

**Zellkultur von Shiitake -
Schwefelmetabolismus und Lentinsäurebildung im
Speisepilz *Lentinus edodes***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

Sabine Spaether

geboren am 18. Juni 1968 in Herford

Hannover 2000

Referent: Prof. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. W. Horst

Tag der Promotion: 15. Juni 2000

Datum der Veröffentlichung: Juni 2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1997 bis April 2000 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. R. G. Berger für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit und für die guten Arbeitsbedingungen am Institut. Auch bedanke ich mich für seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut, vor allem meinem Labornachbarn Herrn Jan Taubert, danke ich für das gute und freundschaftliche Verhältnis und den stets hilfsbereiten Umgang sowie die anregenden Diskussionen.

Herrn Dr. Jens Onken und Herrn Dr. Andreas Böker sowie Herrn Dr. Ulrich Krings möchte ich für die zahlreichen praktischen Hilfestellungen im Umgang mit Basidiomyceten danken.

Herrn Dr. Daniel Häußinger danke ich für die Durchführung der NMR-Experimente.

Mein herzlicher Dank gilt ferner Frau Manuela Fischer, Frau Dr. Elke Latza, Frau Dr. Frauke Neuser für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen Aktivitäten auch außerhalb des Institutes.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, die mich in jeder Weise immer unterstützt haben und deren Vertrauen und Zuversicht in mich vieles ermöglicht haben.

Von ganzem Herzen und in Liebe danke ich meinem Mann Wolf. Sein Optimismus hat mir auch in Durststrecken geholfen, nicht aufzugeben. Seine Geduld und sein Verständnis sowie die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit haben wesentlich zum Gelingen beigetragen.

Zusammenfassung

Die Nährstoffansprüche eines Stammes des Speisepilzes *Lentinus edodes* (Shiitake) wurden in Submerskultur durch empirische Vorgehensweise ermittelt und die Produktion von Biomasse mit Hilfe statistischer Versuchspläne (PLACKETT-BURMAN-Design) weiter optimiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß verschiedene Zuckersäuren auch in polymerer Form sowie Calcium und Mangan das Wachstum positiv beeinflussten. Die Kultivierung im Bioreaktor stellte eine erste „upscaling“-Stufe dar, mit der eine vergleichbar gute Ausbeute an Biomasse erzielt werden konnte. Dies ist besonders im Hinblick auf die industrielle Kultivierung des untersuchten Stammes von Interesse, da das Pilzmycel als Inoculum für eine schnelle Besiedlung des entsprechenden Substrats in ausreichender Menge zur Verfügung stehen muß. Das optimierte Nährmedium war darüber hinaus für den Einsatz zur Fruchtkörpererzeugung geeignet, wie Versuche im Labormaßstab bestätigen konnten.

Aus dem Aromaprecursor Lentinsäure entstehen durch enzymatischen Abbau cyclische und nicht-cyclische Polysulfide, die dem Shiitake sein charakteristisches Aroma nach Knoblauch und Rettich verleihen. Die nach einer literaturbeschriebenen Methode isolierte Lentinsäure, deren Identität durch Elementaranalyse, IR und NMR abgesichert wurde, wurde als Standardsubstanz zur Entwicklung einer quantitativen Analysenmethode verwendet. Die Bestimmung aller Aminosäuren einschließlich der Lentinsäure aus den Submerskulturen verschiedener Stämme von *Lentinus edodes* gelang durch Vorsäulenderivatisierung mit FMOC/ADAM mit anschließender Analyse per RP-HPLC und Fluoreszenzdetektion.

