäure-Ester	

Die biologische Aktivität der isolierten Reinsubstanzen wurde getestet und mit in der Literatur beschriebenen Wirkungen verglichen (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Biologische Aktivität der isolierten Verbindungen

Substanz	Wirkung		
	Cytotoxisch*	Antimikrobiell	Andere
1	3	-	Nematicidal ¹ ; <i>Artemia</i> narkotisch
2	1	-	
3	0	-	in Bearbeitung
4	1	-	in Bearbeitung
5	2	<i>Clostridium welchii</i> ²	
6	3	-	
7	1	Antifungisch ³	
8	0	Antifungisch ⁴	
9	1	-	
10	2	-	Cholesterol- Biosynth. und HMG-CoA-Hemmer ⁵
11	2	-	

* Der Test wurde bei Brain (Dr. Krohn) durchgeführt. Die Bewertung siehe 2.8.12.1.

1. Kusano et al., 2000; 2. Broadbent et al., 1975; 3. Brain et al., 1949; 4. McMaster et al., 1960; 5. Humphries, 1981.

Im Laufe unserer Arbeit wurde die Substanz **1** aus *Penicillium cf. simplicissimum* publiziert und seine nematicide Wirkung (1000 mg/l) beschrieben, z. B. gegen Fadenwürmer, die als Pflanzenparasiten für einen weltweiten Verlust von 80 Milliarden US\$ in der Getreideproduktion pro Jahr verantwortlich sind (Kusano et al., 2000).

Substanz **1** zeigte keine antimikrobielle Wirkung gegen *Bacillus subtilis* ATCC 23350; *E. coli* ATCC 23716; *Micrococcus luteus* ATCC 4698; *Candida boidinii* ATCC 18810.

In dieser Arbeit wurden weitere Wirkungen dieser Substanz nachgewiesen.

Beim Cytotoxizitätstest (20 ng/μl) zeigte Substanz **1** eine gute cytotoxische Wirkung gegen CHO-k1 Zellen (Tab. 4.5).

Bei der Zugabe von Substanz **1** zu dem Testorganismus *Artemia salina* zeigte sich eine sowohl cytotoxische als auch narkotisierende Wirkung auf die Krebse (Abb. 4.4). *Artemia salina* können nach dem Schlüpfen ohne Fütterung ca. 72 Stunden leben (siehe Abb. 4.4 CK). 75 Krebse wurden in 5 Bechergläsern mit 3 ml Seewasser verteilt, davon dienen 2 Bechergläser als Kontrollgruppe und 3 Bechergläser als Testgruppe. Die Bewegung der Krebse wurde beobachtet: wenn die Krebse in der oberen Schicht regelmäßige schwimmen konnten, wurden sie als „vital“ bezeichnet. Wenn die Krebse nur in der unteren Schicht schwammen oder nicht schwimmen konnten, aber eine deutliche Bewegung nachgewiesen

werden konnte, dann wurden die Krebse als „lebend“ bezeichnet. Wenn keine Bewegung von den Krebsen zu beobachten war, wurden die Krebse als „tot oder bewegungslos“ notiert. Bei einer Konzentration von 33 mg/l wurden die Bewegungen von *Artemia salina* nach einer Stunde total unterbunden. Nach 36 Stunden wurden einige *Artemia salina* wieder aktiv und lebten anschließend länger als die Kontrollgruppe. Durch eine Verhinderung der Bewegung kann möglicherweise Energie gespart werden und daher eventuell die Überlebenszeit insgesamt verlängert werden. Der genaue Mechanismus der „narkotisierenden Wirkung“ ist zur Zeit nicht bekannt.

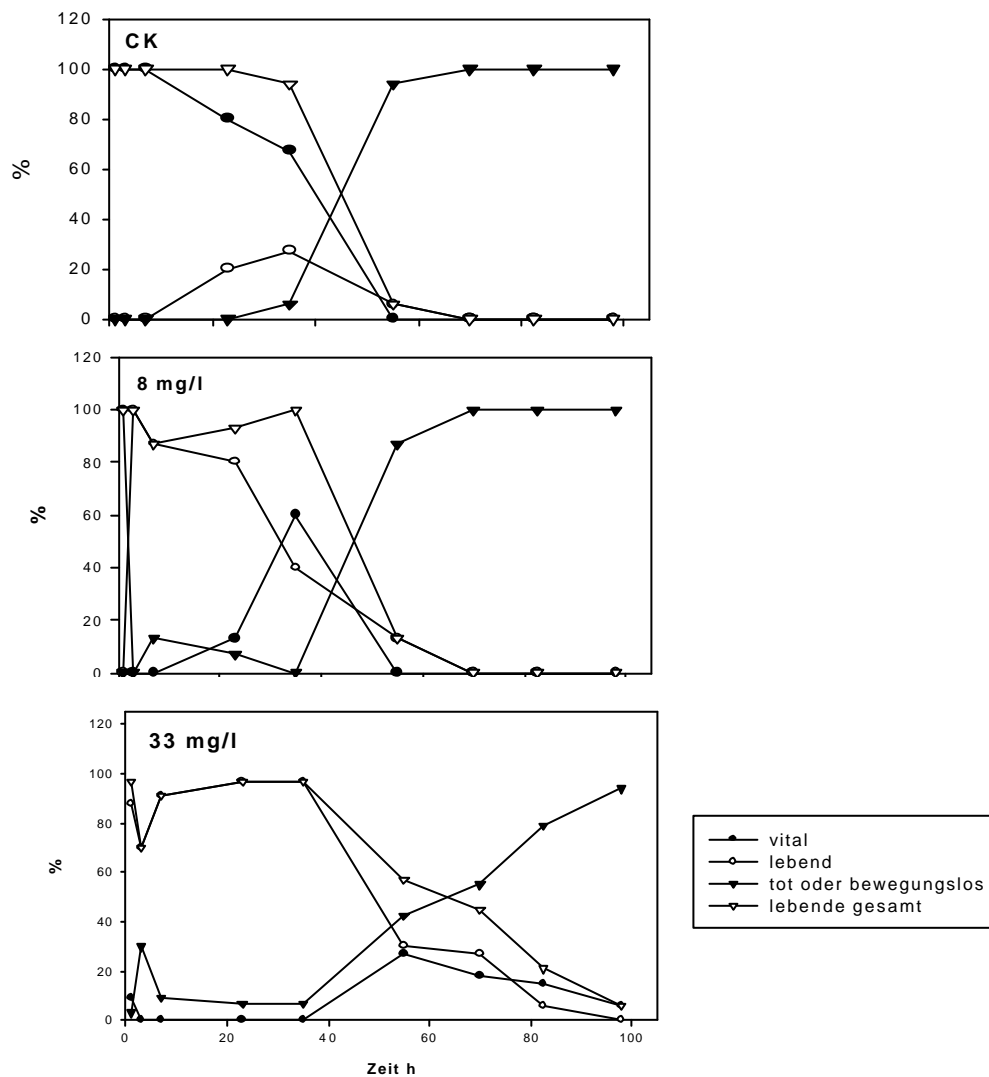
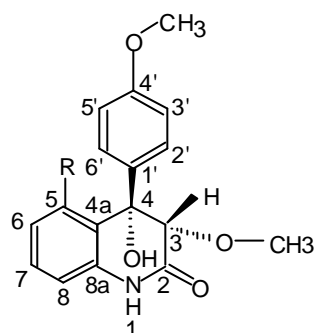


Abb. 4.4: Toxische Wirkung von DQ1 gegen *Artemia salina*

Hayashi et al. (1997) fanden toxische Wirkungen gegen *Artemia salina* bei einer ähnlichen Verbindung **13** (Abb 4.5). Die LC₅₀ (mg/l) beträgt dort 20 mg/l. Über eine narkotische Wirkung hat er nicht berichtet. Die Autoren haben bei dem dehydroxylierten Derivat **2** über keine Wirkungen gegen *Artemia salina* berichtet. Durch den Vergleich der Struktur von Substanz **1**, **2** und **13** kann vermutet werden, dass die OH Gruppe in Position 5 entscheidend für diese toxische Wirkung gegen *Artemia salina* sein könnte. Der Unterschied zwischen **1** und **13** liegt darin, dass **1** in der Position 6 eine Isopentenyl-Seitenkette besitzt. Ob diese Struktur weitere biologische Wirkungen hat, ist noch nicht bekannt.



13 R = OH

2 R = H

Abb. 4.5: Struktur der Dihydroquinolinon

Die Substanz **1** (DQ1) wurde als Beispiel für die weitere Optimierung der Naturstoffproduktion bei dem marinen Stamm H-TW5/869 eingesetzt.

4.5 Einfluß von Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin auf die DQ1-Bildung und Wachstum des Organismus

DQ1 ist ein Dihydroquinolin Alkaloid. Der genaue Stoffwechselweg ist bisher nicht bekannt. Kusano hat aber einen Biosyntheseweg vorgeschlagen, der in Abb. 4.6 dargestellt ist und der in dieser Arbeit überprüft werden sollte.

Nach Kusano (2000) wird die Dihydroquinolinon Gruppe aus Bausteinen von Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin (oder Phenylalanin) biosynthetisiert. In dieser Arbeit wurden die vermuteten Bausteine bei der Kultivierung in Schüttelkulturen zugegeben, um einen möglichen Einfluß auf die Produktion der Dihydroquinolinon zu untersuchen. Die Abb. 4.7a zeigt, dass die Zugabe der beiden Aminosäuren keine steigende Wirkung für die Bildung von

DQ1 besitzen. Wurde die Aminosäure Methionin allein (siehe Abb. 4.28) oder mit den anderen zwei Substanzen zusammen zugegeben, so wurde die DQ1 Bildung gehemmt. Die Anthranilsäure alleine zeigte einen positiven Einfluß auf die DQ1 Bildung bei der Zugabe am Anfang der Kultivierung, aber ein Einsatz von Anthranilsäure in der fortgeschrittenen Wachstumsphase (67h) oder stationären Phase (110h) zeigte keine positive Wirkung auf die Bildung des Produktes DQ1. Die Zugaben von Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin haben keine negativen Wirkungen auf die Biomassebildung (Abb.4.7 b). Der End-pH ist bei der Zugabe am Anfang der Kultivierung höher als bei der Kontrollgruppe und bei der Kultivierung mit späteren Zugabe, d. h. die Zugabe am Anfang beeinflusst den pH-Verlauf der Kultivierung. Die Konzentration der reduzierenden Zucker liegt am Ende der Kultivierung bei 0.29-0.57 g/l im Vergleich zum Anfang mit 22 g/l.

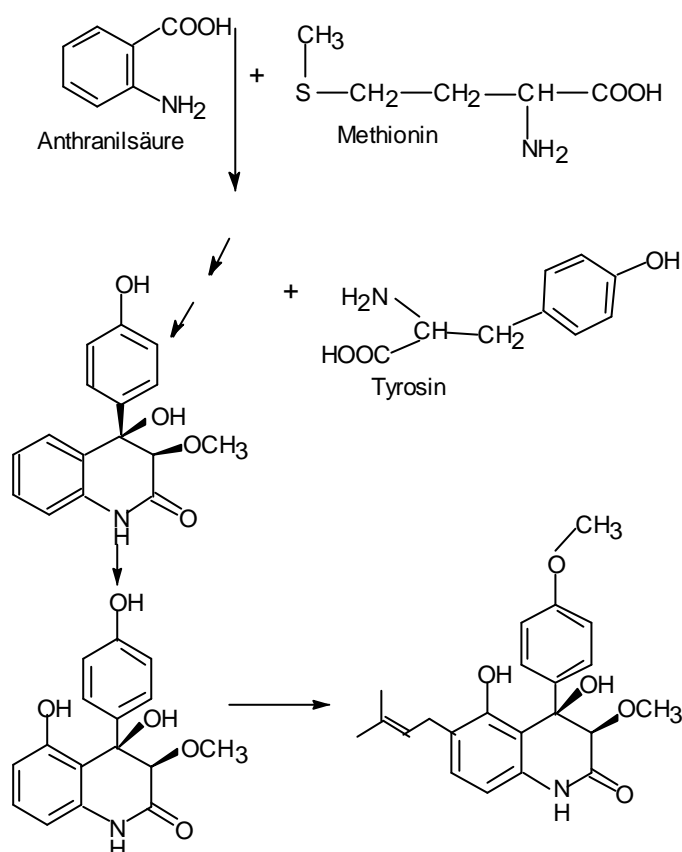


Abb.4.6: Vorschlag des Stoffwechselweges von Dihydroquinolinon (Kusano et al., 2000)

Für die Überprüfung der Hypothese von Kusano sind weitergehende Untersuchungen des möglichen Biosyntheseweges nötig.

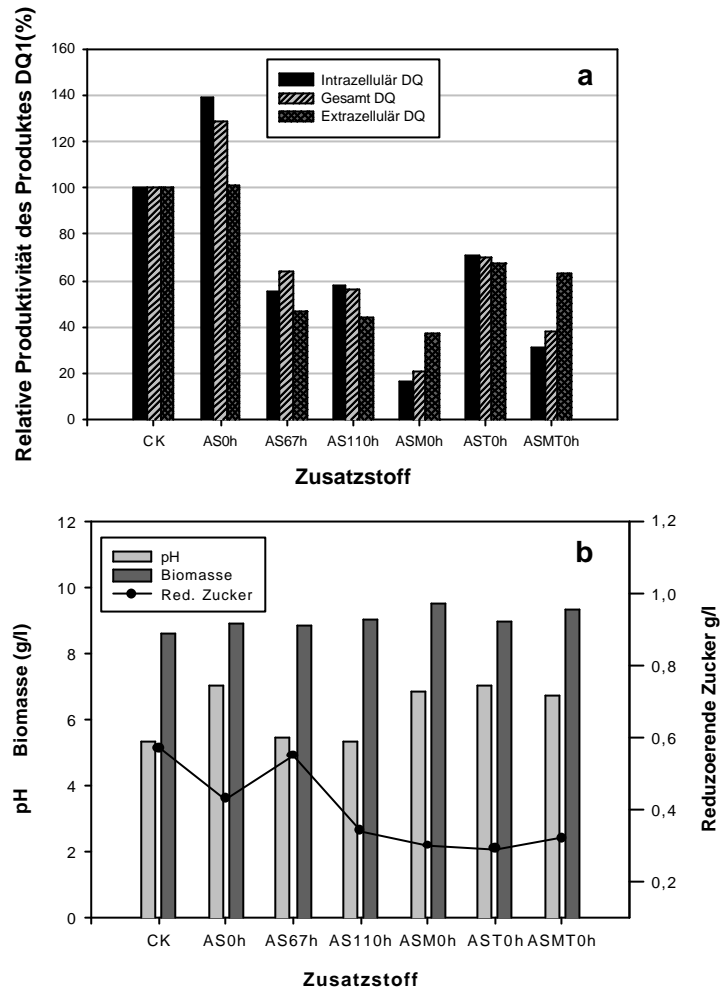


Abb. 4.7: Einfluß der Zusatzstoffe Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin auf die DQ1-Bildung und das Wachstum vom Isolat H-TW5/869

CK = Kontrollversuch ohne Zusatzstoff auf 100% gesetzt.

AS = Anthranil Säure (0.25 g/l); M = Methionin (0.25 g/l); T = Tyrosin (0.25 g/l)

AS0h = AS zum Zeitpunkt t = 0 zugegeben; AS 67 h = AS zum Zeitpunkt t = 67 h zugegeben; AS 110h = AS zum Zeitpunkt t = 110h zugegeben

Bedingungen: 100 ml Schüttelkultur, pg Medium, 60% Seewasseranteil, pH 5.20; 25°C; 100 Upm; 130 h.

4.6 Vergleich der Metabolitsynthese von H-TW5/869 mit zwei terrestrischen Stämmen DSM 847 und DSM 62867

Kusano hat die Substanzen DQ1 und DQ2 in einem Isolat von *Penicillium cf. simplicissimum* aus einer Bodenprobe gefunden. Zum Vergleich wurden von uns die Referenzstämme *Penicillium simplicissimum* DSM 62867 und *Penicillium janczewskii* DSM 847 im pg Medium mit Leitungswasser und Seewasser kultiviert und aufgearbeitet. Die Metabolite aus unserem marinen Isolat H-TW5/869 wurden mit DC (Chloroform : Methanol 9:1) und HPLC-DAD getrennt und verglichen.

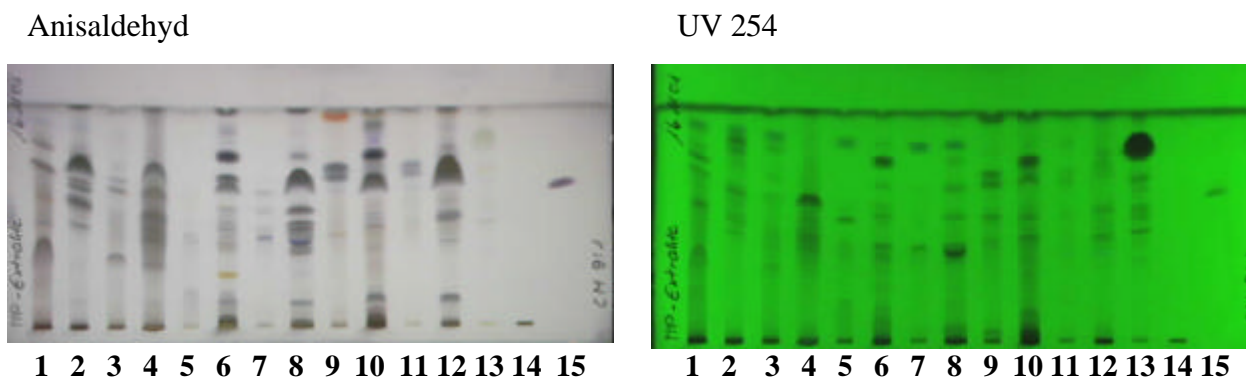


Abb. 4. 8: Vergleich der Extrakte von H-TW5/869, DSM 847 und DSM 62867 in der DC

Leitungswasser (LTS); Seewasser (SW); Überstand (Ü); Biomasse (B)

1 = H-TW5/869, Ü, LTS; 2 = H-TW5/869, B, LTS; 3 = H-TW5/869, Ü, SW; 4 = H-TW5/869, B, SW; 5 = DSM 847, Ü, LTS; 6 = DSM 847, B, LTS; 7 = DSM 847, Ü, SW; 8 = DSM 847, B, SW; 9 = DSM 62867, Ü, LTS; 10 = DSM 62867, B, LTS; 11 = DSM 62867, Ü, SW; 12 = DSM 62867, B, SW; 13 = DQ1; 14 = Tryptophan; 15 = Tryptophol

Das Wachstum der beiden Bodenisolat war im Leitungswasser höher als im Seewasser. Der Stamm DSM 62867 bildete im Leitungswasser ein rotes Pigment, im Seewasser jedoch nicht. Die DC zeigte ähnliche Banden (Abb. 4.8). Anhand der DC konnte beim Vergleich mit dem Substanzfleck von DQ1 keine klare Aussage über eine Produktion bei den Stämmen DSM 847 und DSM 62867 getroffen werden.

Die HPLC-DAD-Untersuchungen zeigten, dass in den Extrakten von DSM 847 und DSM 62867 teilweise Peaks mit ähnlichen Retentionszeiten wie bei H-TW5/869 auftraten (Tab. 4.6). Außer dem Signal der Substanz **2** vom Stamm DSM 847 und dem Signal der Substanz **8** von Stamm DSM 62867 sind alle vergleichbaren Peaks von DSM 847 und DSM 62867 im Vergleich mit dem vom Stamm H-TW5/869 wesentlich kleiner (< 25 %). Die Identität der Peaks konnte mittels Co-Chromatographie mit reinen Substanzen nachgewiesen werden.

Tab. 4.6 : Vergleich der Peaks im HPLC-Chromatogramm

RS		1	2	3	4	5	6	8	10
H-TW 5/869	Rt	14.03	5.68	3.68	4.37	9.94	8.51	10.88	15.47
	Pf	25602259 (100 %)	169200 (100 %)	25400 (100 %)	64800 (100 %)	5100320 (100 %)	564500 (100 %)	236800 (100 %)	1454000 (100 %)
DSM 847	Rt	13.97	5.68	-	4.35	9.97	8.59	10.83	-
	Pf	63280 (0.25%)	121493 (71 %)	-	15820 (24 %)	1189640 (23 %)	106860 (20%)	51700 (21 %)	-
DSM 62867	Rt	13.95	-	-	-	9.95	-	10.85	15.57
	Pf	43440 (0.17 %)	-	-	-	114040 (2 %)	-	112760 (48 %)	12820 (0.9 %)

RS = reine Substanzen aus H-TW5/869; Rt = Retentionszeit (min); Pf = Peakfläche

Bedingungen: pg Medium, 100 % Seewasser; 25°C; 100 Upm; 130 h.

Die Hauptprodukte der drei Stämme unterscheiden sich deutlich (Abb. 4.9). Dabei zeigte das marine Isolat eine besonders starke DQ1-Produktion bei einer Kultivierung im Seewasser. Die DQ1-Bildung ist hier ca. 1000 fach größer als bei den zwei terrestrischen Stämmen. Der Stoffwechsel des terrestrischen Isolates von *P. janczewskii* weist dagegen unter salzfreien Bedingungen weitere polare Substanzen auf und auch *P. simplicissimum* bildet im Leitungswasser deutlich mehr Produkte als in Salzgegenwart.

Die neue Substanz **3** wurde von den zwei terrestrischen Isolaten nicht gebildet. Es wird vermutet, dass der Pilz DSM 847 die neue Substanz **4**, die eine isomere Verbindung von Substanz **3** ist, bilden kann.

