

4547-6796

**Untersuchungen zur *in vivo* Omphalotin-Synthese
bei *Omphalotus olearius*:**

Fermentations- und Stammoptimierung

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

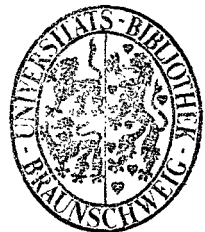
genehmigte
DISSERTATION
(D 386)

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Carsten Sturm

Vorsitzender:	Prof. Dr. B. Büdel
1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. H. Anke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.J. Schmidt

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 21.12.1999

Kaiserslautern 1999



Inhaltsverzeichnis:

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL	11
2.1	Chemikalien	11
2.2	Medien für Pilze, Pflanzen und Nematoden	13
2.2.1	Standardmedien.....	13
2.2.2	Medien mit komplexen N-Quellen	14
2.2.3	Medien mit verschiedenen C-Quellen	15
2.2.4	Medien mit Gemischen verschiedener N-Quellen	15
2.4	Lösungen	17
2.5	Organismen	18
2.5.1	Nematoden	18
2.5.2	Pflanzen	18
2.5.3	Bearbeitete Pilzstämme	18
3.	METHODEN	20
3.1	Kultivierungsmethoden.....	20
3.1.1	Kultivierung von Nematoden (MAYER et al., 1996).....	20
3.1.2	Kultivierung der Pilzstämme.....	21
3.1.2.1	Fermentation in Schüttelkolben.....	21
3.1.2.2	Fermentation im 15 l Maßstab.....	21
3.1.2.3	Zufütterung von Nährstoffen	21
3.1.2.4	Probennahme und -aufarbeitung	22
3.1.3	Fermentationsanalysen.....	23
3.1.3.1	pH-Wert	23
3.1.3.2	Enzymatische Bestimmung des Glucose- und Maltosegehaltes	23
3.1.3.3	Myzeltrockengewicht.....	23
3.1.3.4	Bestimmung der nematiziden Aktivität (Mikroliterplattentest).....	24
3.2	HPLC-Analytik.....	24
3.2.1	Wirkstoffbestimmung mittels analytischer HPLC.....	24
3.2.2	Quantifizierung von Aminosäuren	25
3.2.3	Hydrolyse aminosäurehaltiger Verbindungen	28
3.2.3.1	Saure Hydrolyse von Proteinen (ohne Schutzsubstanz).....	28
3.2.3.2	Alkalische Hydrolyse von Proteinen	28
3.3	Methoden zur Isolierung und physikalisch-chemischen Charakterisierung der Wirkstoffe	29
3.3.1	Säulenchromatographie	29
3.3.2	Präparative HPLC	29
3.3.3	Spektroskopie	29
3.4	Methoden zur Isolierung und Rekombination von Einsporkulturen aus <i>Omphalotus olearius</i>	30
3.4.1	Isolierung von Monokaryoten (Einsporkulturen).....	30
3.4.2	Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	30
3.4.3	Herstellung und Isolierung von Dikaryoten.....	30
3.4.4	Ermittlung der Omphalotin Produktion und nematiziden Aktivität der isolierten Stämme	31
3.5	Methoden zur Anreicherung und Charakterisierung lytischer Enzyme	32
3.5.1	Induktion und Anreicherung lytischer Enzyme.....	32
3.5.1.1	Aufbereitung des Myzels von <i>O. olearius</i> TA 97149.36 als Chitinquelle für die Induktionsversuche	32
3.5.1.2	Screening.....	32

3.5.1.3	Gewinnung der Enzym-Rohextrakte.....	33
3.5.2	Enzymatische Testsysteme zur Charakterisierung der Kulturfiltrate und Enzym-Rohextrakte	34
3.5.2.1	Proteinbestimmung	34
3.5.2.2	Chitinase-Assay mit <i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB)	34
3.5.2.3	Chitinase-Assay mit Nitrophenol-Substraten	35
3.5.2.4	Protease-Assay mit Azocoll.....	35
3.5.2.5	Nachweis von Glucanasen, Cellulasen, Xylanasen und Mannanasen.....	36
3.5.3	Methoden zur biologischen Charakterisierung der Enzym-Rohextrakte	37
3.5.3.1	Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums.....	37
3.5.3.2	Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der enzymatischen Aktivität	37
3.5.3.3	Auswirkung von Metall-Ionen auf die enzymatische Aktivität.....	37
3.5.3.4	Bestimmung der Stabilität der Enzyme	38
3.5.4	Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der Enzym-Rohextrakte	38
3.5.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	38
3.5.4.2	Isoelektrische Fokussierung.....	38
3.5.4.3	Färbemethoden.....	39
3.5.4.4	Konservierung und Dokumentation	39
3.6	Methoden zur Gewinnung von Protoplasten von <i>Omphalotus olearius</i>	40
3.6.1	Kultivierung von <i>O. olearius</i> TA 97149.36	40
3.6.2	Protoplastierung.....	40
4.	ERGEBNISSE ZUR FERMENTATIONSOPTIMIERUNG	41
4.1	<i>Omphalotus olearius</i> als Produzent von Omphalotinen.....	41
4.1.1	Basidiomycet <i>O. olearius</i>	41
4.1.2	Chemotaxonomischer Vergleich verschiedener <i>O. olearius</i> Stämme	41
4.1.3	Detektion von Omphalotinen mittels analytischer HPLC	42
4.1.4	Produktion von Omphalotinen in Standkulturen	44
4.1.5	Produktion von Omphalotinen in Submerskultur	46
4.1.6	Auswahl des Mediums und Pilzstammes für weitere Untersuchungen.....	48
4.2	Isolierung und Charakterisierung der Verbindung 96317B2-A	48
4.2.1	Produktionsstamm	49
4.2.2	Isolierung	49
4.2.3	Physikalisch-chemische Charakterisierung	50
4.2.4	Aminosäureanalyse von 96317B2-A	51
4.2.5	Biologische Charakterisierung	51
4.3	Standardfermentationen	52
4.3.1	Standardfermentation von <i>O. olearius</i> TA 90170	52
4.3.2	Standardfermentation von <i>O. olearius</i> TA 90173	55
4.3.3	Standardfermentation von <i>O. olearius</i> TA 92095	57
4.3.4	Standardfermentation von <i>O. olearius</i> TA 97149	59
4.4	Auswirkung verschiedener komplexer Medien auf die Omphalotin Produktion von <i>O. olearius</i> TA 90170	60
4.4.1	Aminosäureanalyse komplexer N-Quellen	60
4.4.2	Komplexe N-Quellen	64
4.4.3	Gemische komplexer N-Quellen	65
4.4.4	Alternative C-Quellen	66
4.5	Zufütterung von Nährstoffen	67
4.5.1	Wahl des Zeitpunktes für Zufütterungen	67
4.5.2	Einfluß von 2-Deoxyglucose auf die Omphalotin Produktion	68
4.5.3	Zufütterung von Aminosäuren	68
4.5.4	Zufütterung eines Aminosäuregemisches	70
4.5.5	Zufütterung von Mineralsalzen und Spurenelementen	71
4.5.6	Zufütterung von Hefeextrakt	72

