

## **Studies on the impact of pH stress during fermentation on the metabolite profile and bioactivity of a potential postbiotic from *Aspergillus oryzae* using the model organism *Drosophila melanogaster* and human innate immunity receptor cell lines**

Vorgelegt von M.Sc. Yvonne Seidler

*Aspergillus oryzae* (AO), allgemein als Koji-Schimmelpilz bekannt, ist seit Jahrhunderten ein wesentlicher Bestandteil von Fermentationsprozessen, insbesondere im asiatischen, südöstlichen Raum. Dieser Pilz spielt eine zentrale Rolle in der Produktion traditioneller Lebensmittel wie Sake, Shoyu, Amazake und Miso, und ermöglicht durch seine enzymatische Aktivität auf Substrate wie Reis oder Sojabohnen die Herstellung einer Vielzahl fermentierter Produkte. Aufgrund seiner charakteristischen Apathogenität und der fehlenden Aflatoxinsynthese ist AO als "Generally Recognized as Safe" (GRAS) klassifiziert.

In der vorliegenden Studie wird ein natürliches aus AO gewonnenes Extrakt analytisch charakterisiert und als zentraler Forschungsaspekt dessen postbiotische Potenzial herausgearbeitet. Postbiotika sind definiert als Präparate, die aus inaktivierten mikrobiellen Zellen, Zellbestandteilen und/oder Metaboliten bestehen, die während eines Fermentationsprozesses von lebenden Mikroorganismen freigesetzt werden, und für einen Wirt potenziell gesundheitliche Vorteile bieten. Im Fokus dieser Studie steht dabei ein AO-Extrakt, der in einem speziellen, zweistufigen Fermentationsprozess gewonnen wird. Hierbei zeichnet sich die zweite Fermentationsphase durch eine signifikante Erhöhung des pH-Wertes aus, wodurch für den Pilz ein Stresszustand induziert wird. Der Einfluss dieses pH-Wertanstiegs während des Fermentationsprozesses wurde auf verschiedene Parameter getestet.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die pH-Erhöhung während der Fermentation von AO signifikante Veränderungen in der antioxidativen Kapazität des Extrakts bewirkt. Ebenso stieg nach der Stressinduktion der Gesamtphenolgehalt der AO-Proben signifikant an. Die Analyse der primären und sekundären Metaboliten ergab deutlich abgegrenzte Cluster zwischen den Pre- und Post-Stress-AO-Proben, welche die identifizierten Unterschiede im Metabolitenprofil verdeutlichen. Zusätzlich wurde eine signifikante Reduktion in den Konzentrationen mehrerer Aminosäuren, darunter Asparagin, Histidin, Glutamin und Arginin, festgestellt. In Reporterzelllinien zeigten Post-Stress-AO-Proben im Gegensatz zu den entsprechenden Pre-Stress-AO-Proben immunmodulatorische Aktivitäten auf die humanen Toll-like-Rezeptor hTLR2 und hTLR4 sowie den hDectin-1a-Rezeptor. Größenausschlusschromatographien, Extraktionen, Fällungen, <sup>1</sup>H-NMR und Glykosidverknüpfungsanalysen der Polysaccharide lieferten Hinweise darauf, dass hoch- und niedermolekulare wasserlösliche Moleküle, vermutlich Mannose-haltige  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polysaccharide, in den Post-Stress-AO-Proben als potenzielle immunmodulierende Wirkstoffe fungieren könnten.

Der zweite Teil der Studie widmete sich der bioaktiven Wirkung des Post-Stress-AO Extrakts im Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. Eine 5%ige Supplementierung des Mediums mit dem Extrakt zeigte keine signifikanten Veränderungen des Körpergewichts und der Triglycerid-, Protein- und Glucosewerte. Die Gehalte an Mengen- und Spurenelementen der Fliegen blieb durch die Post-Stress-AO-Behandlung ebenfalls weitgehend unverändert. Die durchgeführte Mikrobiomanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, offenbarte aber zeitabhängige Veränderungen in der relativen Häufigkeit von *Acetobacter thailandicus*. Durch die Post-Stress-AO-Supplementierung verbesserte sich zudem die Hitzetoleranz und Reproduktion der Fliegen deutlich, was sich in einer erhöhten Überlebensrate und einer signifikanten Steigerung der Eiablage um 19% bei 25°C und 26% bei 29°C manifestierte. Genexpressionsanalysen zeigten, dass die Supplementierung mit Post-Stress-AO signifikante Veränderungen in der Expression bestimmter Gene, insbesondere von Metallthioneinen, unter Hitzestress bewirkte, was auf eine adaptive Reaktion auf die Post-Stress-AO-Supplementierung hindeutet.

Die Studie unterstreicht die Bedeutung der pH-Erhöhung während der Fermentation von AO, da sie zu Veränderungen im Metaboliten- und Polysaccharidprofil führt, die wiederum mit einer gesteigerten antioxidativen Kapazität und immunmodulierenden Wirkung einhergehen. Die in der Zellkultur und Fruchtfliege beobachteten Bioaktivitäten erweitern unser Verständnis von AO als Postbiotikum, insbesondere in den Bereichen Immunmodulation, Stressresistenz und Reproduktion.