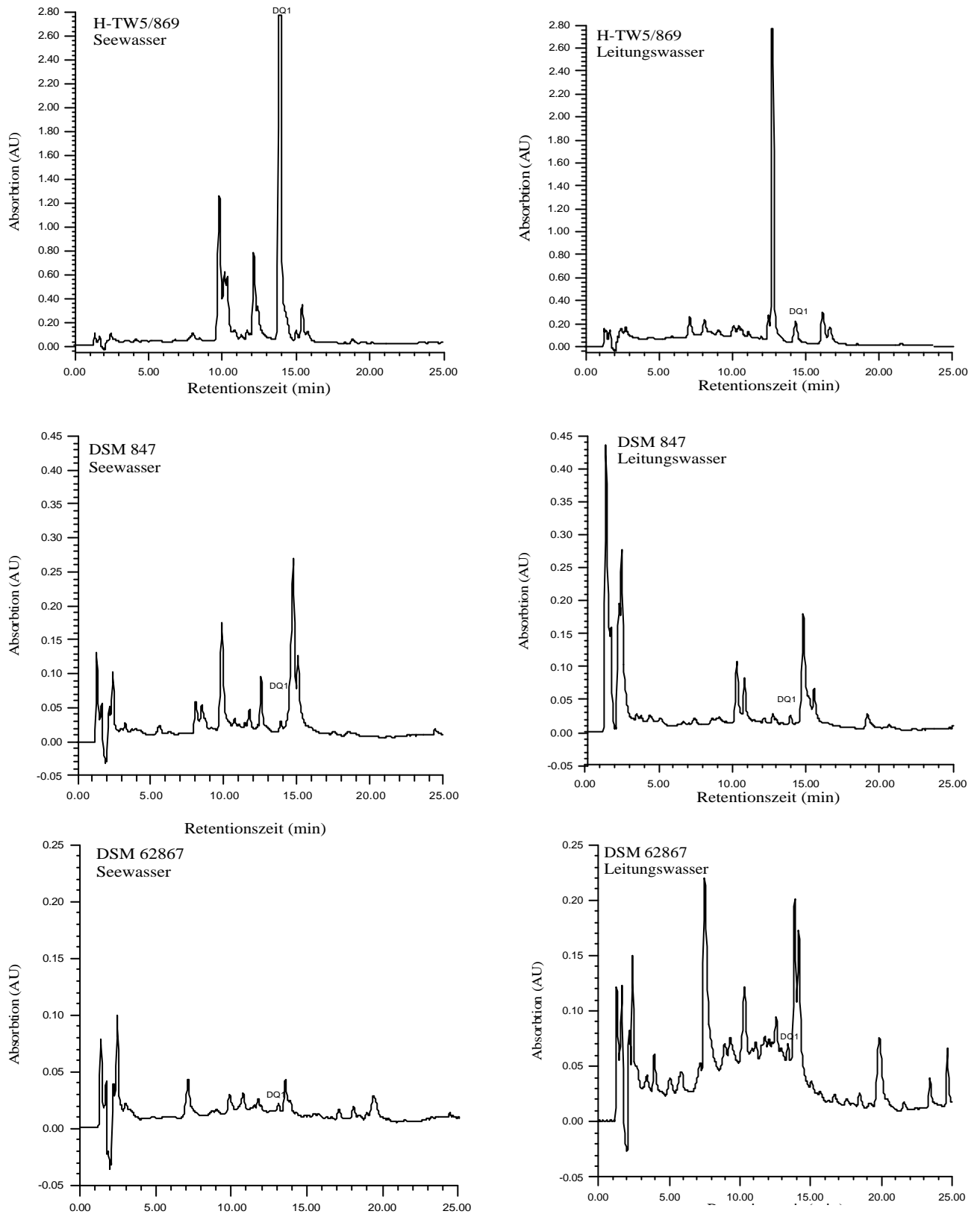


Abb. 4.9: Vergleich der Extrakte von H-TW5/869, DSM 847 und DSM 62867 in HPLC (254 nm), HPLC-Bedingungen siehe 2.8.15

4.7 Charakterisierung des Wachstumsverhaltens und der Dihydroquinolinon Produktion von *Penicillium janczewskii* H-TW5/869

4.7.1 Einfluß verschiedener Medien auf das Wachstum und die Dihydroquinolinon (DQ1) Bildung

Der Stamm *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 wurde mit 7 verschiedenen Medien (siehe 2.4) im Schüttelkolben kultiviert. Das Wachstum und die Dihydroquinolinon Bildung verschiedener Kulturen wurde verglichen. H-TW5/869 kann im pg Medium besser wachsen als in den anderen getesteten Medien. (Abb. 4.10). Die maximale Biomassekonzentration betrug 6.7 g/l.

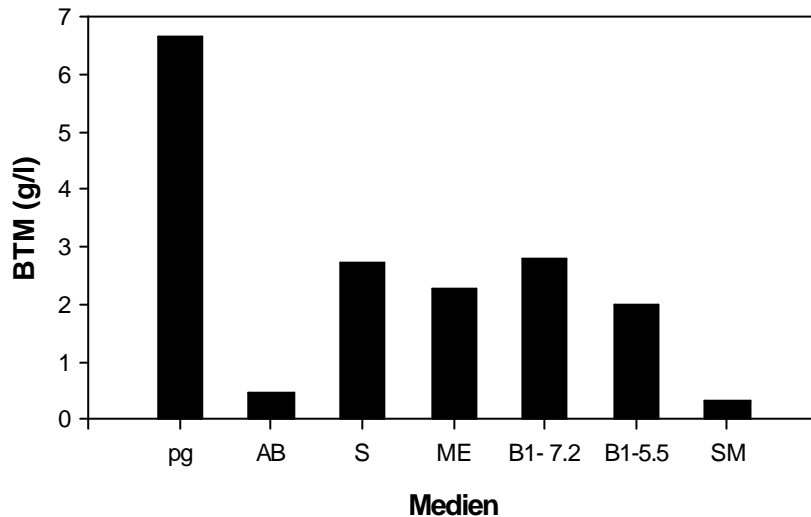


Abb.4.10: Einfluß verschiedener Medien auf das Wachstum von H-TW5/869

Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; 25°C, 100 Upm, 140 h.

pg = Kartoffel – Dextrose Brühe; AB = Algen Medium; S = Stärke Medium;

ME = Malz Extrakt Medium; B1- 7.2 = B1 Medium, Anfang pH 7.2;

B1-5.5 = B1 Medium, Anfang pH 5.5; SM = Schaumann Medium

Das pg Medium ist von den erprobten Medien das beste für die DQ1 Bildung (Abb. 4.11a). Die maximalen Produktkonzentration war 6.5 mg/l für das pg-Medium. Der Pilz H-TW5/869 wächst im B1-5.5 Medium schlechter als im B1-7.2 Medium, produziert aber mehr DQ1 im B1-5.5 Medium. Außerdem erhält man in den S, B1-7.2 und B1-5.5 Medien mehr extrazelluläres DQ1 als im pg Medium. Das Medium hat also einen Einfluß auf das Verhältnis zwischen den intrazellulär und extrazellulär gewonnenen Produkten (DQ1) (Abb. 4.11b).

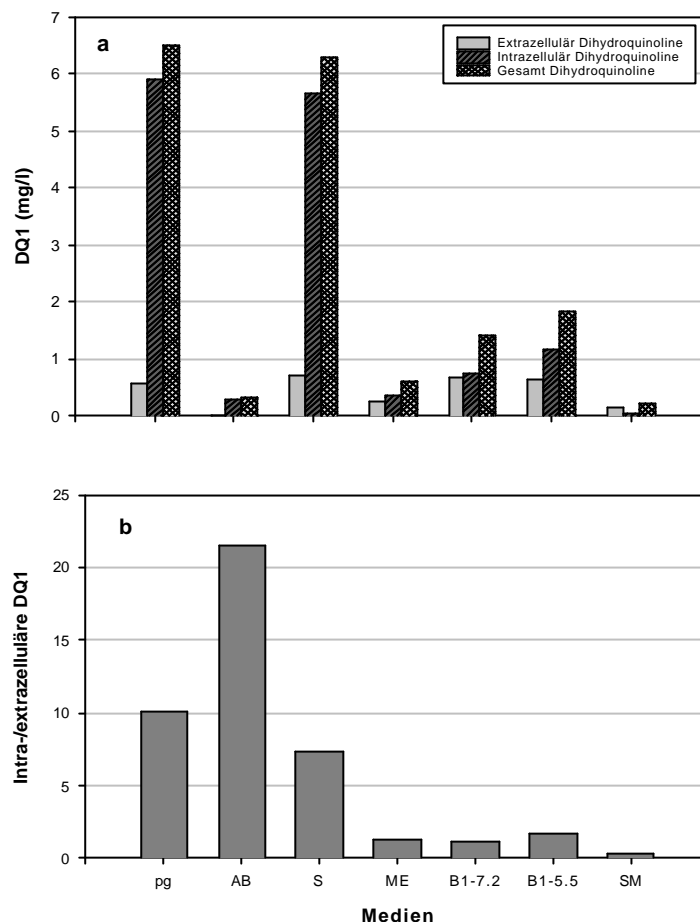


Abb. 4.11: Einfluß verschiedener Medien auf die DQ1 Bildung von H-TW5/869(a) und das Verhältnis der Intra-/Extrazellulären DQ1-Bildung (b)

Das pg Medium wurde für die weitere Optimierung des Wachstums und der Produktion eingesetzt.

4.7.2 Untersuchung des Prozeßverlaufs in Schüttelkulturen

Der Pilz H-TW5/869 wurde mit dem pg Medium (im Seewasser) in 1 l Schüttelkolben (200 ml Medium) kultiviert. Das Wachstum von H-TW5/869 ist in Abb. 4.12 dargestellt. Der Organismus wuchs innerhalb von 80 h bis zu einer max. Biomassekonzentration von 6.7 mg/l. Die max. Wachstumsrate betrug 0.073 h^{-1} . Nach Erreichen des Maximums der Biomassekonzentration stieg der pH an. Die max. DQ1 Konzentration war 6.7 mg/l und wurde in der stationären Phase erreicht. Der Abfall der Produktkonzentration im Laufe der stationären Phase und Absterbephase zeigt, dass das Produkt nicht stabil war.

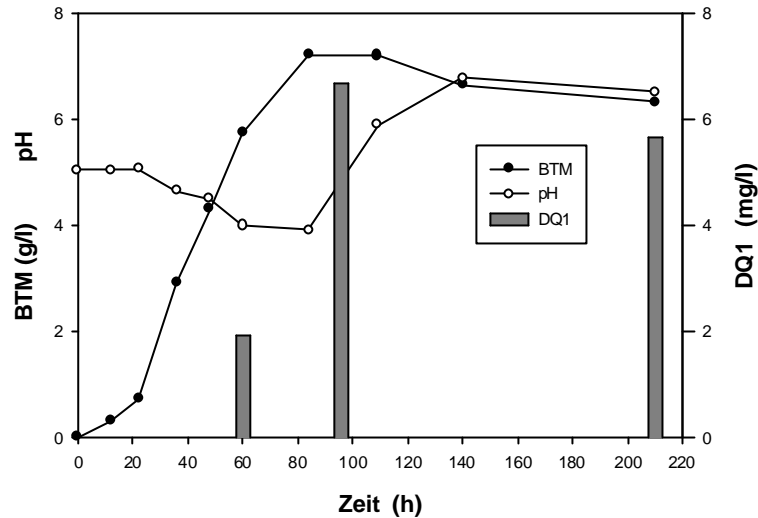


Abb. 4.12: Wachstumsverhalten von H-TW5/869 bei der Schüttelkultur.
Bedingung: 200 ml pg Medium; 25°C; 100 UPM

4.7.3 Untersuchung des Prozeßverlaufs im 10 l Bioreaktor

Der Stamm *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 wurde mit dem pg Medium (im Seewasser) in einem 10 l Bioreaktor kultiviert, die zeitlichen Verläufe der wichtigsten Prozeßgrößen sind in Abb. 4.13 dargestellt. Durch die gute Rührung und Begasung kann der Organismus schneller wachsen als im Schüttelkolben. Die Biomassekonzentration erreicht 6.8 g/l innerhalb von 75 h. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} beträgt 0.083 h^{-1} und die Ausbeute $Y_{x/s}$ beträgt $0.35 \text{ g BTM /g Glukose}$. Der pH steigt nicht so schnell wie bei der Schüttelkultur, sondern nähert sich langsam dem Wert 4.0 und steigt dann nach etwa 150 Stunden schnell auf 7.3. In der Anlaufphase und der exponentiellen Wachstumsphase war ein hoher relativer Sauerstoffverbrauch vorhanden. Zum Zeitpunkt 48 h war der pO_2 auf 40% der Sättigung gefallen. DQ1 wurde in der Verzögerungsphase (48-90 h) schnell gebildet. Die DQ1 Konzentration stieg dann in der stationären Phase bis 124 h nur noch langsam an. Die max. DQ1 Konzentration erreichte 7.33 mg/l. Die spezifische Produktbildungsrate q_p war $0.031 \text{ mg DQ1/g BTM/h}$. Die spezifische Substrataufnahmerate q_s war $0.071 \text{ g Glukose/g BTM/h}$.

DQ1 wird hauptsächlich als intrazelluläres Produkt gefunden. Das Verhältnis von intrazellulärem und extrazellulärem DQ1 zeigte im Laufe der Kultivierung insgesamt eine steigende Tendenz. In den Zeiträumen 16-28 h, 65-100 h und 160-210 h war jedoch eine Abnahme zu beobachten. Von 80–160 h nahm die Biomassekonzentration ab, dagegen stieg der intrazelluläre DQ1 Anteil gegenüber dem extrazellulären von 100-160 h langsam an. In der letzten Kultivierungsphase konnte beobachtet werden, dass die intrazelluläre und die

gesamte DQ1.Konzentration abnimmt. Es kann angenommen werden, dass die DQ1 in dieser Phase teilweise abgebaut oder umgebaut wurde.

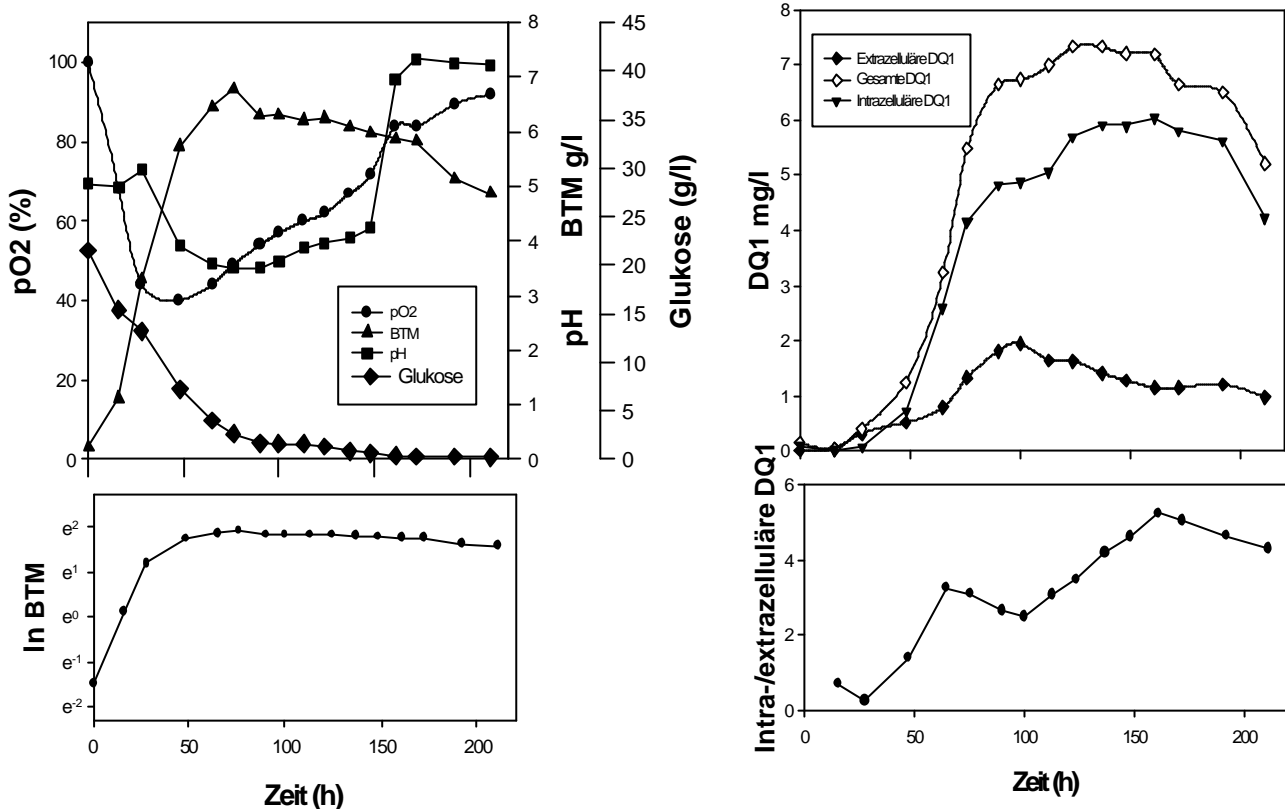


Abb.4.13: 10 l Volumen Fermentation von H-TW5/869

Bedingungen: 13 l Bioreaktor; 9 l pg Medium; 25°C; 300 Upm; Begasungsrate 0.33 v/vm; 10% Inokulum

4.7.4 Optimierung des Wachstums und der DQ1-Produktion

Ziel der Optimierung ist es, die DQ1 Produktion zu erhöhen. Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen (4.7.1) wurde das pg Medium (DIFCO) als Basismedium für die Optimierung verwendet. Bei der Optimierung wurde neben Prozeßgrößen wie dem pH, der Temperatur und der Sauerstoffversorgung besonders auch die Salzkonzentration berücksichtigt

4.7.4.1 Wachstum von H-TW5/869 auf der Agarplatte in Abhängigkeit von der Salinität und der Temperatur

Es ist bekannt, dass die Salinität das Wachstum mariner Mikroorganismen beeinflusst (Jennings, 1963; Torzilli et al., 1985; Cox et al., 1995). Ritchie (1957) und Lorenz (1992) haben bei einigen marinen Pilzen beobachtet, dass das Wachstum bei marinen Pilzen mit der Temperatur und der Salinität korreliert ist (siehe 4.3), deshalb wurden diese beiden Parameter in Agarplattenkulturen genauer untersucht. Dabei wurde die Salinität mit natürlichem und künstlichem Seewasser eingestellt.

H-TW5/869 wurde punktförmig auf Agarplatten angeimpft und bei verschiedenen Temperaturen kultiviert. Nach 72 Stunden wurde der Durchmesser der Kolonien gemessen. (Abb.4.14 und 4.15).

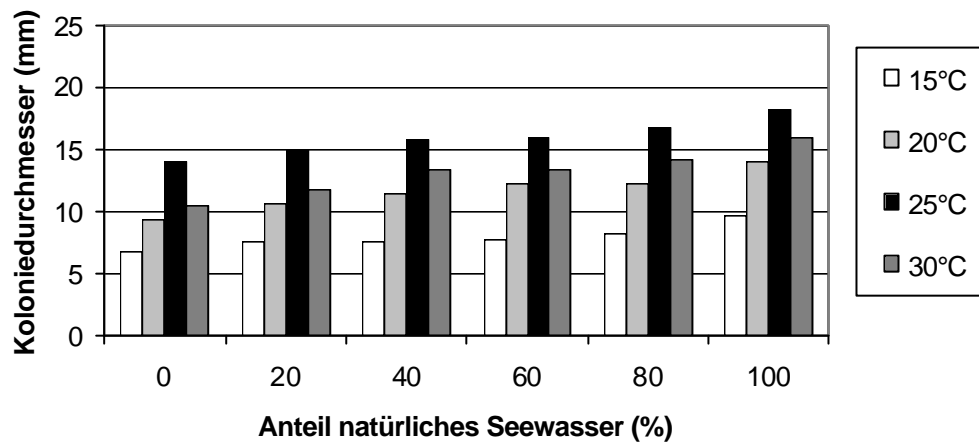


Abb. 4.14: Wachstum von H-TW5/869 auf Agarplatten in Abhängigkeit vom Seewasseranteil und der Temperatur

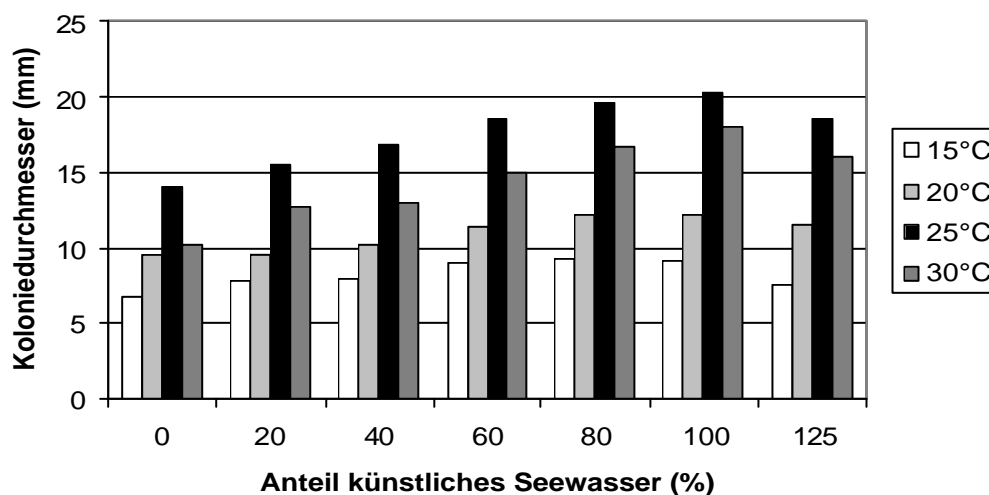


Abb. 4.15: Wachstum von H-TW5/869 auf Agarplatten in Abhängigkeit vom künstlichen Seewasseranteil und der Temperatur

Das Wachstum des marinen Isolates *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 zeigte eine Abhängigkeit von der Salinität. Bei 100% natürlichem Seewasser (Seewasser aus dem Jadebusen, Salzgehalt 3.0%) wurde ein besseres Wachstum als beim verdünnten Seewasser festgestellt. Bei 100% künstlichem Seewasser (Salzgehalt 3.3%) konnte die optimale Salinität festgestellt werden.

Die optimale Temperatur für das Wachstum des Organismus liegt bei 25°C.

4.7.4.2 Einfluß der Salinität auf das Wachstum und die Dihydroquinolin Produktion in der Standkultur

In der Sandkultur bildete der Pilz HTW5/869 einen schwimmenden Oberflächenfilm. Vor der Entwicklung des modernen Bioreaktors mit Rühr- und Belüftungssystemen für die Submerskultur war die Standkultur ein traditionelles Verfahren zur Penicillin- und Zitronensäure-Herstellung. Nachteile des Verfahrens waren kleine Kulturvolumen, schlechte Stoffübergänge, Inhomogenität und somit eine längere Kultivierungsdauer. Für die Durchführung der Massenproduktion wurde dieses Verfahren in der Industrie durch die moderne Bioreaktortechnik für die Submerskultur ersetzt. Fenical (1996) hat berichtet, dass die sekundären Metabolite vieler mariner Pilze wegen mangelnder Prozeßkenntnisse der Schüttelkultur oder des Bioreaktorbetriebes schwer zu reproduzieren sind. Dieses Phänomen trat auch bei unserer Arbeit auf. Deswegen wurde die Züchtung mariner Pilze für die marine Naturstoffforschung in Fernbachkolben oder Erlenmeyerkolben als Standkultur durchgeführt. Sie ist insbesondere für schnell wachsende Pilze geeignet.

H-TW5/869 wurde im Erlenmeyerkolben mit Kultivierungsmedien unterschiedlicher Salinität (200 ml Medium/ 1 l Kolben) 14 Tage kultiviert. Der Pilz bewuchs innerhalb von 3 Tagen bei allen Kolben die Oberfläche. Vier Tage später konnten auf der Oberfläche bei den Gruppen von 60%, 80% und 100% KS (Künstliches Seewasser) und SW (natürliches Seewasser) Sporen nachgewiesen werden. Bei der Gruppe mit Leitungswasser wurden erst am Anfang des 6. Tages Sporen beobachtet. Auch nach 14 Tagen waren bei den Gruppen 20% bzw. 40% KS und SW kaum Sporen zu sehen. Die Farbe der Kultur der Gruppen 20% und 40% KS und SW waren heller als die anderen. Die Biomassekonzentration in Abhängigkeit von der Salinität ist in Abb. 4.16 dargestellt.

Die Tendenzen der Biomassebildung bei verschiedenen Anteilen des natürlichen und künstlichen Seewassers sind in der Standkultur nicht identisch mit der Agarplattenkultur. Der Unterschied der

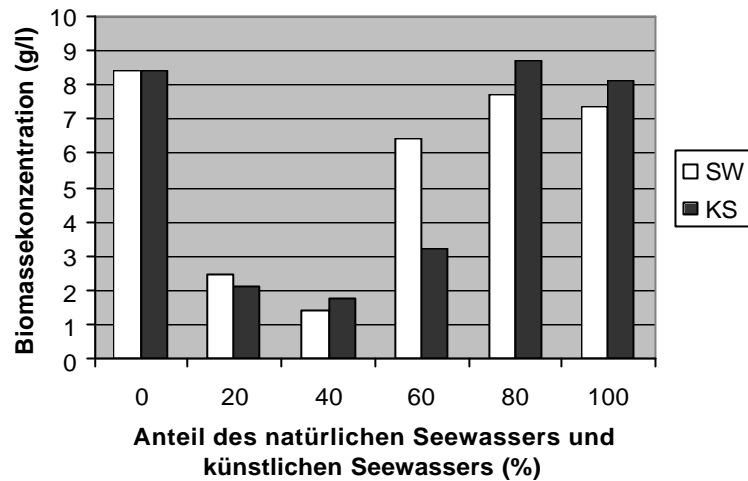


Abb. 4.16: Biomassekonzentration des Stammes H-TW5/869 in der Standkultur

beiden Kulturen liegt darin, dass der Pilz bei der Agarplattenkultur hauptsächlich zweidimensional wächst. Bei der Standkultur wächst das Mycel während des Oberflächenwachstums auch nach unten in die Flüssigkeit hinein.