4.5.7	Zufütterung von Hefeextrakt-Glucose/Glycerin Gemischen.....	73
4.6	Übertragung der Ergebnisse auf den 15 l Maßstab	74
4.6.1	Einmalige Zufütterung von Hefeextrakt und Glucose (pH 4,1)	74
4.6.2	Kontinuierliche Zufütterung von Hefeextrakt und Glucose.....	77
4.6.3	Kontinuierliche Zufütterung eines Aminosäuregemisches	79
5.	ERGEBNISSE ZUR STAMMOPTIMIERUNG	81
5.1	Isolierung und Rekombination von Einsporkulturen	81
5.1.1	Isolierung der Monokaryoten (Einsporkulturen).....	81
5.1.2	Charakterisierung der Monokaryoten	82
5.1.3	Isolierung von Dikaryoten (Rekombination).....	84
5.1.4	Charakterisierung der Dikaryoten.....	85
5.2	Anreicherung und Charakterisierung lytischer Enzyme zur Gewinnung von Protoplasten.....	87
5.2.1	Ergebnisse des Screenings	87
5.2.2	Auswahl der weiter zu bearbeitenden Stämme	89
5.2.2.1	<i>Trichoderma hamatum</i> CBS 691.74 (TRI-4).....	89
5.2.2.2	<i>Penicillium islandicum</i> ATCC 10127 (PEN-1).....	90
5.2.2.3	<i>Cladobotryum rubrobrunnescens</i> UR 752 (CLAD-2)	92
5.2.3	Gewinnung der Enzym-Rohextrakte.....	93
5.2.4	Biologische Charakterisierung der Enzym-Rohextrakte	94
5.2.4.1	Enzymatische Aktivitäten der Enzym-Rohextrakte	94
5.2.4.1.1	Umsetzung von <i>p</i> -Nitrophenol-Substraten	95
5.2.4.1.2	Zeitkinetik der chitinolytischen Aktivität	97
5.2.4.2	Einfluß des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität	99
5.2.4.3	Einfluß der Temperatur auf die enzymatische Aktivität	102
5.2.4.4	Stabilität der Enzym-Rohextrakte	104
5.2.4.5	Einfluß von Metall-Ionen auf die enzymatische Aktivität.....	106
5.2.5	Physikalisch-chemische Charakterisierung der Enzym-Rohextrakte.....	107
5.2.5.1	SDS-Gelelektrophorese	107
5.2.5.2	Isoelektrische Fokussierung.....	108
5.3	Protoplastierung von <i>Omphalotus olearius</i> TA 97149.36	109
5.3.1	Versuche zur Protoplastierung mittels Novozym 234	109
5.3.2	Versuche zur Protoplastierung mittels der Enzym-Rohextrakte.....	111
5.3.3	Lebensfähigkeit und Regeneration der Protoplasten.....	111
6.	DISKUSSION.....	113
6.1	Taxonomie von <i>Omphalotus olearius</i>	113
6.2	Fermentationsoptimierung	116
6.3	Stammoptimierung	126
7.	ZUSAMMENFASSUNG	138
8.	LITERATUR.....	139
9.	ANHANG	151
9.1	Kalibrationskurven	151
9.1.1	DMAB	151
9.1.2	PAHBAH	151
9.2	Aminosäureanalyse.....	152
9.2.1	Freie Aminosäuren komplexer N-Quellen	152
9.2.2	Gesamt-Aminosäuren komplexer N-Quellen	153
9.2.3	Freie Aminosäuren bei einer Standardfermentation von <i>O. olearius</i> TA 90170	154