Obwohl H-TW5/869 bei 80% bzw. 100% KS und SW am Anfang schneller wächst und früher Sporen bilden kann, ist die Biomassekonzentration am Ende der Fermentation nicht höher als bei Leitungswasser. Es könnten in den beiden extremen Fällen unterschiedliche Stoffwechselwege genutzt worden sein. Wenn der Pilz im Seewasser wächst, sollten Polyole gebildet werden, damit der Pilz gegen einen hohen osmotischen Druck ausgleichen kann. So könnte ein Teil der Glucose auch für den Polyolstoffwechsel eingesetzt worden sein. Das könnte die Ausbeute verringern und unterschiedliche Einflüsse auf die Produktbildung haben.

Die DQ1 Bildung bei unterschiedlicher Salinität ist in Abb.4.17 und Abb. 4.18 dargestellt.

Bei der Standkultur lag der optimale Seewasseranteil für die DQ1-Bildung bei 80%. Die DQ1 Konzentration erreichte 10.43 mg/l. Obwohl der Pilz im künstlichen Seewasser gut wachsen kann, ist die DQ1-Konzentration wesentlich geringer als in Leitungswasser und natürlichem Seewasser. Die maximale DQ1 Konzentration war im künstlichen Seewasser nur 3.97 mg/l. Dafür könnte das Fehlen eines oder mehrerer natürlicher Nährstoffe oder Spurenelemente im künstlichen Seewasser, im Vergleich zum natürlichen Meerwasser, verantwortlich sein.

Bei der Standkultur wird DQ1 vor allem intrazellulär erhalten. Ursache hierfür könnten der relativ feste Biofilm und fehlende Scherkräfte sein.

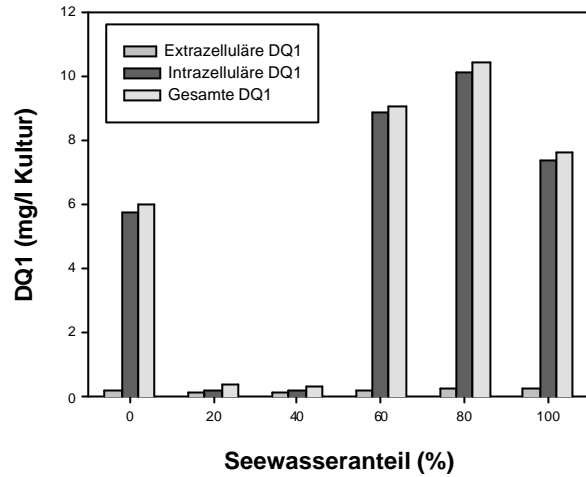


Abb. 4.17: DQ1 Produktion in der Standkultur mit unterschiedenem Anteil von natürlichem Seewasser
Bedingung: pg Medium; 25°C; 14 Tage

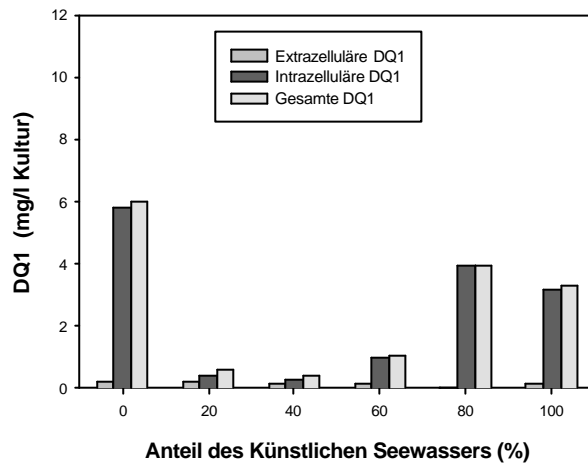


Abb. 4.18: DQ1 Produktion bei der Standkultur in künstlichem Seewasser mit unterschiedlichen Salinitäten
Bedingung: pg Medium; 25°C; Kultivierungsdauer 14 Tage

4.7.4.3 Einfluß der Salinität auf das Wachstum von H-TW5/869 und die DQ1-Produktion in der Schüttelkultur

Der Pilz H-TW5/869 wurde auch in der Schüttelkultur mit verschiedenen Anteilen von natürlichem Seewasser und künstlichem Seewasseranteil auf pg Medium kultiviert. Die Biomassekonzentration ist im zeitlichen Verlauf der Schüttelkultur mit unterschiedlichen Anteilen des natürlichen Seewassers in Abb. 4.19 dargestellt.

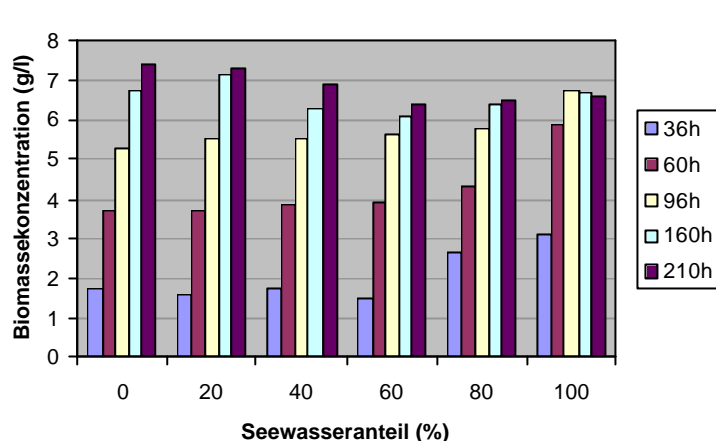


Abb. 4. 19: Biomassekonzentration von H-TW5/869 im Verlauf der Kultivierung in der Schüttelkultur
Bedingung: pg Medium; 25°C, 100 Upm.

Bis zum Zeitpunkt 96 h kann eine steigende Tendenz des Wachstums in Abhängigkeit von der steigenden Salinität beobachtet werden. Anschließend wuchs der Pilz bei niedrigerer Salinität etwas besser als bei höherer. Nach 96 h wurde der Zucker bei 100% Seewasseranteil limitierend ($< 0.5\text{g/l}$) (Abb. 4.20). Die Wachstumsform ist bei verschiedener Salinität unterschiedlich. Im Leitungswasser wuchs der Pilz langsam und bildete feste Pellets. Durch die Erhöhung der Salinität wurde die Pelletbildung reduziert. Bei höherer Salinität wurden lockere Pellets und filamentöses Mycel gebildet, während bei niedriger Salinität eher feste Pellets entstehen. Diese festen Pelletformen bieten einen besseren Widerstand gegenüber Scherkräften. In der Kultur mit 100 % Seewasser konnte nach 96 Stunden zerstörtes Mycel beobachtet werden, hier fiel auch die Biomassekonzentration niedriger aus. Außerdem ist die Farbe des Mycels bei höherer Salinität

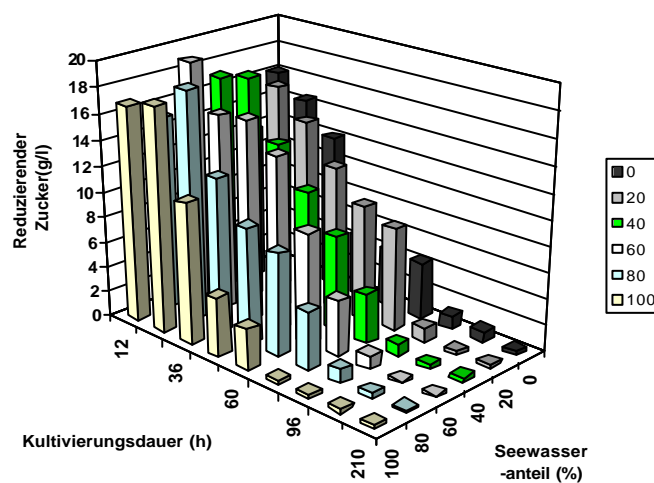


Abb. 4. 20: Abnahme an reduzierenden Zucker bei verschiedener Salinität bei der Kultivierung von H-TW5/869 in Schüttelkultur

des Mediums dunkler als bei niedriger Salinität. Bei 100 % Seewasseranteil wurde die maximale Biomassekonzentration nach 96 h gemessen, d. h. nach Eintritt der oben erwähnten Substratlimitierung. Bei den niedrigeren Seewasseranteilen lagen die Maxima am Ende der Fermentation. Die maximale Biomassekonzentration in Medien mit 0, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und 100 % Seewasseranteil ist 7.4, 7.3, 6.9, 6.4, 6.5 und 6.7 g/l.

Die Anfangswerte des pH aller Gruppen wurden auf 5.2 eingestellt. Der niedrigste erhaltene pH bei Leitungswasser, 20%, 40%, 60%, 80% und 100% Seewasseranteil ist 4.11 bzw. 4.29, 3.97, 4.00, 3.98, 3.92 und der höchste pH ist 7.46, 7.48, 7.43, 7.43, 7.05, 7.35. Die pH Verläufe sind bei der Kultivierung in Medien verschiedener Salinität unterschiedlich (Abb. 4.21). Das könnte einen Einfluß auf den Stoffwechsel und das Wachstum haben.

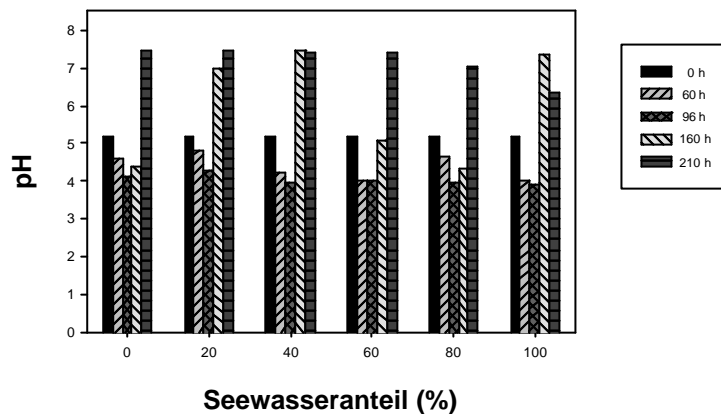


Abb. 4.21: pH Verlauf bei der Kultivierung in Medien unterschiedlicher Seewasseranteile

Die DQ1-Bildung in Abhängigkeit vom Seewasseranteil ist in Abb. 4.22 dargestellt.

Die DQ1 Bildung des Stammes H-TW5/869 ist vom Seewasseranteil abhängig. Die größte DQ1-Konzentration wurde mit 10.62 mg/l zum Zeitpunkt 160 Stunden bei einem Seewasseranteil von 60 % (Salzgehalt: 1.8 %) gemessen. Bei 60 % Salinität und 160 h Kultivierungszeit ist die Biomassekonzentration minimal. Die maximale Produktion wird bei minimalem Wachstum erreicht. Die optimalen Salinitäten für Wachstum und die DQ1-Produktion sind also nicht gleich.

Für die Bildung verschiedener sekundärer Metabolite ist die optimale Salinität unterschiedlich, wie aus einer Gegenüberstellung für die aus dem Stamm identifizierten Substanzen in Tabelle 4.7 hervorgeht. Aus dieser Darstellung ist erkennbar, dass der Seewasseranteil und somit vermutlich die Salinität für die Produktbildung verschiedener Metabolite unterschiedlich verantwortlich ist.

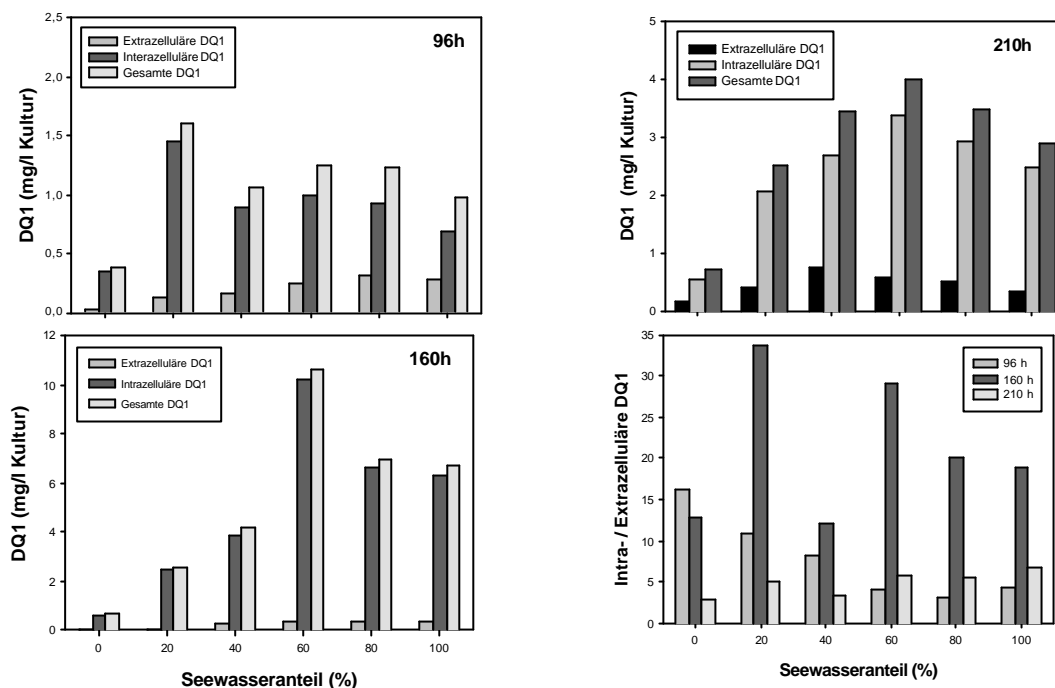


Abb. 4.22: DQ1 Produktion in der Schüttelkultur mit verschiedenen Seewasseranteilen
Bedingung: pg Medium; 25°C; 100 Upm

Tab. 4.7: Abhängigkeit der Produktion der wichtigsten gefundenen Sekundärmetabolite vom Seewasseranteil des Kultivierungsmediums

Metabolite	0% SW	20% SW	40% SW	60% SW	80% SW	100% SW
Compactin	X					
H 68	X					
5`,6`-Dehydro-griseofulvin				X		
1,3,6-Trihydroxy-8-methylxanthon					X	
2,4`,6-Trihydroxy-2`,4-dimethoxy-6`-methylbenzophenon	X					
DQ1				X		
DQ 2		X				
DQ3					X	
DQ4						X

Abb. 4.23 zeigt, dass die Salinität auch einen Einfluß auf das Verhältnis zwischen interzellulären und extrazellulären Sekundäremetaboliten haben kann. In Abb. 4.24 ist für fünf Sekundärmetabolite des Verhältnis von intrazellulären zu extrazellulären Metaboliten dargestellt. Für Werte kleiner als 1 wurde das Verhältnis von extrazellulären zu intrazellulären Metaboliten dargestellt.

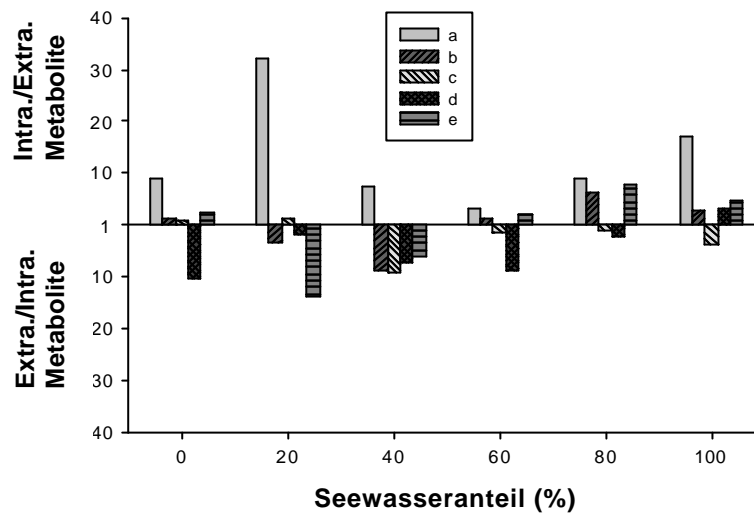


Abb. 4.23: Einfluß von Salinität auf das Verhältnis von intrazellulären und extrazellulären Sekundäremetaboliten bei H-TW5/869 in der Schüttelkultur
a = Compactin; b = 5[^],6[^]-Dehydro-griseofulvin; c = 1,3,6-Trihydroxy-8-methylxanthon;
d = H 68; e = DQ2

In den Abbildungen 4.24 bis 4.25 sind die Biomassekonzentration, die Produktkonzentration am Beispiel DQ1 und das Verhältnis von intrazellulärem zu extrazellulärem Produkt für die Variation des Anteils mit künstlichem Seewasser dargestellt.

Wenn der Stamm H-TW5/869 als Schüttelkultur mit künstlichem Seewasser kultiviert wird, ist das Wachstum im Leitungswasser besser als im künstlichen Seewasser. Aus Abb. 4.24 ist aber auch zu erkennen, dass die Tendenz mit der Kultivierungszeit abnimmt. Bei 60 % künstlichem Seewasser ist das Minimum der Biomassekonzentration zu erkennen, das auch bei natürlichen Seewasser beobachtet wurde.

Diese schwache fallende Tendenz bei steigender Salinität ist nach 120 Stunden umgekehrt wie bei der Agarplattenkultur nach 72 Stunden (siehe Abb. 4.15).

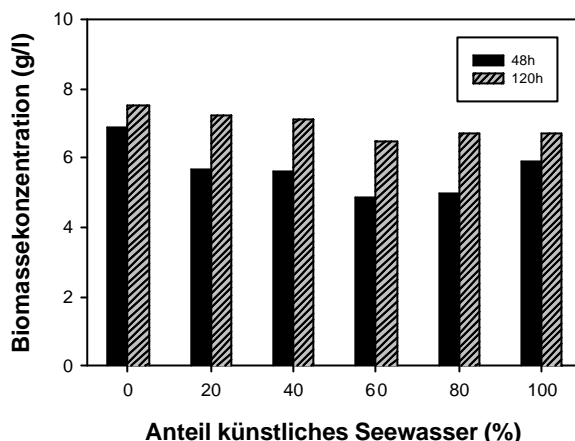


Abb. 4.24: Wachstum in der Schüttelkultur mit künstlichem Seewasser
Bedingung: pg Medium; 25°C; 100 Upm

Die Tendenz ist für die DQ1-Produktion im künstlichem Seewasser ähnlich wie im natürlichen Seewasser (Abb. 4. 25), insbesondere wird wieder bei einem Seewasseranteil vom 60% (Salzgehalt 1.98%) ein deutliches Maximums beobachtet. Nach 120 Stunden wurde eine Produktkonzentration von 9.25 mg/l erreicht. Auch das Verhältnis von intrazellulärem zu extrazellulärem ist ähnlich wie beim natürlichen Seewasser. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der entscheidende Einfluß für die Aktivierung des DQ1-Stoffwechselweges die Salinität ist und vermutlich nicht zusätzliche Komponenten im natürlichen Meerwasser.

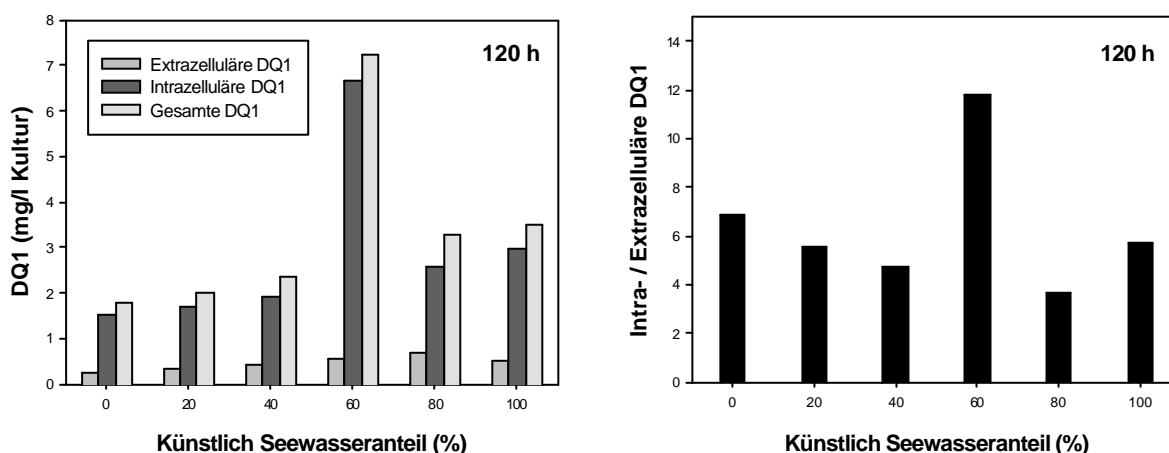


Abb. 4.25: Produktion von DQ1 in der Schüttelkultur mit künstlichem Seewasser zum Zeitpunkt 120h

Der Stamm H-TW5/869 konnte in der Standkultur und in der Schüttelkultur mit natürlichem Seewasser besser DQ1 bilden als mit künstlichem Seewasser (Tab. 4.8), wenngleich der Unterschied in der Schüttelkultur nicht so deutlich wie in der Standkultur ausfällt. In den

weiteren Untersuchungen wurde natürliches Seewasser in der optimalen Konzentration (60 %) verwendet.

Tab. 4.8: Vergleich der DQ1-Bildung in natürlichem Seewasser und künstlichem Seewasser

	Schüttelkultur		Standkultur	
	DQ1 (mg/l)	Opt. Anteil Seewasser (%)	DQ1 (mg/l)	Opt. Anteil Seewasser (%)
Natürliches Seewasser	10.62	60	10.43	80
Künstliches Seewasser	7.22	60	3.97	80

4.7.4.4 Einfluß des Anfangs-pH auf das Wachstum und die DQ1-Produktion

H-TW5/869 konnte in den Medien mit dem Anfangs- pH Wert um 7 gut wachsen, aber auch bei einer pH-Erniedrigung bis 4.5. Die max. Ausbeute für die Biomasse von 0.44 g BTM/ g Glucose lag bei $\text{pH} > 7$. Dieser pH Wert entspricht dem pH Wert des Gewässers, aus dem der Pilz isoliert wurde. Der optimale Anfangs- pH-Wert für die DQ1-Bildung lag allerdings bei $\text{pH} = 5.5$, und die Produktivität fällt bei $\text{pH} \geq 6$ stark ab. Der optimale Anfangs-pH-Wert für das Wachstum war demnach nicht gleich dem optimalen pH-Wert für die DQ1-Bildung, wie aus Abb. 4.26 zu erkennen ist.

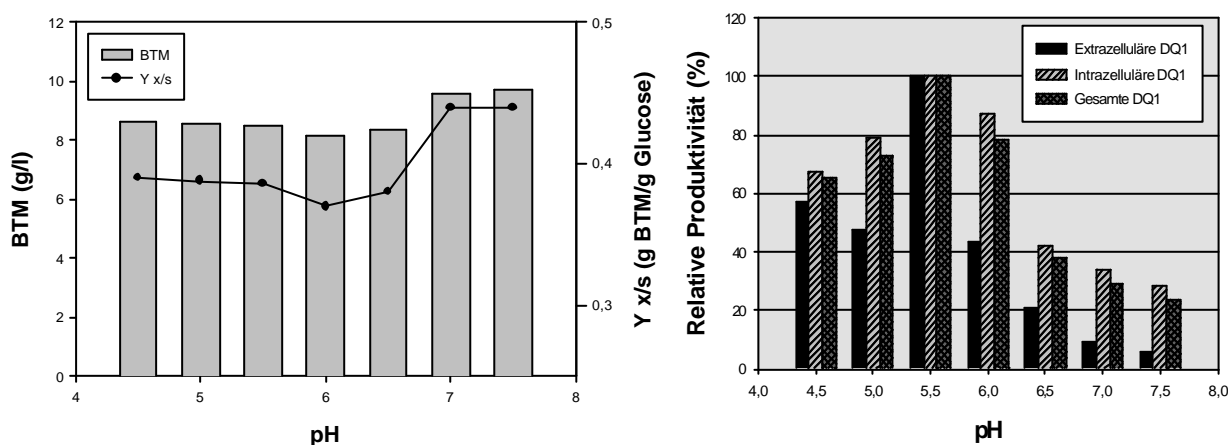


Abb. 4.26: Einfluß des Anfangs- pH auf Wachstum, Ausbeute und DQ1-Bildung

Bedingung: pg Medium; 25°C; 100 Upm; 136 h.

4.7.4.5 Einfluß der Stickstoffquelle auf das Wachstum und die DQ1 Produktion

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Stickstoffquellen auf das Wachstum und die DQ1 Produktion vom Stamm H-TW5/869 wurde das pg-Medium als Ausgangsmedium verwendet.

Die Alkaloid-Synthese ist durch Aminosäuren mit dem Intermediärstoffwechsel gekoppelt. Stickstoff ist für die Aminosäuren- und Enzyymbildung wichtig. In dieser Arbeit wurde der Einfluß von 20 verschiedenen Aminosäuren, sowie von den Stickstoffquellen Pepton, NH_4Cl , NaNO_3 , Harnstoff und Hefeextrakt auf den Wachstum- und Produktionsprozeß untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten in Schüttelkulturen.

4.7.4.5.1 Einfluß der Zugabe von Aminosäuren

Zunächst erfolgt ein Vergleich der Aminosäuren. Bei einer Zugabe von Asparagin, Prolin, Glutaminsäure, Tryptophan, Tyrosin und Threonin ist eine geringe Wachstumshemmung zu beobachten. Der Zusatz der anderen Aminosäuren hatte eine positive aber nicht immer eine signifikante Wirkung auf das Wachstum.

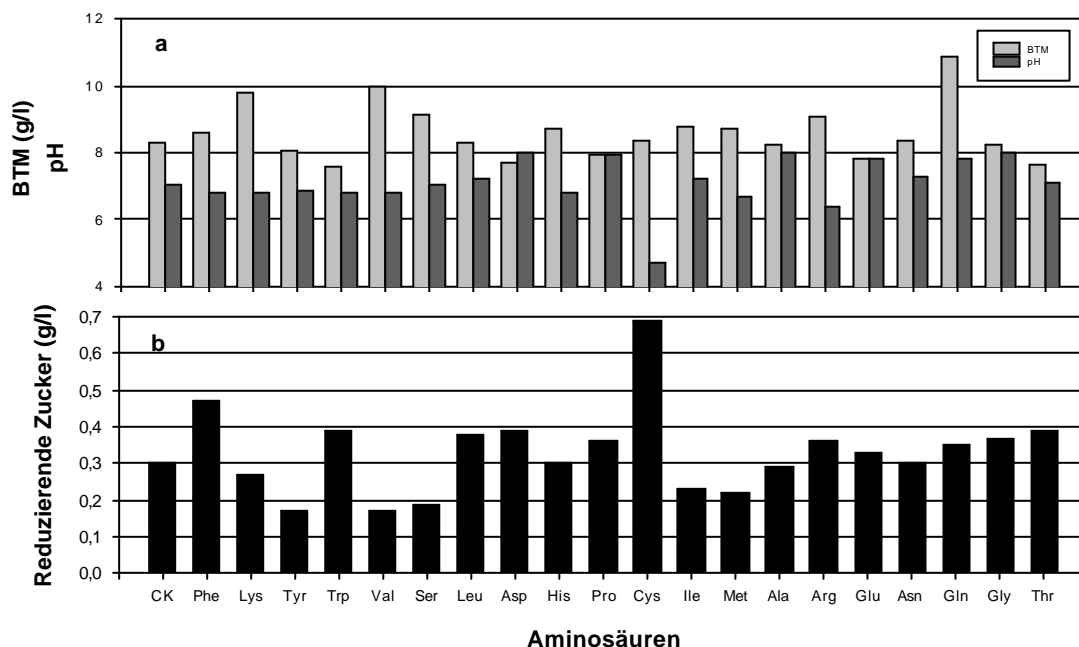


Abb. 4.27: Einfluß verschiedener Aminosäuren auf das Wachstum, den Ende-pH (a) und die reduzierende Zuckerkonzentration am Ende der Kultivierung
Bedingung: pg Medium; 25°C, 100 Upm, 140h, Einsatz der Aminosäure: 0.5 g/l, die Aminosäuren werden am Anfang der Kultivierung zugegeben

Bei Zusatz von Glutamin war die Wachstumssteigerung am größten (Abb. 4.27a). In Abb. 4.28a wurde auch der Endwert des pH aufgetragen.

Beim Zusatz von Cystein wurde am Ende der Kultivierung der geringste pH Wert von 4.5 gemessen; die anderen Werte lagen alle über 6.5. Abb. 4.27b zeigt die Restkonzentration des reduzierenden Zuckers. Bei Cystein lag auch der höchste Zuckerwert.

Der Einfluß der verschiedenen Aminosäuren auf die DQ1 Bildung und das Verhältnis zwischen intra /extrazellulären Produkten werden in Abb. 4.28 a, b dargestellt. Beim Einsatz der Aminosäure Serin ist eine signifikant positive Wirkung auf die DQ1 Bildung zu beobachten. Die Erhöhung der Produktkonzentration des DQ1 entsprach 23% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die anderen Aminosäuren hatten teilweise einen negativen Einfluß auf die Produktbildung. Bei der Zugabe von Isoleutin oder Methionin wurde die Produktivität über 80 % gehemmt; bei Asparaginsäure, Alanin und Asparagin wurde noch eine Produktivitätshemmung von über 50% beobachtet.

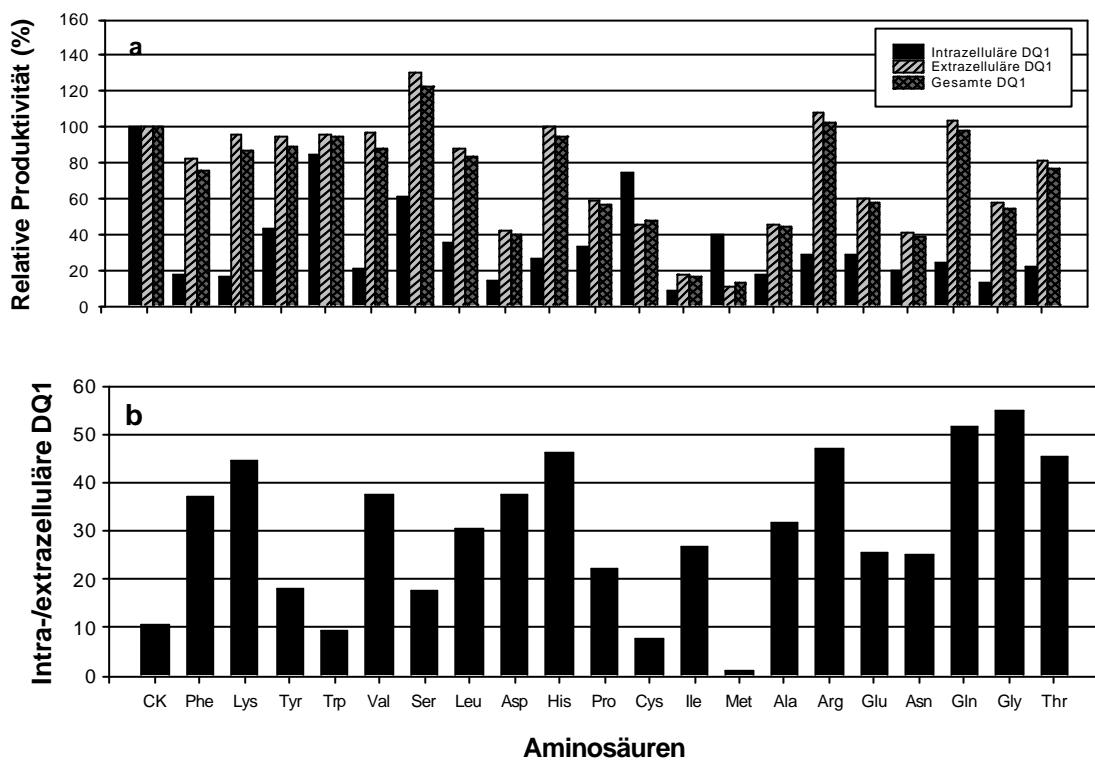


Abb. 4.28: Einfluß von zusätzlichen Aminosäuren auf die DQ1 Produktion (a) und das Verhältnis zwischen intrazellulärer und extrazellulärer DQ1 Bildung (b)
Bedingung: pg Medium; 25 °C, 100 Upm, 140 h, Einsatz der Aminosäure: 0.5 g/l, die Aminosäuren wurden am Anfang der Kultivierung zugegeben

Im Vergleich mit den Kontrollgruppen wurden das Verhältnis von intrazellulärer zu extrazellulärer DQ1 der meisten Gruppen erhöht.

Zu beachten ist, dass sich durch den Zusatz von Aminosäuren das C/N Verhältnis geringfügig verringert.

4.7.4.5.2 Einsatz anderer Stickstoffquellen

Bei der Zugabe der Stickstoffquellen Hefe, Pepton aus Casein, Trypton-Pepton, NH_4Cl , NaNO_3 , Harnstoff sind leichte Veränderungen der BTM zu beobachten, die aber unbedeutend sind (Abb.4.29).

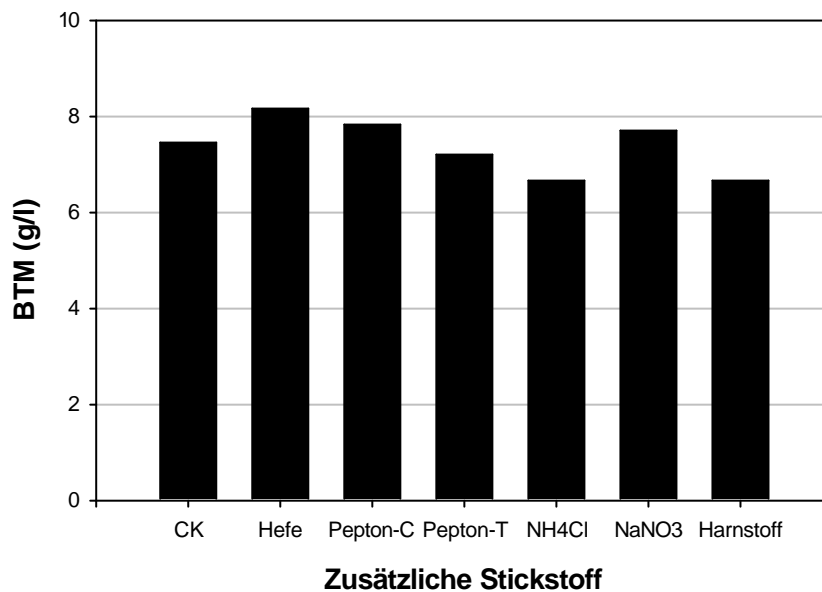


Abb. 4.29: Einfluß verschiedener Stickstoffe auf das Wachstum von H-TW5/869
 Bedingung: 100 ml Schüttelkolben; pg Medium; 25 °C; 100 Upm; 136 h.
 Die Stickstoffe wurden in einer Menge von 0.5 g/l zum Zeitpunkt 0h der Kultivierung zugegeben.

Pepton-C = Pepton aus Casein, Firma Biomatik; Pepton-T = Trypton Pepton, Pankreatisch abgebautes Casein, DIFCO

Auf die DQ1-Produktion ist der Einfluß des zusätzlichen Stickstoffs deutlich, wie in Abb. 4.30 zu erkennen. Vier der sechs Stickstoffquellen wirken sich auf die DQ1-Bildung negativ aus, die Zugabe vom Trypton Pepton zeigt praktisch keine Wirkung für die DQ1-Bildung, während Nitrat eine deutliche Steigerung der DQ1-Produktion erkennen läßt, die in dem gewählten Ansatz etwa 80 % beträgt. Zu beachten ist, dass die Biomassebildung nicht wesentlich beeinflußt war.

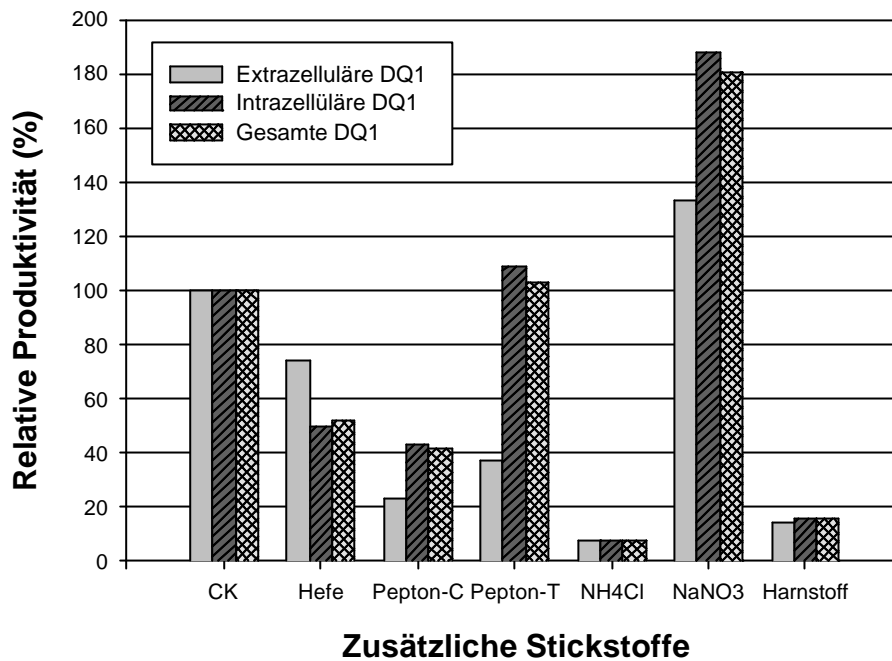


Abb. 4.30: Einfluß verschiedener Stickstoffquellen auf die DQ1 Produktion
Die Bedingungen sind entsprechen Abb. 4.29

4.7.4.6 Einfluß der Konzentration des pg-Mediums und der Mediumzufütterung auf das Wachstum und die DQ1 Bildung

DQ1 wurde hauptsächlich in der Verzögerungsphase synthetisiert (siehe Abb. 4.13). In diesem Zeitraum fällt die Konzentration des reduzierenden Zuckers von 7.3 g/l auf 1.6 g/l. Danach wurde die DQ1-Bildung verlangsamt. Daher sollte ermittelt werden, ob durch eine Erhöhung der Mediumkonzentration oder in der limitierten Phase eine Zufütterung des Mediums eine Steigerung des Wachstums und der DQ1 Produktion ermöglicht.

Abb. 4.31 zeigt, dass eine Erhöhung der Substratkonzentration zu einer Erhöhung der Biomassekonzentration führt, die Ausbeute aber leicht verringert wird.

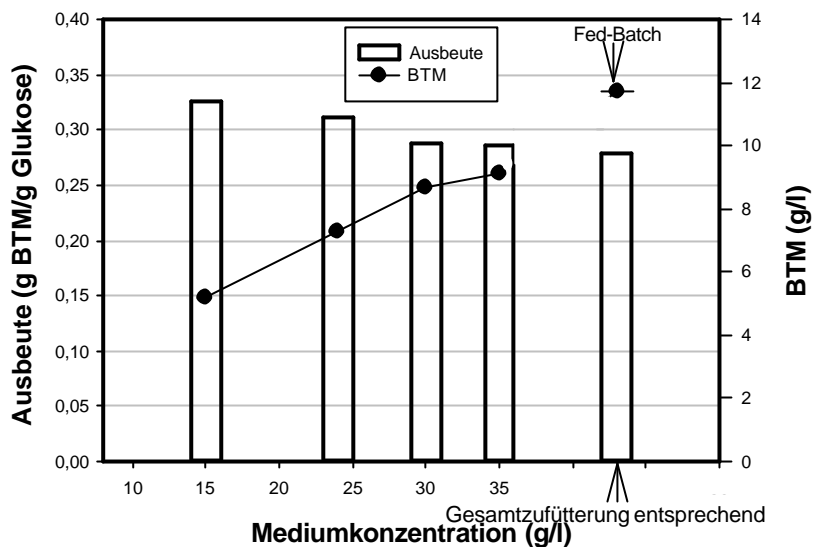


Abb. 4.31: Einfluß der Mediumkonzentration und Fed-Batch auf das Wachstum und die Biomasseausbeute

Bedingungen: Batch Kultur: 100 ml Schüttelkolben; 25 °C; pg Medium; 140 h
 Fed-Batch: 100 ml Batch Kultur, 24 g/l pg Medium; Erste Fütterung nach 67 h, Zufüttermenge : 8 x 0.24 g pg Medium, 25°C; 156 h

Die Zugabe des pg Mediums wurde ab dem Zeitpunkt 67 h chargenweise 8 mal durchgeführt. Die Restglukose wurde während der Zufütterungen unter 6 g/l eingestellt (Abb. 4.32).

In Abb. 4.33 ist die relative Produktivität für die extrazelluläre, die intrazelluläre und die gesamte Produktkonzentration auf die maximale gesamte Produktkonzentration bei 24 g/l Mediumkonzentration bezogen. Außerdem ist die Produktivität als Verhältnis der Produktkonzentration zur Biomassekonzentration, bzw. die Produktausbeute als Verhältnis der Produktbildung zum Substratverbrauch aufgetragen.

Die DQ1-Konzentration stieg bis 24 g/l Anfangs-Konzentration des Mediums an und fiel dann ab, die Produktion ist also gehemmt.

Bei 15 g/l und 24 g/l Mediumkonzentration lag die Produktivität bei 2.55 und 2.54 mg DQ1/g BTM. Wenn die Konzentration des Mediums auf 30 g/l und 35 g/l erhöht wurde, fiel die Produktivität auf 1.81 und 1.50 mg DQ1/g BTM ab.

Durch eine Erhöhung der Mediumkonzentration wuchs der Pilz zwar besser, die Produktbildung und die Produktausbeute wurden aber vermindert.

Durch die Fed-Batch Betriebsweise konnte die DQ1 Produktion um 66% erhöht werden. Die Produktivität erreichte 2.60 mg DQ1/g BTM. Die DQ1-Ausbeute war bei dem Fed-Batch Betrieb 0.77 mg DQ1/g Medium und damit ähnlich wie bei der Kultivierung bei 24 g/l Anfangs-konzentration des Mediums, bei der sie 0.79 mg DQ1/g Medium betrug.

Durch Zufütterung des Mediums in der Verzögerungsphase konnte der Wachstums- und der

DQ1-Bildungsprozeß des Pilzes verlängert werden. Damit erhöht sich die Produktbildung insgesamt.

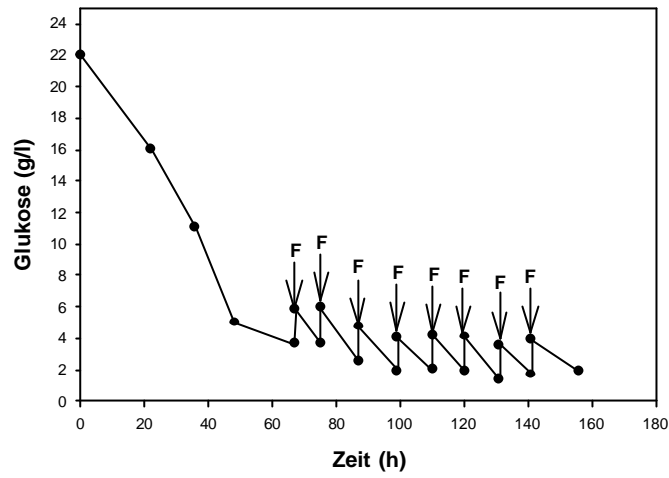


Abb. 4.32: Verlauf der Restglukose bei einer Fed-Batch Kultur
F = Zugabe von pg Medium

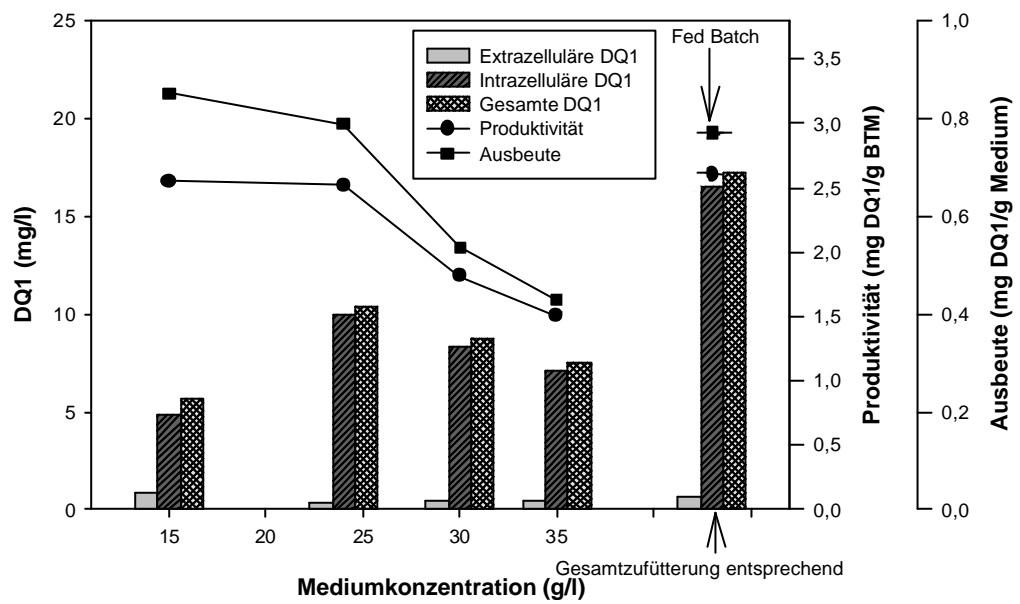


Abb. 4.33: Einfluß der Mediumkonzentration und der Mediumzufütterung auf die DQ1 Produktion
Bedingungen: Vgl. Abb. 4.31

4.7.5 Optimierung der DQ1-Produktion in Schüttelkulturen durch statistische Versuchsplanung (Orthogonale Faktorisierung) (OF)

In der Arbeit wurden einige wichtige Parameter für die DQ1 Produktion optimiert. In diesem Abschnitt wurden die vier Faktoren NaNO_3 , Serin, Anfangs-pH und Mediumkonzentration variiert und mit einer statistischen Methode $L_9 (3^4)$ optimiert. Das Niveau der Faktoren ist in der Tab. 4.9 dargestellt.

Tab. 4.9: Die Niveaus der Faktoren

Niveau	A (NaNO_3 , g/l)	B (Serin, g/l)	C (pH)	D (Mediumkonzentration, g/l)
1	0.1	0.1	5.2	15
2	0.5	0.5	5.5	24
3	1.0	1.0	5.8	30

Aus dem Versuch heraus wurde erkannt, dass die beste Zugabe bei 0.5 g/l NaNO_3 und die Mediumkonzentration bei 24 g/l Medium lag. Der optimale pH ist niedriger als 5.2 und die Zugabe von Serin höher als 1.0 g/l.

Durch die Variation mittels OF Methode wurde die DQ1 Produktion bis zu 21.16 mg/l erhöht.

4.7.6 Optimierung der Belüftung

Für das Wachstum und die Produktbildung eines aeroben Organismus ist eine gute Sauerstoffversorgung notwendig. Die Sauerstofflöslichkeit hängt von der Temperatur, dem Salzgehalt im Medium und dem Druck ab. Durch die Belüftung wird den Mikroorganismen in der Submerskultur ständig Sauerstoff zugeführt.

Die Belüftungsrate im 10 l Bioreaktor wurde für die Produktbildung optimiert (Abb. 4.34). Die beste Belüftungsrate lag bei 0.33 v/vm. Bei niedrigerer Belüftungsrate war die DQ1 Bildung vermindert. Bei höherer Belüftungsrate wurde am Anfang der Kultur eine starke Schaumbildung nachgewiesen. Eine Zugabe von Antischaum zeigte keinen negativen Einfluß auf das Wachstum und die DQ1 Bildung. Beachtet werden muß aber, dass bei der hohen Belüftungsrate Flotationseffekte auftreten und somit ein vertikaler Gradient in der Biomassekonzentration entsteht.

Durch Erhöhen der Drehzahl der Rührung konnte der Sauerstoffeintrag verbessert werden. In der Kultur konnten hauptsächlich nur filamentöse Formen (Mycel) nachgewiesen werden. In der stationären Wachstumsphase waren einige zerstörte Mycelien zu beobachten, die wahrscheinlich von den Scherkräften herrührten und auch einen negativen Einfluß auf die DQ1-Bildung hatten.

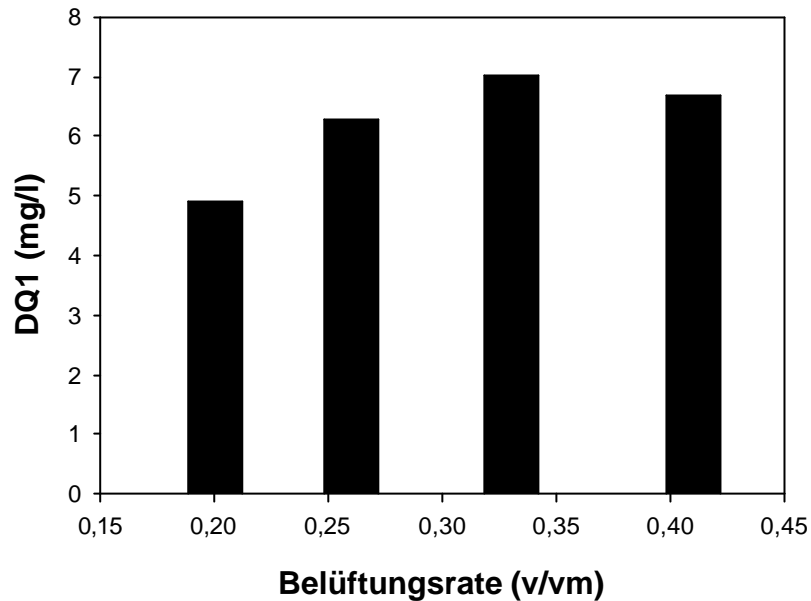


Abb. 4.34: Einfluß der Belüftungsrate auf die DQ1 Produktion
Bedingungen: 10 l Bioreaktor; pg Medium, Seewasseranteil 60%,
25°C, 1 l Vorkultur, 300Upm

4.7.7 Produktion von DQ1 unter optimierten Bedingungen im 10 l Bioreaktor

Nach diesen ersten Optimierungsuntersuchungen wurde der Pilz HTW5/869 in einem 10 l Bioreaktor unter den in Tabelle 4.10 aufgeführten günstigen Bedingungen kultiviert.

Tab. 4.10: Einige optimierte Kultivierungsbedingungen

Medium	Anteil des Seewassers	Belüftungsrate	Zugabe	Temperatur	pH
pg-Medium 24g/l	60%	0.33 v/vm	Serin 1.0g/l; NaNO ₃ 0.5 g/l	25°C	5.2

Der Prozeßverlauf ist in den Abb. 4.35 a-c dargestellt.

Die Biomassekonzentration erreichte 7.53 g/l innerhalb von 96 h und nimmt anschließend ab. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} betrug 0.075 h^{-1} (siehe Abb. 4. 35 c) und die Ausbeute $Y_{x/s}$ war 0.37 g BTM/g Glukose. Nach 72 h war der pH – Wert von 5.2 auf 4.4 abgefallen

und stieg dann auf 7.9 an. Der pO_2 war zu diesem Zeitpunkt auf 38 % gefallen. Die Restglukosekonzentration in der Kultur lag bei 1.14 g/l. Die spezifische Substrataufnahmerate q_s war 0.055 g Glukose/ g BTM/ h. Bei der Abnahme der Biomassekonzentration stieg die Proteinkonzentration noch langsam an. Der Grund hierfür könnte die Zerstörung des Mycels sein. Die Ammoniumkonzentration stieg zum Zeitpunkt 72 auch langsam an, nach 144 h trat eine deutliche Steigerung auf.

Die DQ1 wurde bis Zeitpunkt 96 h schnell gebildet. Nach 96 h hörte die DQ1-Bildung praktisch auf. Die DQ1 Konzentration erreichte 14.50 mg/l. Die spezifische Produktbildungsrate q_p war 0.044 mg DQ1/ g BTM/ h.

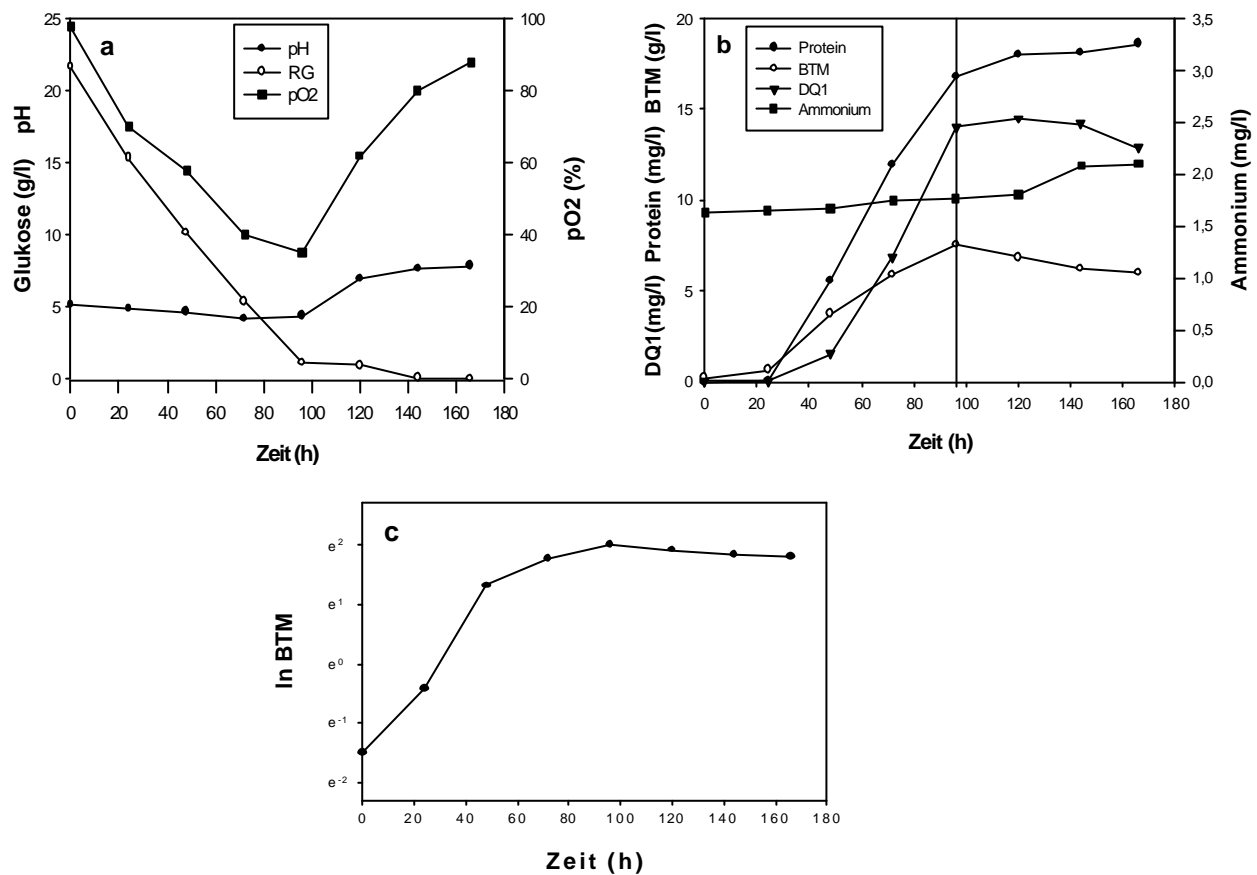


Abb. 4.35: 10 l Fermentation unter den günstigsten Bedingungen

4.7.8 Fed Batch Kultur in einem 10 L Bioreaktor

Mit den vorliegenden Ergebnissen aus den Schüttelkolbenexperimenten und aus dem Batchbetrieb im 10 l Bioreaktor wurden Versuche für den Fed-Batch-Betrieb in 10 l Bioreaktor geplant. Der Stamm H-TW5/869 wurde mit drei verschiedenen Zufütterungsraten kultiviert, die in Tabelle 4.11 angegeben sind. In Abb. 4.36 sind die Biomassekonzentration, die DQ1 Konzentration, der pH-Wert, der pO₂ und die Restglukosekonzentration bei Zufütterungsraten von 2.496 (a) , bzw. 1.488 g/h (b) und 0.504 g/h (c) dargestellt. Die Zufütterungen erfolgten vom Beginn der Fermentation an. Die Pfeile zeigen das Ende der Zufütterung und die zugegebenen Menge Medium an.

Durch die Einstellung der Zufütterungsraten wurde eine niedrige Substratkonzentration vorgegeben und damit das Wachstum von H-TW5/869 limitiert. Die durchschnittlichen Wachstumsraten, die Biomasse- Ausbeuten und DQ1-Ausbeuten sind in der Tabelle 4.11 dargestellt. Die Wachstumsraten waren etwa proportional zur Zufütterungsrate, d. h., es herrschte etwa lineares Wachstum. Bei den beiden hohen Zufütterungsraten war etwa eine lineare Produktbildung zu erkennen. Bei geringerer Zufütterungsrate von 0.504 g/h wurde eine Verstärkung der Produktbildung erreicht (Abb. 4.36 c), die sich auch durch den hohen Wert der Produktausbeute von 0.663 mg DQ1/g Medium ausdrückt.

Tab. 4.11: Das Wachstum, die Biomasse-Ausbeute und die DQ1-Ausbeute bei verschiedenen Zufütterungsraten

Zufütterungsrate (g/h)	Wachstumsrate dx/dt (g/hl)	Y _{x/s} (g BTM/g Medium)	Y _{p/s} (mg DQ1/gMedium)
2.496	0.038	0.191	0.120
1.488	0.036	0.267	0.128
0.504	0.012	0.240	0.663

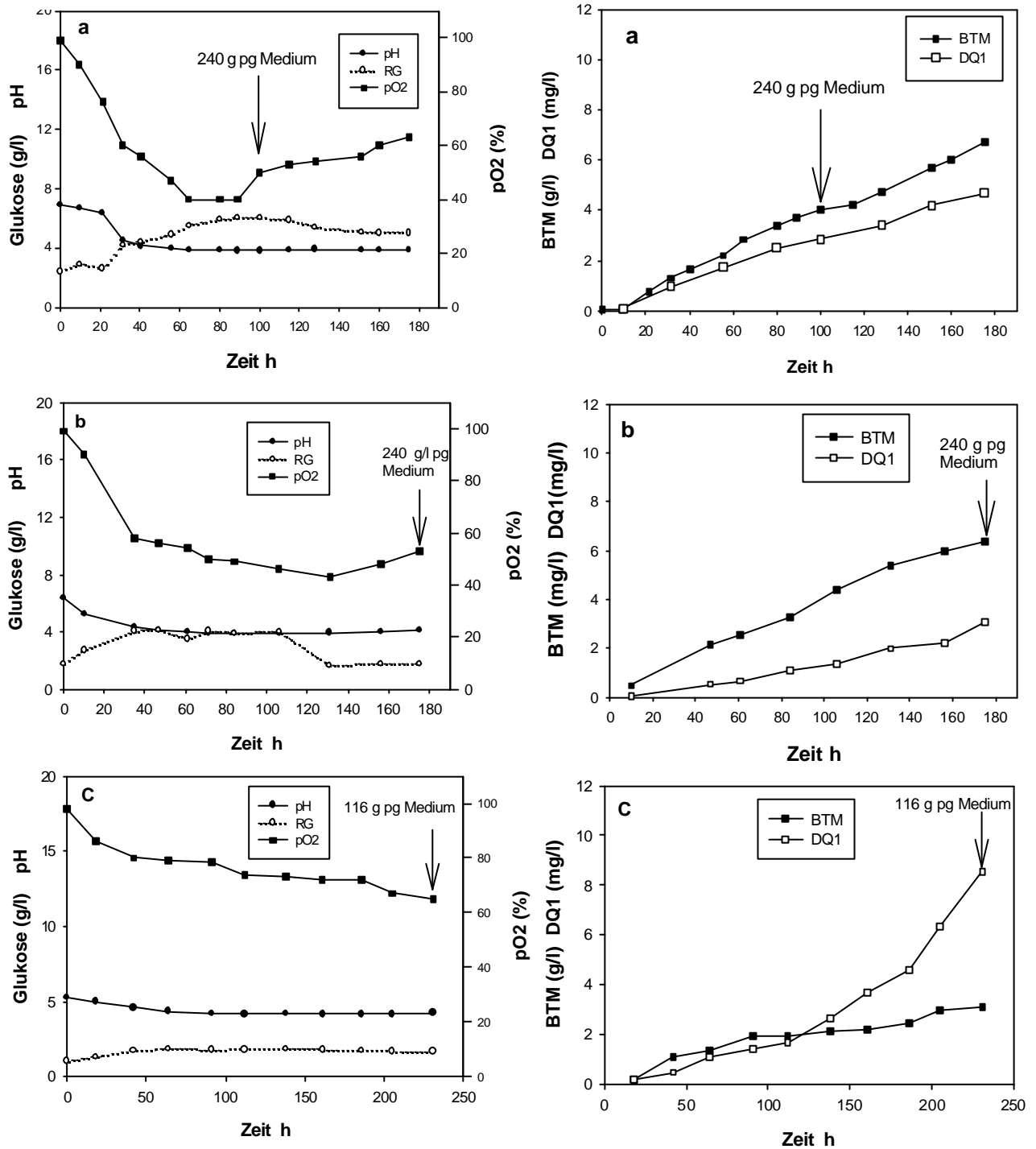


Abb. 4.36: Wachstum und DQ1 Produktion bei der Fed-Batch Fermentation mit verschiedenen Zufütterungsraten

Bedingung: 1 l Vorkultur, 60 h kultiviert; 7 l 60 % Seewasser; pg Mediumkonzentrat: 120 g/l; 25 °C; Belüftungsrate: 0.33 v/vm; Rührung: 300 Upm; Die Zufütterung wurde mit einer kalibrierte Schlauchpumpe durchgeführt. Das bereits zugegebene pg Medium (Trockengewicht) wird in der Abbildung a, b, c markiert, d. h., 240 g pg Medium = 240 g pg Medium bereits zugegeben.

4.8 Feststoffsubstratfermentation (SSF) des marine Pilzisolates H-TW5/869

Das marine Isolat H-TW5/869 (*Penicillium janczewskii*) wurde mit acht verschiedenen Feststoffsubstratzusammensetzungen (siehe Tab. 2. 1) kultiviert. Dabei wurden Substratmengen von 7.5 – 8.0 g eingesetzt und jeweils 2 ml Sporensuspension zugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C. Nach drei Tagen war ein weißes Mycel zu beobachten. Nach fünf Tagen bildeten sich an der Oberfläche des Feststoffbettes Sporen. Nach sieben Tagen wurde die Fermentation abgebrochen und die Produktbildung untersucht.

Die DQ1 Produktion ist in Abb. 4.37 dargestellt. Das beste Ergebnis wurde bei der Zugabe von Sägemehl und Stärke zum Basissubstrat Weizenkleie erzielt, die Zugabe von Algen und Glukose war für die Produktion von DQ1 ungünstig. Die Ausbeute erreicht 0.52 mg DQ1/g Medium.

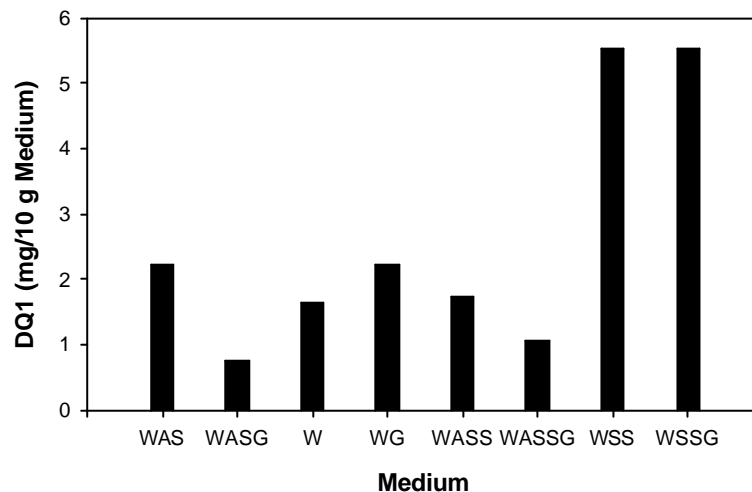


Abb. 4.37: DQ1 Produktion bei Feststofffermentationen mit verschiedenen Medien

In Tabelle 4.12 wird die DQ1-Produktion der Feststoffsubstratfermentation mit der Submersfermentation als Standkultur, Schüttelkultur und im Bioreaktor verglichen. Im Vergleich zur Submersstandkultur kann bei der Feststoffsubstratfermentation mit einer kürzeren Kultivierungszeit gearbeitet werden. Prinzipiell kann in der Feststoffsubstratfermentation auch mit geringerem Volumen gearbeitet werden. Daraus ergeben sich Vorteile für die Fermentation und die Aufarbeitung. Auf eine Rührung wurde verzichtet, die Zugabe der Sporensuspension als Impfkultur ermöglicht ein homogenes Wachstum im gesamten Festbett. Die auf das Volumen bezogene Produktion ist in der

Feststofffermentation am günstigsten, die auf die Mediumsmasse bezogene Produktion war in der Schüttelkultur am günstigsten.

Tab. 4.12: Vergleich der DQ1 Produktion bei verschiedenen Kultivierungsmethoden

Kultivierung	Volumen (l)	Arbeitsvolumen (l)	Kult-Dauer (h)	DQ1 (mg/g M)	DQ1 (mg/l V)
Standkultur	1.8	0.7	336 - 480	0.43	4.05
Bioreaktor	13	10	120 - 140	0.60	11.15
Schüttelkultur	1	0.2	120-160	0.88	4.23
Feststofffermentation	0.1	0.035 (7.5g)	168 - 192	0.52	39.00
	0.5	0.112 (24g)	168 - 192	0.45	21.60

$$DQ1(\text{mg/g M}) = DQ1(\text{mg/g Medium}); DQ1(\text{mg/l V}) = DQ1(\text{mg/l Volumen})$$

Interessante Aspekte ergeben sich aber besonders im Vergleich der Produktion weiterer Sekundärmetabolite, die in den Abb. 4.38 bis Abb. 4.40 dargestellt sind. Für die Produktion von Compactin erwies sich die Weizenkleie–Sägemehl–Stärke-Mischung ebenfalls als die günstigste Zusammensetzung (Abb. 4.38). Es wurde Compactin 47.24 mg in 10g Medium produziert. Bei den Quinolinon–Produktion werden die Substanzen **2** und **3** ebenfalls auf der Weizenkleie–Sägemehl–Stärke (WSS) Mischung am besten produziert, während die Produktion der Substanz **4** neben diesen drei Substraten eine Beimischung von Glukose oder Sägemehl benötigt (Abb. 4.39).

Das Produkt **8** (Abb. 4.40) wurde ebenfalls bei der Zusammensetzung von Weizenkleie–Sägemehl–Stärke am besten produziert. Eine Zugabe von Glukose erhöht die Produktivität der Substanz **6** wenig.

Dagegen wird die Substanz **5** besser in den Kombinationen Weizenkleie-Algen–Stärke und Glukose produziert (Abb. 4.40)

Das Sägemehl dient als C-Quelle (siehe 4.2, das Isolat kann auf Cellulose und Xylan wachsen), aber auch als lockeres Füllungsmaterial, damit die Luft besser durchgelassen und damit auch die Wärme ausgetragen werden kann. Die Wärmerbildung und die Energieaustausch sind wesentliche Probleme bei der Feststoffkultur.

Allgemein ist das Medium WSS günstig für die Sekundärmetabolitbildung des Pilzisolats H-TW5/869.

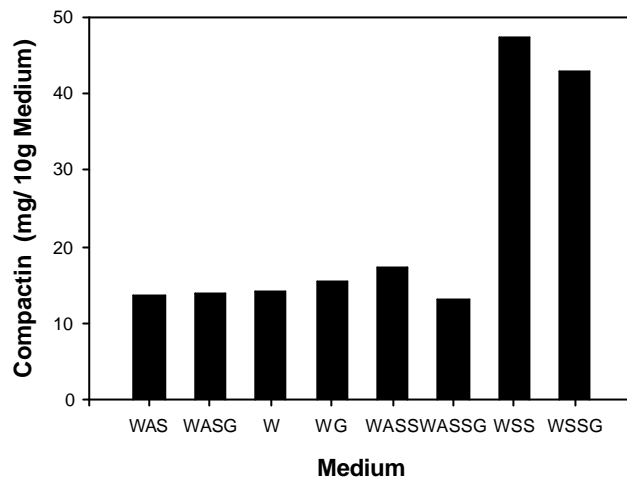


Abb. 4.38: Compactin Produktion bei Feststofffermentation mit verschiedenen Medien

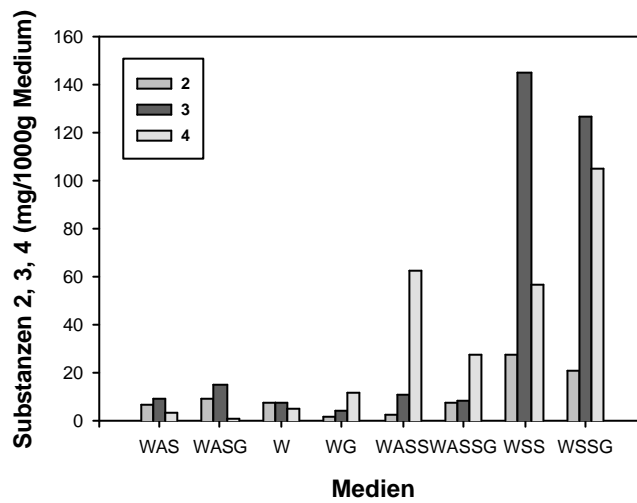


Abb. 4.39: Produktion der Substanzen **2**, **3**, **4** bei Feststofffermentation mit verschiedenen Medien
2 = DQ2; **3** = DQ3; **4** = DQ4

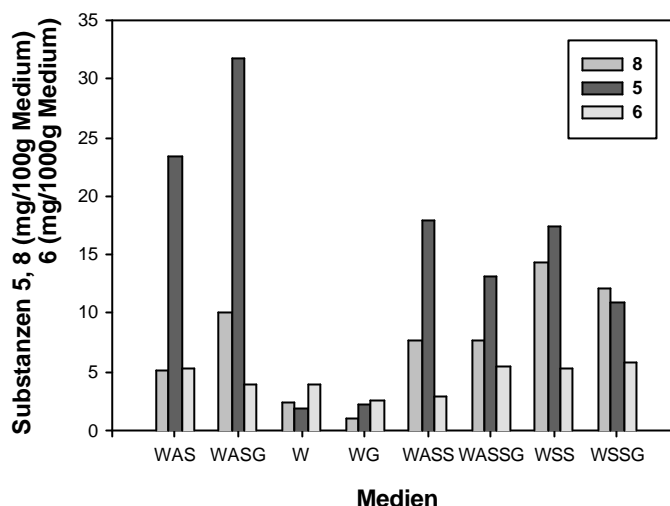
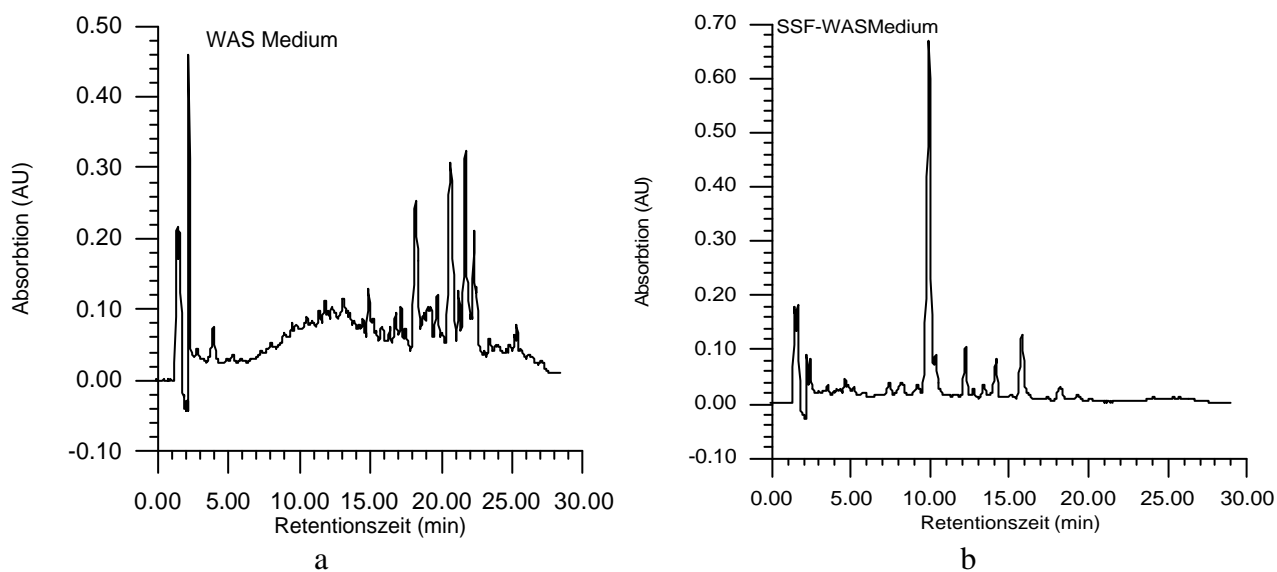


Abb. 4.40: Produktion der Substanzen **5**, **6**, **8** bei Feststofffermentation mit verschiedenen Medien

5 = 1,3,6-Trihydroxy-8-methylxanthon; **6** = 2,4',6-Trihydroxy-2",4-dimethoxy-6-methylenphenon; **8** = 5",6"-Dehydro-Griseofulvin.

Für die Feststoffsubstratfermentation muß eine spezielle Aufarbeitung entwickelt werden. In dieser Arbeit konnte die Kultur wie die Biomasse aus der Flüssigkultur behandelt werden. Durch die Feststoff-Extraktion können die meisten Zucker und Fettsäuren getrennt werden. In der Feststoffsubstratfermentation selbst wurden die meisten kleinen Moleküle des Mediums umgesetzt, wie aus einem Vergleich der HPLC Chromatogramme des unbehandelten Substrats (links) und des fermentierten Substrats (rechts) gezeigt wird (Abb. 4.41 a-h).



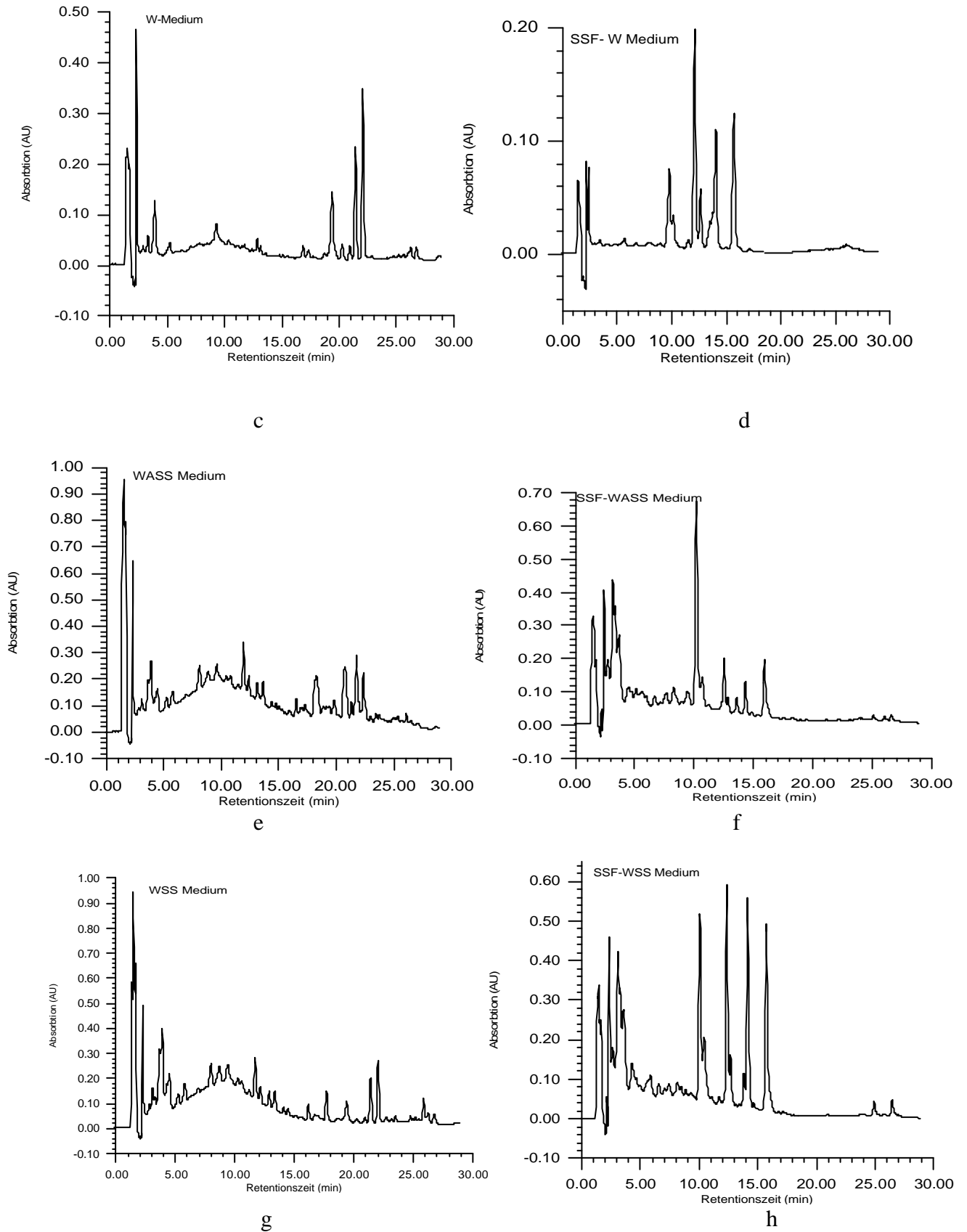


Abb. 4.41: Darstellung der HPLC Chromatogramme der Extrakte der Feststoffmedien und der Feststoffkultur (bei 254 nm)

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Marine Pilze, eine gute Ressource für neue Naturstoffe

Es ist bekannt, daß die marinen Pilze im Stoffkreislauf des Meeresökosystems eine wichtige Rolle spielen (Moss, 1986). Die Erforschung mariner Pilze ist bisher stark an der Ökologie orientiert. Als eine Quelle für neue Naturstoffe sind marine Pilze bislang wenig erschlossen. Während aus terrestrischen Arten eine Vielzahl von niedermolekularen Inhaltsstoffen, die sich aus dem Sekundärstoffwechsel ableiten, beschrieben ist, liegt diese Zahl für marine Pilze bei etwa 235 neuen Verbindungen. Die wenigen bekannt gewordenen Ergebnisse lassen jedoch eine ähnliche Strukturvielfalt wie für terrestrische Pilze erwarten (Grabley, Statusseminar, Marine Naturstoffforschung, 1999).

Die Naturstoffe aus marinen Pilzen zeigen nicht nur interessante chemische Strukturen, sondern auch wichtige biologische Wirkungen: z. B. besitzen die meisten in der Tabelle 1.1 dargestellten neuen Naturstoffe aus marinen Isolaten *Penicillium* sp. cytotoxische Wirkungen, die ebenfalls bei dem Screening in unserem Verbundprojekt getestet wurden (siehe 3.4). Die marinen Pilze sind auch gute Produzenten für Antibiotika (siehe 3.3, Christophersen et al., 1999, Khudyakova et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe von Pietra kultivierte 1500 marine Pilze und 1450 terrestrische Pilze, um ihre antimikrobiologischen Aktivitäten zu vergleichen. Die Anzahl der antimikrobiologisch aktiven Isolate von den marinen Pilzen war ca. 1.5 fach höher als von den terrestrischen. Von diesen terrestrischen Isolaten wurden drei neue Substanzen gewonnen, dagegen 14 aus marinen Isolaten (Cuomo et al., 1995). Die Chance war nach dem Ergebnis von Pietra also ca. 5 fach höher, neue Naturstoffe aus marinen Pilzen zu finden als aus terrestrischen.

Die Arbeit der Arbeitsgruppe Pietra zeigt, daß die Wahrscheinlichkeit, neue Naturstoffe aus marinen Pilzen zu finden, bezogen auf die gesamte Zahl der Isolate nur etwa 1% war. Sie hatten durch ein antimikrobiologisches Screening 24 aktive Isolate ausgewählt und damit 14 neue Substanzen gewonnen. In unserem Projekt wurden 662 Pilzisolat zur Verfügung gestellt (siehe 3.2). Durch ein chemisches und biologisches Screening wurden hiervon 25 Isolate (bis Dez. 2001) für eine Kultivierung im größeren Maßstab (bis 50 l) ausgewählt. Aus den bisher 21 bearbeiteten Kulturen wurden 20 neue Substanzen entdeckt, d. h. im Durchschnitt ein neues Molekül pro ausgewähltem Isolat, d. h. auf die Gesamtzahl der Isolate bezogen schon 3 %.

Marine Pilze sind gute Produzenten für Naturstoffe. Es fehlt bis heute eine systematische

biologische und biotechnologische Untersuchung. Dies betrifft nicht nur obligat marine Pilze, sondern auch solche „marinen Isolate“ wie *Penicillium* sp. oder *Aspergillus* sp., die schon an die Meeresbedingungen angepaßt sind. Sie können besser unter den Meeresbedingungen wachsen und bestimmte Sekundärmetabolite in hohen Konzentration bilden. Nach unseren Erfahrungen sind auch solche Pilze interessant für die Naturstoffsuche.

Es sind neue Entwicklungen der Isolierungs- und Kultivierungsmethoden erforderlich.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Habitat der marinen Pilze und ihrer Wirkstoffbildung ist sinnvoll. In dem Verbundprojekt wurde festgestellt, daß die Isolate aus den komplexen Biogemeinschaften (siehe 3.3) und aus kalten Wasserzonen (siehe 3.5) besonders gut antimikrobielle Substanzen oder auch neue Naturstoffe produzieren konnten. Solche Untersuchungen sollten weiter durchgeführt werden.

5.2 Vergleich des marine Isolates *Penicillium janczewskii* (H-TW5/869) und des terrestrischen Stammes *Penicillium janczewskii* (DSM 847)

In der Fragestellung dieses Abschnitts wurden die Substratverwertung, das *Phoma* Pattern, und die Sekundärmetabolite und ihre metabolische Produktion von einem marinen Isolat (H-TW5/869) und einem terrestrischen Stamm DSM (847) der gleichen Art untersucht und verglichen.

5.2.1 Substratverwertung

Beide Pilzisolat wurden auf Agarplatten mit 34 verschiedenen C-Quellen kultiviert, die in Tabelle 4.3 aufgelistet sind.

Pilze sind wichtige Abbauer für Polysaccharide im Ökosystem (Ahearn & Crow, 1986; Austin, 1988). Die meisten eingesetzten Polysaccharide kommen sowohl auf dem Land wie auch im Meer vor. Cellulose und Xylan sind die wichtigsten Bestandteile der Polysaccharide in der Zellwand der Landpflanzen. Sie werden auch in Algen und natürlich auch im treibenden Holz im Meer gefunden. Stärke und Saccharose werden von den terrestrischen Pflanzen und auch den Grünalgen gebildet. Chitin ist ein Polysaccharid von Krebs-, Krabben- und Insektenschalen und auch in der Pilzzellwand selbst. Inulin ist ein Oligosaccharid. Aber Carrageenan, Alginsäure, Fucoidan sind typische Algenpolysaccharide, von ihnen konnte eine bessere Verwertung von marinen Pilzen gegenüber terrestrischen erwartet werden.

Sowohl das marine Isolat wie auch das terrestrische Isolat konnten auf allen zugegebenen

Polysacchariden und Oligosacchariden wachsen. Aber das terrestrische Isolat DSM 847 wächst besser auf Cellulose, Xylan und Inulin und das marine Isolat H-TW5/869 besser auf den Polysacchariden wie Carrageenan und Alginat. Es könnte sich um eine Anpassung an die Umgebungsbedingung der Öko-Nische handeln. Aber das terrestrische Isolat kann ebenfalls auf Carrageenan, Fucoidan und Alginat wachsen, d.h., daß das terrestrische Isolat DSM 847 entsprechende Enzyme bilden kann, um diese Polysaccharide abzubauen. Es ist noch nicht bekannt, ob viele terrestrische Pilze diese Fähigkeit haben, ob es also allgemein gültig ist.

Stärke wird im Vergleich mit Cellulose und anderen Polysacchariden von Pilzen leichter abgebaut. Die anderen Saccharide und Polyol sind ebenfalls gute C-Quellen für Pilze. Das Isolat H-TW5/869 wächst auf diesen C-Quellen auch besser als DSM 847. Weil der Versuch mit solchen leicht verwertbaren C-Quellen im Seewasser durchgeführt wurde, hat das marine Isolat allerdings einen Vorteil.

Das marine Isolat H-TW5/869 kann die organischen Säuren (Natriumsalz) nicht so gut verwerten wie DSM 847. Aber H-TW5/869 kann auf Na-Propionat nicht wachsen. Dem Isolat könnte das entsprechende Enzym fehlen, um Na-Propionat abzubauen.

Bei diesen zwei Isolaten gleicher Gattung und Art zeigt das marine Isolat eine deutliche Anpassung an die marinen Lebensbedingungen, die Physiologie des marinen Isolates unterscheidet sich von dem terrestrischen *Penicillium janczewskii*.

5.2.2 *Phoma*-Pattern

Die durch das *Phoma*-Pattern beschriebene Temperatur-Abhängigkeit der Salinitätstoleranz wurde zuerst von Ritchie (1957) bei *Phoma* sp. gefunden, anschließend aber bei vielen aus dem Meer- und Brackwasser isolierten Pilzen nachgewiesen, z. B. *Asteromyces cruciatus*, *Aureobasidium pullulans*, *Curvularia* sp., *Dendryphiella salina*, *Digitatispora marina*, *Halocyphina villosa*, *Lignincola laevis*, *Lulworthia* sp., *Nia vibrissa*, *Pestalotia* sp., *Robillarda rhizophorae*, *Zalerrion maritimum* (Lorenz & Molitoris, 1992). Außer bei obligat marinen Pilzen wurde das *Phoma* -Pattern auch bei marinen Isolaten wie *Gliomastix murorum* und *Penicillium corylophilum* (Dunn et al., 1983) beobachtet. Lorenz hat vermutet, daß das *Phoma*-Pattern allgemein für marine Pilze, insbesondere für Subtropikal-Tropikal und Intertidal Pilzarten gültig ist. Es gibt bisher noch keine Erklärung des *Phoma*-Patterns. Hierzu sind weitere Untersuchung nötig. Interessant wäre auch zu untersuchen, ob die *Phoma*-Bedingungen (siehe 4.3) auch die Produktionsbedingungen beeinflussen.

Die in dieser Arbeit verwendeten marinen Pilze *Asteromyces cruciatus* TM 76 und

Penicillium janczewskii H-TW5/869 wurden aus dem Gewässer um Helgoland isoliert. Der Pilz *Asteromyces cruciatus* TM 76 gehört zu den obligat marinen Pilzen, Schaumann (1974) und Lorenz (1992) haben ebenfalls bei zwei anderen Isolaten von *Asteromyces cruciatus* die Abhängigkeit des *Phoma*-Patterns nachgewiesen. Das *Phoma*-Pattern der Art *Penicillium janczewskii* ist zum erstenmal untersucht. Das marine Isolat und das terrestrische Isolat zeigten unterschiedliche Abhängigkeiten im *Phoma*-Pattern. Ob das Phänomen als ein entscheidender Faktor zwischen marinen und terrestrischen Pilzen angesehen werden kann, ist nicht gesichert, da es bisher keine systematische Untersuchung des *Phoma*-Patterns für terrestrische Pilze gibt.

5.2.3 Vergleich der sekundären Metabolite von dem terrestrischen *Penicillium janczewskii* (DSM 847) und dem marinen *Penicillium janczewskii* (H-TW5/869)

Es ist zu beobachten, daß der marine Pilz *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 in den Meeresbedingungen besser wächst als der terrestrische Stamm *Penicillium janczewskii* DSM 847. Aber die Untersuchungen mit der DC- und DAD-HPLC-Analyse (Bedingungen: siehe 2.8.15, Wellenlänge: 220, 254, 303, 365nm) weisen darauf hin, daß die zwei *Penicillium janczewskii* ein ähnliches Produktmuster besitzen. Die meisten aus H-TW5/869 isolierten Sekundärmetabolite konnten auch im DSM 847 nachgewiesen werden (siehe Tab. 4.6). Allerdings sind die Mengen unterschiedlich, z. B. ist die Produktivität von DQ1 bei H-TW5/869 1000 fach höher als die von DSM 847. Einige unterschiedliche Sekundärmetabolite konnten nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.9). Wie Abb. 4.9 auch zeigt, sind die in großen Mengen synthetisierten Produkte unterschiedlich.

Bei Sekundärmetaboliten von Mikroorganismen handelt es sich um eine Spezifität des Vorkommens, einige Gattungen scheinen gute Produzenten zu sein (Piepersberg & Zeek, 1993).

Bei unserem Vergleich des terrestrischen und marinen Stammes wurde es bestätigt. Aber es wurden in den Chromatogrammen Unterschiede in der Produktivität deutlich. Dabei ist auch, wie bei Sekundärmetaboliten bekannt, eine große Variation innerhalb von chemischen Gruppen zu erkennen.

5.3 Gruppen der Sekundärmetabolite des Pilzisolates H-TW5/869

Im Vergleich mit der Literatur wurde festgestellt, daß die meisten in diesem Projekt isolierten Substanzen aus dem Isolat H-TW5/869 auch in der Gattung *Penicillium* der terrestrischen

Pilze nachgewiesen werden konnten. Durch die Charakterisierung der Sekundärmetabolite konnte der Sekundärmetabolismus des Stammes H-TW5/869 in vier Zweige eingeteilt werden.

1. Fettsäure-Ester und Fettsäure

Die Fettsäure ist der Hauptanteil im Rückstand der Aufarbeitung. Der Sekundärstoffwechsel ist über CH_3COSCoA mit dem Primärstoffwechsel gekoppelt. Bei guten Wachstumsbedingungen wurden im Überstand mehrere Fettsäuren nachgewiesen.

2. Alkaloide – Substanzen **1, 2, 3, 4**

Vier Alkaloide wurden isoliert, deren Grundstrukturen identisch sind. Sie werden den Quinolinonen zugeordnet. Die Quinolinone (**1-4**) wurden von der Gattung *Penicillium* (*Penicillium sp.* (NTC-47) und *Penicillium cf. simplicissimum* und *Penicillium janczewskii* H-TW5/869) gefunden. Der Stoffwechsel der Sekundärmetabolite ist mit Aminosäuren gekoppelt. Kusano et al. (2000) hat einen Stoffwechselweg mit den Bausteinen Anthranilsäure, Methionin, Tyrosin oder Phenylalanin vorgeschlagen. Diese Hypothese wurde von uns untersucht und wird in 5.4 diskutiert.

3. Substanzen **5, 6, 7, 8, 9**

Die Moleküle der Substanzen **5, 6, 7, 8, 9** zeigen ebenfalls ähnliche Grundstrukturen. Alle Substanzen bestehen aus zwei Benzolringen. Dazwischen gibt es eine C=O Gruppe. Die Substanz **7** ist ein Derivat der Substanz **8**. Die Substanz **6** ist ein Derivat von **9**. Es ist bekannt, daß **5** und **9** Zwischenprodukte der Biosynthese von **7** sind (Datenbank: NPD on CD-ROM, Version 9:2, 1982-2001 Chapman Halle/CRC). So wird festgestellt, daß die Sekundärmetaboliten **5, 6, 7, 8, 9** einen gemeinsamen Stoffwechselweg besitzen.

Eine Besonderheit ist, daß **7** und **8** Cl Atome besitzen.

Alle Sekundärmetabolite dieser Gruppe können von der Gattung *Penicillium* biosynthetisiert werden. Die Substanz **5** kann auch von *Lecanora reuteri* hergestellt werden, die Substanz **7** auch von Pflanzen (Venkata Dasu et al, 1999).

4. Substanz **10**

Im Vergleich mit den Molekülstrukturen der anderen Sekundärmetabolite wird vermutet, daß die Substanz **10** einen eigenen Stoffwechselweg besitzt. Sie kann auch von dem terrestrischen Pilz *Penicillium brevicompactum* hergestellt werden.

Der Stamm H-TW5/869 produziert weitere Substanzen, die wegen zu kleiner Mengen bisher nicht isoliert wurden.

5.4 Einfluß von Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin auf die DQ1 Bildung

Nach einer Hypothese von Kusano et al. (2000) wird die Dihydroquinolinon-Gruppe aus Bausteinen von Anthranilsäure, Methionin und Tyrosin (oder Phenylalanin) biosynthetisiert. Durch die Zugabe von Anthranilsäure konnte die Produktivität von DQ1 signifikant erhöht werden. Das könnte ein erster experimenteller Nachweis sein, daß Anthranilsäure als Baustein für die Produktion von DQ1 dient. Aber es ist auch zu beobachten, daß der Zugabezeitpunkt von Anthranilsäure, der die DQ1-Bildung (Abb. 4.7) und auch die Bildung der anderen Sekundärmetabolite beeinflusst (Abb.5.1), richtig gewählt werden muß.

Bei der Zugabe der Anthranilsäure zum Zeitpunkt 67 h wurde noch eine weitere intrazelluläre Substanz **14** (eine bisher nicht aufgeklärte Struktur) in relativ großer Menge gebildet. Der Sekundärstoffwechsel ist ein komplizierter Prozeß. Die Zusammensetzung der Enzyme und der intermediären Metabolite wird bei verschiedenen Zeitpunkten in den Zellen und im Medium unterschiedlich sein. Wenn die Anthranilsäure zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung zugegeben wird, wird sie unterschiedlich am Stoffwechsel teilnehmen, das kann die Endprodukte beeinflussen.

In 5.3 sind die Sekundärmetabolite von H-TW5/869 in vier Gruppen eingeteilt. Interessant ist, daß die Zugabe von Anthranilsäure bei drei Gruppen einen Einfluß auf die Produktbildung hat. Es kann vermutet werden, daß es zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen gegenseitige Einflüsse gibt.

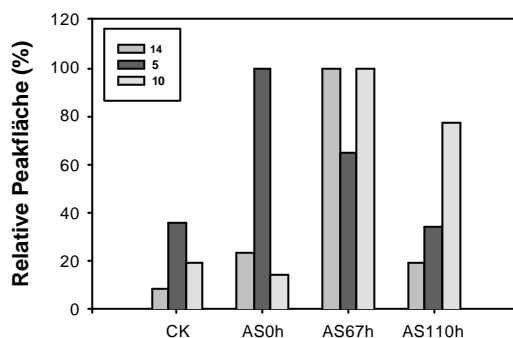


Abb. 5.1: Einfluß des Zugabeszeitpunkt von Anthranilsäure auf die Bildung weiterer Sekundärmetabolite

14: eine unbekannte Substanz; Die Bedingungen sind wie in Abb. 4.7

Die Zugabe der Aminosäuren Methionin und Tyrosin zeigte keine positive Wirkung auf die DQ1-Bildung. Es könnte sein, daß die Aminosäuren direkt vom Pilz als C-Quelle und N-Quelle verwendet werden, bevor sie in den Stoffwechsel zur DQ1-Bildung gelangen.

5.5 Prozeßgrößen für das Wachstum und die DQ1 Bildung

Es gibt wenig Literatur (Curran, 1980; Philomena & Curran, 1980; Tsai et al., 1997; Abbanat et al., 1998; Helmholz, 1999) über die Optimierung der Sekundärmetabolitproduktion mit marinen Pilzen.

Mediumzusammensetzungen

Zur Untersuchung günstiger Produktionsbedingungen wurde der Pilz H-TW5/869 mit verschiedenen Medien kultiviert und die DQ1-Produktion verglichen. Das pg-Medium ist für die Produktbildung bezogen auf das Volumen am besten. Wenn die Produktion auf die BTM bezogen wird, dann ist das S-Medium besser (Abb. 4.11 und Abb. 5.2). Dieses Medium ist also ebenfalls für eine Optimierung der DQ1-Bildung interessant.

Durch Änderungen der Medien können auch neue Substanzen gewonnen werden. Von der Kultur des Pilzes *Penicillium* sp. wurden zwei neue Alkaloide Communenesins A und B isoliert (Numata et al., 1993). Takahashi et al. (1996) hat den gleichen Stamm in verschiedenen Medien kultiviert und vier neue Substanzen (Penostatins A-D) gewonnen.

Mit der DAD-HPLC Analyse (Bedingungen siehe 2.8.15, Wellenlänge: 220, 254, 303, 365 nm) wurde beobachtet, daß das Isolat *Penicillium janczewskii* H-TW5/869 bei verschiedenen Medien ähnliche Produktmuster bildet. In der Kultur mit dem Medium ME konnten 2 ungewöhnliche kleine Peaks nachgewiesen werden, mit dem Medium AB ein neuer Peak.

Die Medien beeinflussen hauptsächlich das Verhältnis der Menge der Sekundärmetabolite. Das könnte auch ein Grund sein, warum in anderen Fällen vom gleichen Stamm bei den Kultivierungen mit verschiedenen Medien unterschiedliche Naturstoffe isoliert werden.

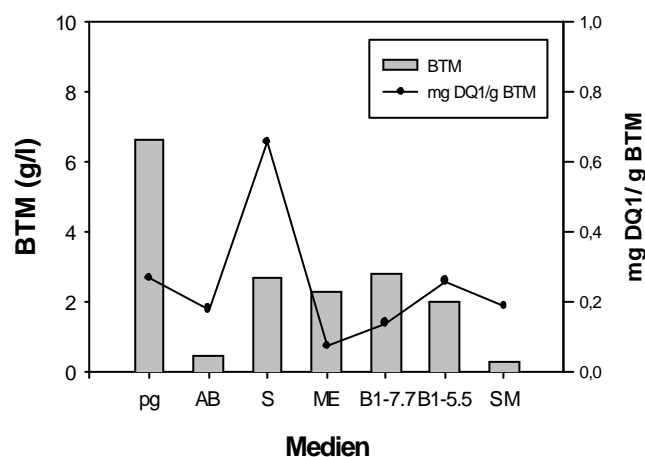


Abb. 5. 2: Produktivität von DQ1 mit verschiedenen Medien

Salinität

Es ist bekannt, daß die Salinität den primären Stoffwechsel mariner Mikroorganismen beeinflusst, insbesondere die Polyolbildung. Zum Beispiel sind bei verschiedenen Salinitäten die Zusammensetzung des gesamten Polyols bei marinen Pilzen *Dendryphiella salina* (Wethered et al., 1985, Clipson et al., 1992) unterschiedlich. Im Leitungswasser bildet der Pilz Mannitol und Arabitol im Mycel. Bei der Erhöhung der Salinität wird Glycerol gebildet. Außerdem beeinflussen auch die Ionen (z. B. Mg^{2+}) die Polyolbildung. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß die Salinität sowohl Einfluß auf das Wachstum vom *Penicillium janczewskii* (H-TW5/869) als Einfluß auf die Sekundärmetabolitbildung hat. Allerdings erfordert die Bildung verschiedener Sekundärmetabolite unterschiedliche optimale Salinitäten (siehe Tab. 4.7), was möglicherweise auf den Einfluß aus dem Primärstoffwechsel zurückzuführen ist.

Die Wachstumstendenzen vom H-TW5/869 im Seewasser verschiedener Salinität sind für die Standkultur und Schüttelkultur anders als für die Agarplattenkultur. Es könnte sich um unterschiedliche Wachstumskinetiken handeln.

Der Pilz H-TW5/869 wächst im 100% Seewasseranteil am besten, aber die besten Seewasseranteile für die DQ1-Bildung liegen bei 60% (Schüttelkultur) und 80% (Standkultur), d. h. die optimalen Salinitäten für das Wachstum und die DQ1-Bildung sind unterschiedlich.

pH

Der Pilz H-TW5/869 wächst bei einem pH 7.0-7.5 am besten. Das ist auch der pH-Wert am Fundort des Pilzisolates, also im neutralen, geringfügig basischen Bereich. Andererseits ist das Meer auch ein großes Puffersystem. Wenn der Pilz beispielsweise Säure gebildet hat, wird die Säure im Seewasser sofort stark verdünnt und der pH bleibt im neutralen Bereich. Bei der Kultivierung von H-TW5/869 in der Submerskultur wird eine starke Senkung des pH-Wertes beobachtet. Es ist nicht bekannt, ob die Änderung des pH-Wertes einen Einfluß auf die Bildung der Sekundärmetabolite hat. Eine genauere Untersuchung der Abhängigkeit der Naturstoffbildung der marinen Pilze vom pH durch eine pH-Regelung im Bioreaktor ist noch vorgesehen.

Der optimale Anfangs-pH für die DQ1-Bildung lag bei 5.5, er ist niedriger als der optimale pH für das Wachstum.

Zugabe von Serin und $NaNO_3$

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß Zugaben von Serin und Natriumnitrat positiv für die DQ1-Bildung und für das Wachstum sind. Bei der Zugabe von Serin wurde die BTM und die DQ1-Bildung um 10% bzw. 26% erhöht. Bei der Zugabe von Natriumnitrat wurde die BTM-Bildung gering aber die DQ1-Bildung um 80% erhöht. Es ist zu beobachten, daß bei Zugabe von Serin und Natriumnitrat die Erhöhung der DQ1-Bildung größer als die Erhöhung der Biomasse-Bildung ist. Es wird vermutet, daß die Zugaben von Serin und Natriumnitrat günstig für die entsprechenden Enzyme für die DQ1-Bildung sind.

Mediumkonzentration

Die beste Mediumkonzentration (pg-Medium in g/l) für die DQ1-Bildung lag bei 24 g/l. Durch eine Erhöhung der Mediumkonzentration konnte das Wachstum verbessert werden, aber die DQ1-Produktivität (mg DQ1/g BTM) vom Pilz HTW5/869 wurde verringert. Ein verbessertes Wachstum ist ungünstig für die DQ1-Bildung.

Belüftung

Die beste Belüftungsrate für die DQ1-Bildung lag bei 0.33 v/vm. Es war zu beobachten, daß bei einer starken Belüftung an der Oberfläche ein dicker Biofilm gebildet wird und teilweise an der Wand des Bioreaktors haftet. Zur Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks ist es auch sinnvoll, die Rührerdrehzahl zu erhöhen. Aber eine erhöhte Scherkraft kann für den Pilz ungünstig sein. Menge et al. (2001) hat Perfluorocarbone bei der *Claviceps* Fermentation eingesetzt und die Produktion der Total- Alkaloide (Ergot Peptide Alkaloide) fünffach erhöht. Als ein Sauerstoffträger können Perfluorocarbone bzw. Hydrocarbone die Sauerstofflöslichkeit verbessern.

Ergebnis der Optimierung der Prozeßgrößen

Die Optimierung wurde für die DQ1-Bildung durchgeführt. Durch die Optimierung in der Schüttelkultur wurde die DQ1-Bildung von 6.7 mg/l auf 21.16 mg/l, in der Bioreaktorkultur von 7.33 mg/l auf 14.50 mg/l erhöht. In der Arbeit wurden zuerst mehrere Prozeßgrößen einzeln und danach mit einer statistischen Methode vier Prozeßgrößen gleichzeitig optimiert. Es ist zu beobachten, daß der Pilz im Bioreaktor einen starken Biofilm bildet. Es ist ein großes Problem für die Kultivierung des marinen Pilzes. Solche Probleme zeigten sich auch bei den Schüttelkulturen. Dadurch entstehen Abweichungen für die Ermittlung der BTM und der DQ1-Konzentration.

In der Tabelle 5.1 sind einige Prozeßgrößen nach der Optimierung der DQ1-Produktion in Schüttelkolben und im 10 l - Bioreaktor zusammengestellt.

Tab. 5.1: Übersicht der Optimierungsergebnisse

	Schüttelkolben	Schüttelkolben (optimiert)	Bioreaktor	Bioreaktor (optimiert)
BTM (g/l)	7.24	7.89	6.80	7.53
m (h ⁻¹)	0.073	-	0.083	0.075
Ausbeute (g BTM/g Glukose)	-	-	0.35	0.37
q_p (mg DQ1/g BTM/h)	-	-	0.031	0.044
DQ1 (mg/l)	6.70	21.16	7.33	14.50

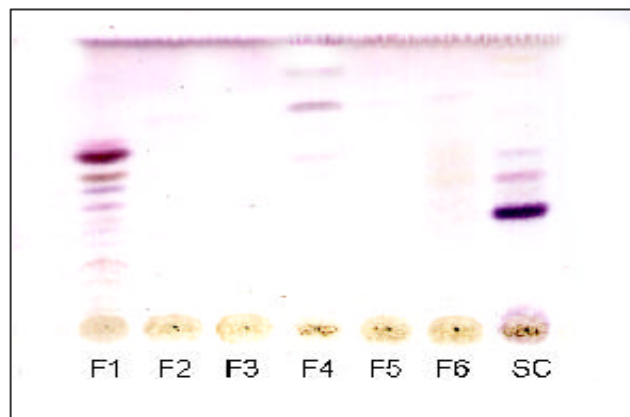
5.6 Abhängigkeit der DQ1-Bildung von der Wachstumsrate

Durch die Fed-Batch Kultur wurde bestätigt, daß die DQ1-Bildung verbessert wird, wenn die Wachstumsrate verringert ist. Damit kann man erklären, warum bei einer Verbesserung des Wachstums die Produkt-Bildung nicht unbedingt erhöht wird

Die Naturstoffbildung von manchen Pilzen in der Standkultur ist besser als in der Schüttelkultur und im Bioreaktor. Dabei handelt es sich wahrscheinlich auch um unterschiedliche Wachstumsraten.

Bei der Kultivierung eines marinen Isolates *Verticillum* sp. wurde ein ähnliches Phänomen beobachtet. Wenn der Pilz bei 25°C kultiviert wird, kann er gut wachsen, aber bildet wenig Naturstoffe (Abb. 5.3F2-F6). Wenn die Kultivierungstemperatur auf 15°C erniedrigt wird, oder wenn der Pilz bei 25°C in der Standkultur kultiviert wird, erhöht sich die Naturstoffbildung.

Abb. 5.3 DC-Analyse des Kulturextraktes vom *Verticillum* sp.
Bedingungen: F:10 l Bioreaktor
F1: 15°C; 0.25 v/vm; 150 rpm
F2: 25°C; 0.25 v/vm; 150 rpm
F3: 25°C; 0.33 v/vm; 350 rpm
F4: 25°C; 0.42 v/vm; 350 rpm
F5: 25°C; 0.33 v/vm-0.41 v/vm; 300 rpm
F6 = F
SC: Standkultur, 1.8 l Fernbachkolben, 25°C



6 Zusammenfassung

1. Im Rahmen des Verbundprojektes wurden 662 marine Pilzisolat bearbeitet, davonstammten 516 Stämme aus dem AWI, 146 Isolate wurden von unseren Proben erhalten.

Durch chemisches Screening (HKI) und biologisches Screening (HKI, BRAIN) wurden 25 Isolate ausgewählt und in Volumen bis 40 l kultiviert. Nach Aufarbeitung und Reinigung der Kulturen (FHO, HKI) wurde die Strukturaufklärung durchgeführt (HKI). 20 neue Substanzen wurden gewonnen. Nachdem erste neue Produkte gefunden worden waren, wurde das Pilzisolat H-TW5/869 beispielhaft für vertiefte Untersuchungen in dieser Arbeit eingesetzt.

Das Isolat H-TW5/869 ist aus dem Gewässer um Helgoland isoliert worden. Es wurde als *Penicillium janczewskii* identifiziert. Der Rohextrakt der Pilzkultur zeigte eine gute antimikrobiologische Wirkung und eine cytotoxische Wirkung gegen CHO-K1 Zellen (BRAIN) und *Artemia Salina*.

2. Die Substratverwertung (im künstlichen Seewasser), das *Phoma* Pattern und die Sekundärmetabolite von dem marinen Isolat *Penicillium janczewskii* (H-TW5/869) und vom terrestrischen Isolat *Penicillium janczewskii* (DSM 847) wurden verglichen. Das marine Isolat verwertete besser die Polysaccharide wie Carrageenan, Alginat, Stärke, Monohydrate. Das terrestrische Isolat DSM 847 wuchs besser auf Cellulose, Xylan und Inulin. Das marine Isolat zeigte also eine Anpassung an die marinen Lebensbedingungen. Das marine Isolat hat die Abhängigkeit des *Phoma* Patterns gezeigt, aber das terrestrische Isolat nicht, obwohl die beiden gleicher Gattung und Art sind. Einige Sekundärmetabolite vom marinen Isolat *Penicillium janczewskii* (H-TW5/869) konnten auch beim terrestrischen *Penicillium janczewskii* (DSM 847) gefunden werden. Aber das Verhältnis der Produktmengen ist unterschiedlich. Es wurde auch nachgewiesen, daß die großen Mengen synthetisierter Produkte bei dem marinen und terrestrischen Stamm unterschiedlich sind.
3. Nach der Strukturaufklärung im HKI wurde ein neues Alkaloid 3-Methoxy-4,5-dihydroxy-6- isopentenyl-4-(4'-methoxy-phenyl)-quinolinon (DQ1) als beispielhaft für weitere Untersuchungen zur Sekundärmetabolite eingesetzt. DQ1 hat keine

antimikrobiologische Wirkung, aber eine gute cytotoxische Wirkung und auch eine narkotische Wirkung gegen *Artemia salina*.

4. In dieser Arbeit wurde der Vorschlag von Kusano et al. experimentell untersucht, daß die Anthranilsäure ein Baustein für die Dihydroquinolinon Produktion sein könnte. Bei einer Zugabe von Anthranilsäure am Anfang der Fermentation erfolgte eine positive Wirkung für die DQ1-Bildung, Bei einer späteren Zugabe wird eine andere, bisher unbekannte Substanz synthetisiert.
5. Es wurde gezeigt, daß die optimale Salinität für die Bildung einzelner Sekundärmetabolite von dem marinen Isolat H-TW5/869 unterschiedlich ist.
6. In der Standkultur lag der optimale Seewasseranteil für die DQ1-Bildung bei 80%, in der Schüttelkultur bei 60%. Das natürliche Seewasser war besser für die DQ1-Bildung als das künstliche Seewasser geeignet.
7. Die Prozeßgrößen wie Mediumzusammensetzungen, Salinität, pH, zusätzliche Aminosäuren und andere Stickstoffquellen, Mediumkonzentration und die Belüftungsrate wurden optimiert. Die optimierten Kultivierungsbedingungen waren: pg-Medium, 24 g/l; natürliches Seewasser mit einem Anteil von 60%; pH (Anfang) 5.2; Zugaben: Serin 1.0 g/l, NaNO₃ 0.5 g/l, Belüftungsrate 0.33 v/vm. Durch die Optimierung wurde die DQ1-Produktion in der Schüttelkultur von 6.7 mg/l auf 22.16 mg/l und bei der Bioreaktorkultur von 7.33 mg/l auf 14.50 mg/l erhöht.
8. Durch einen Fed-Batch-Betrieb konnte der Prozeß der DQ1-Bildung verlängert werden. Die DQ1-Produktion wurde um 66% erhöht. Bei einer Vorlage der gleichen Substratmenge in einer Batch-Kultur verringert sich die DQ1-Bildung wesentlich gegenüber dem Fed-Batch-Betrieb.
9. In der Fed Batch Kultur in einem 10 l Bioreaktor wurde festgestellt, daß durch eine Verkleinerung der Zufütterungsrate die DQ1-Bildung verbessert werden konnte. Bei einer Zufütterungsrate von 2.496 g/h war die Produktausbeute 0.120 mg DQ1/g Medium. Als die Zufütterungsrate auf 0.504 g/h eingestellt wurde, verbesserte sich die Ausbeute auf 0.663 mg DQ1/g Medium. Eine geringe Wachstumsrate ist günstig für die DQ1-Bildung.

10. Der marine Pilz H-TW5/869 konnte bei der Feststoffsubstratfermentation gut wachsen. Im Vergleich mit acht verschiedenen Medien wurde festgestellt, daß ein Medium aus Weizenkleie-Sägemehl-Stärke-Mischung (WSS) (oder WSS + Glukose) wesentlich besser für die DQ1-Bildung war als die andere Mischungen. Die DQ1 Menge erreichte 52 mg/100g Medium. Das WSS (oder WSSG) Medium waren ebenfalls am besten für die Produktion der Substanzen **2, 3, 4, 6, 8, 10**. Die Substanz **10** (Compactin, ein wichtiges Arzneimittel) erreichte 472.40 mg/100 g Medium. Der marine Pilz H-TW5/869 zeigte bei der Feststoffsubstratfermentation eine gute Produktivität der Naturstoffe. Für die Produktion der Substanz **5** war das Weizenkleie-Algen-Stärke-Glukose-Mischung am besten.

Eine Aufarbeitung durch Feststoffextraktion erleichterte die Naturstoffisolierung aus Feststoffsubstraten.

Es wurde gezeigt, daß die Feststofffermentation auch eine gute Methode für die Naturstoffsuche aus marinen Pilzen (eventuell auch terrestrischen Pilzen) ist.

7 Literatur

- Abbanat, D., Leighton, M., Maiese, W., Jones, E. B., Pearce, C. & Greenstein, M. (1998) Cell wall active antifungal compounds produced by the marine fungus *hypoxylon oceanicum* LL-15G256. I. Taxonomy and fermentation. *J. Antibiot.* **51**, 296-302
- Ahearn, D. G. & Crow, S. A. (1986) *The biology of marine fungi: Fungi and hydrocarbons in the marine environment.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Althoff, K., Schütt, R., Steffen, R., Batel, R. & Müller, W. E. G. (1998) Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar. Biol.* **130**, 529-536
- Amagata, A., Minoura K. & Numata, A. (1998) Cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a Sargassum alga. *J. Antibiot.* **51**, 432-434
- Austin, B. (1988) *Marine microbiology.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Ayer, W. A., van Altena, I. & Bromne, L. M. (1990) Three piperazinediones and a drimane diterpenoid from *Penicillium brevi-compactum*. *Phytochem.* **29**, 1661-1665
- Berdy, J. (1995) Are actinomyces exhausted as a source of secondary metabolites? Proceeding of 19th International Symposium on The Biology of Actinomyces Part 1. Allerton Press, New York, 3-33
- Bergman, W. & Feeney, R. J. (1951) Nucleosides of sponges. *J. Org. Chem.* **16**, 981-987
- Biabani, M. A. F. & Laatsch, H. (1998) Advances in chemical studies on low-molecular weight metabolites of marine fungi. *J. Prakt. Chem-Chem ZTG.* **340**, 589-607
- Brain, P. W., Curtis, P. J. & Hemming, H. G. A. (1949) substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by *Penicillium janczewskii*. III. Identification of curling factor with griseofulvin. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **32**, 30-33
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- Broadbent, D., Mabelis, R. P. & Spencer, H. (1975) 3,6,8-Trihydroxy-1-Methoxyanthone – An antibacterial Metabolite from *Penicillium patulum*. *Phytochem.* **14**, 2081-2083
- Brown, A. G., Smale, T. C., King, J., Hasenkamp, R. & Thompson, R. H. (1976) Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*. **11**, 1165-1170
- Clipson, N. J. W. & Jennings, D. H. (1992) *Dendrypiella salina* and *Debaryomyces hansenii*: models for ecophysiological adaptation to salinity by fungus which grow in the sea. *Can. J. Bot.* **70**, 2097-2105
- Cox, P. W., Clipson, N. J. W., Hooley, P. & Thomas, C. R. (1995) Effects of growth medium solute concentration upon the spore germination and colony growth characteristics of *Aspergillus nidulans*. Proceedings of the Institution of Chemical Engineers Research Event, Edinburgh. **2**, 986-988
- Cristophersen, C., Crescente, O., Frisvad, J. C., Gram, L., Nielsen, J., Nielsen, P. H. & Rahback, L. (1999) Antibacterial activity of marine-derived fungi. *Mycopathologia.* **143**, 135-138
- Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E. & Clardy, J. (2001) Pestalone, a New Antibiotic Produced by a Marine Fungus in Response to Bacterial Challenge. *J. Nat. Prod.* **64**, 1444-1446
- Cui, C., Kakeya, H., Okada, R. & Ubukata, M. (1996) Acetophthalidin, a novel inhibitor of mammalian cell cycle, produced by a fungus isolated from a sea sediment. *J. Antibiot.* **49**, 216-219
- Curran, P. M. T. (1980) The effect of temperature, pH, Light and dark on the growth of fungi from Irish coastal waters. *Mycologia.* **72**, 350-358
- Cuomo, V., Palomba, I., Perretti, A., Guerriero, A., D'Ambrosio, M. & Pietra, F. (1995) Antimicrobial activities from marine fungi. *J. Mar. Biotechnol.* **2**, 199-204
- Davidson, S. K., Allen, S. W., Lim, G. E., Anderson, C. M. & Haygood, M.G. (2001) Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "Candidatus Endobugula sertula" of the bryozoan *Bugula neritina*. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 4531-4537
- Demain, A. L. (1999) Pharmaceutically active secondary metabolite of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-463

- Dunn, P. H. & Baker, G. E. (1983) Filamentous fungi of the psammon habitat at Eniwetok atoll, Marschall Islands. *Mycologia*. **75**, 839-853
- Faulkner, D. J. (1977) Marine natural products: Metabolites of marine Invertebrates. *Nat. Prod. Rep.* **1**, 551-598
- Faulkner, D. J. (1984a) Interesting aspects of marine natural products chemistry. *Tetrahedron*. **33**, 1421-1443.
- Faulkner DJ (1984b) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **1**, 113-158.
- Faulkner, D. J. (1986) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **3**, 1-33.
- Faulkner, D. J. (1987) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **4**, 539-576.
- Faulkner, D. J. (1988) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **5**, 613-663.
- Faulkner, D. J. (1990) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **7**, 269-309.
- Faulkner, D. J. (1991) Marine natural Products. *Nat. Prod. Rep.* **8**, 97-147.
- Faulkner, D. J. (1992a) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **9**, 323-364.
- Faulkner, D. J. (1992b) Biomedical uses for natural marine chemicals. *Oceanus* **35**, 29-35.
- Faulkner, D. J. (1993) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **10**, 497-539.
- Faulkner, D. J. (1994) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **11**, 355-394.
- Faulkner, D. J. (1995) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **12**, 223-269.
- Faulkner, D. J. (1996). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **13**, 75-125.
- Faulkner, D. J. (1997). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **14**, 259-296.
- Faulkner, D. J. (1998) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **15**, 113-158.
- Faulkner, D. J. (1999) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 155-198.
- Faulkner, D. J. (2000a) Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.* **17**, 1-6
- Faulkner, D. J. (2000b) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 7-55

- Faulkner, D. J. (2000c) Marine pharmacology. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **77**, 135-45.
- Faulkner, D. J. (2001) . Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 1-49
- Finical, W. (1996) Marine biodiversity and the medicine cabinet. The Status of new drugs from marine organisms. *Oceanography*. **9**, 23-27
- Finical, W. & Jensen, P. R. (1993) Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. In: *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products* (Hrsg.: Attaway D. H. and Zaborsky O. R.) Plenum Press New York. Vol. 1, 419-457
- Grabley, S. (1996) Wirkstoffsuche am Hans-Knöll-Institut (HKI). Fachtagung "Chancen für eine wirtschaftliche Nutzung der Meeresbiotechnologie in Norddeutschland". Wilhelmshaven
- Grabley, S. & Thiericke, R. (1999 a) Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **64**, 101-54
- Grabley, S. & Thiericke, R. (1999 b) *Drug discovery from nature*. Springer Verlag Press: Berlin
- Grabley, S., Thiericke, R. & Sattler, I. ((2000) Tools for drug discovery: natural product-based libraries. *Ernst Schering Res Found Workshop.* **32**, 217-52
- Grabley, S., Wink, J. Zeeck, A. (1991) Auffinden und Isolieren mikrobieller Sekundärstoffe am Beispiel des chemischen Screenings. *Jahrbuch der Biotechnologie*. P. Präve, et al. München, Carl Hanser Verlag. **3**, 379-390
- Hayashi, H., Nakatani, T., Inoue, Y., Nakayama, M. & Nozaki, H. (1997) New Dihydroquinolinone toxic to *Artemia salina* produced by *Penicillium* sp. NTC-47. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 914-916
- Haygood, M. G., Schmidt, E. W. , Davidson, S. K. & Faulkner, D. J. (1999) Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 33-43
- Helmholz, H. (1998) Untersuchungen zu immunmodulierenden Wirkstoffen aus marinen Pilzen unter besondere Berücksichtigung des marinen Basidiomyceten *Nia vibrissa* (Moore& Meyers). Dissertation. Universität Greifswald
- Helmholz H., Etoundi P. & U. Lindequist. (1999). Cultivation of the marine basidiomycete *Nia vibrissa* (Moore&Meyers). *J. Biotechnol.* **70**, 203-206.

- Höller, U. (1999a) Isolation, biological activity and secondary metabolite investigations of marine-derived fungi and selected host sponges. Dissertation. Technische Universität Braunschweig
- Höller U., König GM. & AD. Wright. (1999b) A new tryosine kinase inhibitor from a marine isolate of *Ulocladium botrytis* and a new metabolites from the marine fungi *Asteromyces cruciatus* and *Varicosporina ramulosa*. Eur. J. Org. Chem. **11**, 2949-2955
- Humphries, G. M. (1981) Difference in the ability of compactin and oxidized cholesterol, both known inhibitors of cholesterol biosynthesis, to suppress in vitro immune responses. Cancer Res. **41**, 3789-3791
- Hüners, M. (1999) Naturstoffscreening und Bioprozeßoptimierung der Wirkstoffproduktion eines marinen schwammassoziierten Bakteriums. Dissertation. Technische Universität Braunschweig
- Iwamoto, C., Minoura, K., Hagishita, S., Nomoto, K. & Numata, A. (1998) Pentostatins F-I, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from an Enteromorpha marine alga. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1**, 449-456
- Iwamoto, C., Yamada, T., Ito, Y., Minoura, K. & Numata, A. (2001) Cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga. Tetrahedron. **57**, 2997-3004
- Jennings, D. H. (1963) Some aspects of the physiology and biochemistry of marine fungi. Biol. Rev. **58**:423-454
- Kagata, T., Shigemori, H., Mikami, Y. & Kobayashi, J. (2000) Coruscol A, a new metabolite from the marine-derived fungus *Penicillium* species. J. Nat. Prod. **63**, 886-887
- Takeya, H., Takahashi, I., Okada, G., Isono, K. & Osada, H. (1995) Epolactaene, a novel neurotogenic compound in human neuroblastoma cells, produced by a marine fungus. J. Antibiot. **48**, 733-735
- Khudyakova, Y. V., Pivkin, M. V., Kuznetsova, T. A. & Svetashev, V. I. (2000) Fungi in sediments of the Japan and their biologically active metabolites. Microbiology. **69**, 608-611
- Kolmeyer, J. & Kohlmeyer, E. (1979) Marine mycology: The higher fungi. Academic press. New York, San Francisco, London
- Kohlmeyer, J. & Vollmann-Kohlmeyer, B. (1991) Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. Botanica Marina. **34**, 1-61

- Komatsu, K., Shigemori, H., Mikami, Y. & Kobayashi, J. (2000) Sculezonones A and B, two metabolites possessing a phenalenone skeleton from a marine-derived fungus *Penicillium* species. *J. Nat. Prod.* **63**, 408-409
- König, G. (1992) Meeresorganismen als Quelle pharmazeutisch bedeutsamer Naturstoffe. *Dtsch. Apoth. Ztg.* **132**, 673-684
- König, G. M. & Wright, A. D. (1996) Marine natural products research: Current directions and future potential. *Planta Med.* **62**, 193-211
- König, G. M. & Wright, A. D. (1998) Wirkstoffe aus marinen Organismen. *P. Z.* **48**, 4153-4161
- Kusano, M., Koshino, H., Uzawa, J., Fujioka, S., Kawano, T. & Kimura, Y. (2000) Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2559-2568
- Liberra, K. & Lindequist U. (1995) Marine fungi- A prolific resource of biologically-active natural-products. *Pharmazie.* **50**, 583-588
- Lin, Y. C., Shao, Z. Y., Jiang, G. C., Zhou, S. N., Cai, J. W., Vrijmoed, L. L. P. & Jones, E. B. G. (2000) Penicillazine, a unique quinolone derivative with 4H-5,6-dihydro-1,2-oxazine ring system from the marine fungus *Penicillium* sp. (strain #386) from the South China Sea *Tetrahedron.* **56**, 9607-9609
- Lindequist, U., Kusnick, C., Helmholz, H. & Liberra K. (1999) Neue Wirkstoffe aus Pilzen des Meeres. *Zeitschrift für Phytotherapie.* **20**, 29-36
- Lorenz, R. & Molitoris, H.P. (1992) Combined influence of salinity and temperature (Phoma pattern) on growth of marine fungi. *Can. J. Bot.* **70**, 2111-2115
- Malmstrom. J., Christophersen, C. & Frisvad, J. C. (2000) Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. *Phytochem.* **54**, 301-309
- Mantle, P. G. (1987) Secondary metabolites of *Penicillium* and *Acremonium*, in: *Penicillium and Acremonium* (Peberdy J. F. eds.), Plenum Presss, New York. 161-242
- MarinLit, (1998) A marine literature database maintained by the Marine Chemistry Group, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand

- McMaster, W. J., Scott, A. J. & Trippett, S. (1960) Metabolic products of *Penicillium patulum*. J. C. S. 4628-4631
- Meiners, M. (1990) Biotechnologie für Ingenieure. Vieweg. Braunschweig.
- Meiners, M. (1996) Konzept Meeresbiotechnologie. Fachtagung: Chancen der Meeresbiotechnologie für Norddeutschland. BioRegio Nordwestliches Niedersachsen . Wilhelmshaven
- Meiners, M. (1997a) Marine Biotechnology. DGM-Mitt. **4**, 63-64
- Meiners, M. (1997b) Marine Biotechnology, Application-commercialization-cooperations. International Workshop, Wilhelmshaven
- Menge, M., Musherjee, J. & Scheper, T. (2001) Application of oxygen vectors to *Claviceps purpurea* cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **55**, 411-416
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. Anal. Chem. **31**, 426-428
- Molitoris, H. P. (1995) Are fungi adapted to the deep sea? Abstract of the VI International Marine Mycology Symposium, Portsmouth.
- Moss, S. T. (1986) The biology of marine fungi. Cambridge University Press
- Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Dumdei, E. J., Hickford, S. J. H., Lill, R. E., Li, S. X., Battershill, C. N. & Duckworth, A. R. (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. J. Biotechnol. **70**, 15-25
- Natama, A., Takahashi, C., Ito, Y., Kawai, K., Usami, Y., Mastsumra, E., Imachi, M. & Ito, T. (1993) Communesins, cytotoxic metabolites of a fungus isolated from a marine alga. Tetrahedron Lett. **37**, 2355-2358
- Numata, A., Takahashi, C., Ito, Y., Minoura, K., Yamada, T., Matsuda, C. & Nomoto, K. (1996) Penochalasin, a novel class of cytotoxic cytochalasins from a *Penicillium* species separated from a marine alga: Structure determination and solution conformation. J. Chem. Soc. Perkin Trans. **1**, 239-245
- Onuki, H., Miyashige, H., Hasegawa, H. & Yamashita, S. (1998) NI 15501 A, a novel anthranilamide derivative from a marine fungus *Penicillium* sp.. J. Antibiot. **5**, 442-444

- Oxford, A. E., Raisytick, H., Simonart, P., (1939) The biochemistry of micro-organismen LX. Griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx. Biochem. J. **33**, 240-248
- Peter, V. N., Juergen, L., Gisela, J., Rainer, H., Edda, K., Eberhard, D. & Ludwig, K. (1989) Growth regimes for the fermentative manufacture of griseofulvin with *Penicillium urticae*. Ger. Pat. 271, 427
- Philomena, M. & Curran, T. (1980) The effect of temperature, pH, light and dark on the growth on fungi from Irish coastal waters. Mycologica. **72**, 351-358
- Piepersberg, W. & Zeeck, A. (1994) Mikrobieller Sekundärstoffwechsel, in " Handbuch der Biotechnologie (Präve et al., eds.). Oldenbourg Verlag München Wien. 141-176
- Pietra, F. (1997) Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievments and prospects. Nat. Prod. Rep. **14**, 453-464
- Pitt, J. I. (1979) The genus *Penicillium* and ist teleomorphic, states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco
- Pluda, J. M., Cheson, B. D. & Phillips, P. H. (1996) Clinical trials referral resource. Clinical trails using bryostatin-1. Oncology. **10**, 740-742.
- Proksch, P. (1991) Biologisch aktive Naturstoffe in marinen Invertebraten. Biologie in unsere Zeit. 21. Jahrg. **1**, 26-30
- Richtie, D. (1957) Salinity optima for marine fungi affected by temperature. Am. J. Bot. **44**, 870-874
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdmann, M. & Stanier, R. Y. (1979) Generic-assignments, Strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. **111**, 1-61.
- Robinson, T., Singh, D. & Nigam, P. (2001) Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. Appl. Microbiol. Biotechnol. **55**, 284-289
- Schaumann K. (1974) Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß des Salzgehaltes und der Temperature auf das Mycelwachstum höherer Pilze aus dem Meer- und Brackwasser. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl. **5**, 443-474
- Schaumann K. (1993) Marine Pilze. In: Mikrobiologie Meeresboden (Hrsg.: Meyer-Reil L.-A. und Köster M.) Gustav Fischer Verlag Jena. 144-187.

Schaumann, K. (1996) Marine Pilze und pilzähnliche Protisten als Produzenten neuartiger Substanzen – wissenschaftliche und biotechnologische Aspekte. Fachtagung: Chancen der Meeresbiotechnologie für Norddeutschland. BioRegio Nordwestliches Niedersachsen. Wilhelmshaven

Schmidt, E. W., Obraztsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J. & Haygood, M. G. (2000) Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel delta-proteobacterium, "Candidatus Enttheonella palauensis" Mar. Biol. **136**, 969-977

Shigemori, H., Wakuri, S., Yazawa, K., Nakamura, T., Sasaki, T. & Kobayashi, J. (1991) Fellutamides A und B, cytotoxic peptides from a marine fish-possessing fungus *Penicillium fellutanum*. Tetrahedron. **47**, 8529-8534

Son, B. W., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. & Fenical, W. (1999) New cytotoxic epidithiodioxopiperazines related to verticillin A from a marine isolate of the fungus *Penicillium*. Nat. Prod. Lett. **13**, 213-222

Steglich, W., Fugmann, B. & Lang-Fugman, S.(Hrsg.). (1997) Römpp-Lexikon Naturstoffe. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.

Sugano, M., Sato, A., Iijima, Y., Furuya, K., Kuwano, H. & Hata, T. (1995) Phomactin E, F, and G: new phomactin-group PAF antagonists from a marine fungus *Phoma* sp.. J. Antibiot. **48**, 1188-1190

Takahashi, C., Numata, A., Yamada, T., Minoura, K. & Enomoto, S. (1996) Penochalasin, a novel cytotoxic metabolite from a *Penicillium* species separates from green alga. Tetrahedron Lett. **37**, 655-658.

Tan, C. S. & Stalpers, J. A. (1998) General Methods. In CBS-Course of Mycology, edit by: Gams, W., Hoekstra, E. S. & Aptroot, A. Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn. Delft. Fourth edition. 96-104

Torzilli, A. P., Vinroot, S. & West, C. (1985) Interactive effect of the temperature and salinity on growth and activity of a salt marsh isolate of *Aureobasidium pullulans*. Mycologia. **77**, 278-284

Tsai, G. J., Tsai, F. C. & Kong, Z. L. (1997) Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster. Int. J. Food Microbiol. **38**, 111-116

Venkata Dasu, V. & Panda, T. (1999) Studies on production of griseofulvin. *Bioproc. Eng.* **21**, 489-495

Venkata Dasu, V. & Panda, T. (2000) Optimization of microbiological parameters for enhanced griseofulvin production using response surface methodology. *Bioproc. Eng.* **22**, 45-49

Vukelić, B., Ritonja, A., Renko, M., Pokorny, M. & Vitale, L. J. (1992). Extracellular α -amylase from *Streptomyces rimosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 202 – 204.

Wethered, J. M., Metcalf, E. C. & Jennings, D. H. (1985) Carbohydrate Metabolism in the fungus *Dendryphiella salina*. VIII. The contribution of polyol and ions to the mycelia solute potential in relation to the external osmoticum. *New Phytol.* **101**, 631-649

Wright, J. M. (1956) The production of antibiotic in soil. II. Production of griseofulvin by *Penicillium Nigricans*. *Ann. Appl. Biol.* **43**, 288-296

Wu, S. & Ben Y. (1983) Study on the characteristics of *Penicillium patulum* strains with high ability of producing griseofulvin. *Weishengwuxue Tongbao*, **10**, 204-206

Zaehle, F. (1997) Optimierung der Wachstumsbedingungen zur Kultivierung und Massenzüchtung von marinen Pilzen am Beispiel von *Dendryphiella salina* (SUTH.) PUGH et NICOT . Diplomarbeit. Fachhochschule Ostfriesland

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Anthranilsäure
Asn	Asparagin
ASP	Asparaginsäure
AWI	Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung
bidest.	bidestilliert
BRAIN	BRIAN Biotechnology Research And Information Network GmbH
BTM	Biotrockenmasse (g/l)
bzw.	beziehungsweise
CK	Kontrollgruppe
Cys	Cystein
Cs	Substratkonzentration
DC	Dünnschichtchromatogramm
DQ1	3-methoxy-4,5-dihydroxy-6-isopentenyl-4-(4'-methoxy-phenyl)- Quinolinon
DQ2	3-methoxy-4-hydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-Quinolinon
DQ3	3R*, 4S* - dihydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-Quinolinon
DQ4	3S*, 4R* - dihydroxy-4-(4'-methoxy-phenyl)-Quinolinon
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSN	3,5-Dinitrosalicylsäure
FHO	Fachhochschule Oldenburg/Osterfriesland/Wilhelmshaven
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
His	Histidin
HKI	Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e. V.
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
Ile	Isoleucin
IR	Infrarot
KS	künstliches Seewasser

Leu	Leucin
Lys	Lysin
ME	Malz Extrakt Medium
Met	Methionin
MS	Massenspektroskopie
NMR	kernmagnetische Resonanz
pg	Kartoffel-Dextrose Brühe
Phe	Phenylalanin
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Pro	Prolin
q _s	spezifische Substrataufnahmerate (g Substrat/ g BTM/h)
q _p	spezifische Produktbildungsrate (mg Produkt/g BTM/h)
RG	Restglukose
RZ	reduzierende Zucker
S	Stärke Medium
Ser	Serin
SW	natürliches Seewasser
SSF	Feststofffermentation (solid substrat fermentation)
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val	Valin
UPM	Umdrehungen pro Minute
Y _{p/s}	Ausbeute des Produktes
Y _{x/s}	Ausbeute des Biomasse
z. B.	zum Beispiele
μ	spezifische Wachstumsrate (h ⁻¹)

Selbständigkeitserklärung:

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Jena, den 08. 01. 2002

Jingmin Cai

Danksagung

Frau Prof. Dr. S. Grabley und Herrn Prof. Dr. M. Meiners möchte ich für die Überlassung der interessanten Themenstellung und für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Meiners für seine Anregung zu dieser Arbeit, die Initiierung des Projektes, die Überlassung des Arbeitsplatzes, seine freundliche Unterstützung während meines Aufenthaltes in Deutschland, die intensiven Diskussionen und seine sehr konstruktiven Anregungen während der praktischen Durchführung der Arbeit sowie seiner sehr hilfreichen Kritik und Unterstützung in der Zeit der Abfassung der Dissertation.

Mein Dank gilt weiterhin den am Verbundprojekt beteiligten Kooperationspartnern:

Frau Prof. Dr. S. Grabley danke ich für ihr Engagement bei der Koordination der Teilprojekte, so dass durch den flüssigen und effektiven Ablauf des Verbundprojektes der Rahmen für diese Promotionsarbeit geschaffen wurde.

Der Arbeitsgruppe Molekulare Naturstoffforschung am HKI, im Einzelnen Frau Dr. I. Sattler, Herr Dr. U. Lion, Herr Dr. J. He und Frau B. Lehmann, danke ich für die unterstützende Zusammenarbeit mit dem chemisch-biologischen Screening und der Strukturaufklärung der Metabolite, die praktische und materielle Hilfe sowie die hilfreichen Gespräche und Rezensionen meiner Arbeit.

Der Arbeitsgruppe Marine Mykologie am AWI, Herrn Dr. K. Schaumann, Herrn Dr. H. Schünke, Frau K. Scheer, danke ich für die Überlassung der Pilzisolat und die sehr wertvollen Diskussionen. Besonders möchte ich Herrn Dr. H. Schünke für seine hilfreichen Gespräche, konstruktive Kritik dieser Arbeit und Hinweise zur Identifizierung der marinen Pilze danken.

Den Mitarbeitern des Biotechnologieunternehmens BRAIN AG / Zwingenberg, Frau Dr. U. Dechert, danke ich für die molekularbiologischen Zuordnung der Pilzisolat sowie, Herrn Dr. M. Krohn, für die Durchführung der Cytotoxizitätstests und zellbiologische Testung auf EGFR-Aktivitäten.

Nicht zuletzt gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und gute Zusammenarbeit den Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe Marine Biotechnologie der Fachhochschule Oldenburg / Ostfriesland / Wilhelmshaven (Prof. Dr. M. Meiners) am FZ-Terramare, Frau B. Ritzka, Herr B. Kopke und Herr T. Heidorn für ihre technische Hilfe, die fachlichen Anregungen und die Zusammenhalt innerhalb und außerhalb des Labors.

Herr Prof. Dr. M. Hamburger, Friedrich-Schiller-Universität Jena, hat durch seine freundliche Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft meine Arbeit unterstützt. Dafür gilt ihm mein Dank.

Besonders möchte ich Frau Dr. I. Sattler für ihr Engagement bei der Klärung der offenen Fragen in meinem Promotionsverfahren danken. Durch diese Unterstützung und die hilfreiche und konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskriptes konnte diese Arbeit abgeschlossen werden.

Herrn Prof. Dr. habil. M. Pietzsch, Universität Halle; Herrn Prof. Dr. E. Siefert, FHO; Herrn Dr. P. Hoffmann, DSMZ; Herrn Dr. K. Mauch, Universität Stuttgart, danke ich für ihre konstruktive Diskussionen.

Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF-BEO, das Ministerium für Wissenschaft und Kultur MWK Niedersachsen und die Vereinigte Universität Hefei, China, möchte ich mich hiermit bedanken.

Persönlich möchte ich Frau Dr. K. Gafert vom MWK Niedersachsen für ihre freundliche Hilfe während meines Aufenthaltes in Deutschland sowie die Möglichkeit der Teilnahme an der ACHEMASIA danken.

Bei den Mitarbeitern des Forschungszentrums Terramare e.V. bedanke ich mich für das zur Verfügung stellen des für diese Arbeit notwendigen technischen Rahmens, sowie, wie auch bei allen Mitstreitern vom Terramare, für die freundliche Atmosphäre und die Hilfen im Labor und Alltagsleben.

Meinen Eltern und Schwiegereltern, meiner Frau und meinem Sohn danke ich für ihre stetige Unterstützung während des Studiums.

Lebenslauf

Name: Jingmin Cai
Geburtstag: 16. 07. 1963
Geburtsort: Hefei, Provinz Anhui, V. R. China
Eltern: Prof. Qiwu Cai und seine Ehefrau Prof. Zhihu Wan
Familienstand: verheiratet, Ehefrau Yan Cheng, Sohn Weicheng Cai

Schulische Ausbildung:

09/1970 – 09/1975 Grundschule in Chuxian, Anhui, V. R. China
09/1975 – 07/1978 Mittelschule Shahe, Anhui, V. R. China
09/1978 – 07/1984 Hochmittelschule Chuzhou, Anhui, V. R. China

Studium

10/1980 – 07/1984 Vereinigte Universität Hefei (VUH), Fachrichtung: angewandte
Mikrobiologie
Abschluß: Bachelor of Science (ausgezeichneter Absolvent der VUH)
10/1996 – 03/1999 Master-Kursus an der landwirtschaftlichen Universität Anhui
Abschluß: Master sc. agr.

Beruflicher Werdegang

09/1984 – 06/1993 Assistent an der Vereinigten Universität Hefei
11/1987 – 11/1988 Gastaufenthalt an der Fachhochschule Ostfriesland auf
Einladung vom Ministerium für Wissenschaft und Kultur (MWK),
Niedersachsen
06/1993 – 12/1996 Dozent an der Vereinigten Universität Hefei
11/1993 – 07/1994 Gastwissenschaftler an der Universität Stuttgart,
Institut für Bioverfahrenstechnik auf Einladung vom MWK,
Niedersachsen
Ab 12/1996 Außerordentlicher Professor an der Vereinigten Universität Hefei
04/1999 – 03/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Fachhochschule Ostfriesland in
einem BMBF Projekt, Promotionsstudium an der Friedrich-Schiller-
Universität Jena
ab 04/2002 Ordentlicher Professor an der Vereinigten Universität Hefei