Eine Steigerung des Lentinsäuregehaltes konnte bei fast allen untersuchten Stämmen durch Zusatz von schwefelhaltigen Precursoren erzielt werden. Dabei erwiesen sich die Aminosäure L-Methionin als effektiver organischer und Natriumsulfid bzw. -thiosulfat als effektive anorganische Precursoren. Trotz der im Standardnährmedium im Überschuss vorhandenen Schwefelquelle in Form von Sulfat (ca. 12 mmol L^{-1}), konnte durch den Zusatz geringer Mengen des Precursors zum Nährmedium (1 mmol L^{-1}) der Lentinsäuregehalt im Falle des Methionins um mehr als 30% und im Falle von Natriumsulfid bzw. -thiosulfat um mehr als 70% bzw. 50% gesteigert werden. Ein Vergleich der Kultivierung in schwefelfreiem mit einem Nährmedium unter Zusatz anorganischer Schwefelquellen zeigte, daß *Lentinus edodes* die Biosynthese der Lentinsäure mit Hilfe von Sulfat realisieren kann.

Ein Vergleich zwischen Fruchtkörpern und Submerskultur konnte bei der Analyse des endogenen Metabolits Lentinsäure vor allem quantitative Unterschiede aufdecken, die sich auch bei der Gewinnung der Aromastoffe fortsetzte. In den gewonnenen Aromaextrakten aus frischen Shiitake und den Submerskulturen wurden als Hauptkomponenten die drei cyclischen Polysulfide 1,2,4-Trithiolan, 1,2,4,5-Tetrathian und 1,2,3,5,6-Pentathiepan (Lenthionin) identifiziert. Bei der olfaktorischen Untersuchung ergaben sich für diese drei Verbindungen charakteristische Gerüche nach Knoblauch und Rettich, die für das Shiitake-Aroma typisch sind.

Schlagworte: *Lentinus edodes*, Nährmedienoptimierung, Lentinsäure, schwefelhaltige Precursoren, schwefelhaltige Aromastoffe

Summary

The demand in terms of nutrients of the edible mushroom *Lentinus edodes* had been determined empirically from submerged cultivation, and the production of biomass could be optimized with help of statistical experimental setups (PLACKETT-BURMAN-design).

It was found that different uronic and aldonic acids even with polymeric structure, calcium and manganese have a positive influence on the growth behaviour. Cultivation in a 5 L-fermentor as a first scale up step showed comparable yields of biomass. This is of special interest for the industrial cultivation of the Shiitake since the mycelium as inoculum has to be provided in sufficient amounts in order to achieve a fast growth on special substrates. The optimized nutrition medium can be used for the formation of mushroom fruiting bodies as experiments on lab scale could show.

The flavour precursor Lentinic acid is converted into cyclic and non-cyclic polysulfides via enzymatic processes and give the Shiitake its typical flavour of garlic and radish. Lentinic acid could be isolated according to literature known methods and was used as a standard substance for the development of a quantitative analytical method. The determination of the whole set of amino acids, including lentinic acid, according to this method could be achieved by precolumn derivatization with FMOC/ADAM with subsequent analysis via RP-HPLC and fluorescence detection.

Increase of the amount of lentinic acid could be achieved at almost all examined Shiitake strains with addition of sulfur containing precursors. Despite of the abundance of sulfates (about 12 mmole L⁻¹) in the standard nutrition medium, the amount of lentinic acid could be increased with addition of methionine by 30%, in the case of sodium sulfide and sodium thiosulfate by 70 % resp. by 50 %. Comparison of the cultivation in sulfur free and inorganic sulfur containing nutrition media showed that the biosynthesis of lentinic acid can be achieved with sulfate.

Comparison between fruiting bodies and the submerged cultures showed only quantitative differences with respect to the endogenous metabolite lentinic acid and showed the same trend at the isolation of the aroma compounds. The aroma extracts out of fresh Shiitake and submerged cultures showed that the three cyclic polysulfides 1,2,4-trithiolane, 1,2,4,5-tetrathiane and 1,2,3,5,6-pentathiepane (lenthionine) are major components. The GC-Olfactometry of the three compounds showed the characteristic flavour of garlic and radish - typical for the Shiitake aroma.

Key words: *Lentinus edodes*, optimization of nutrition medium, lentinic acid, sulfur containing flavour compounds

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abbildungsverzeichnis | VII |
| Tabellenverzeichnis | XI |
| Abkürzungsverzeichnis | XIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Problemstellung | 3 |
| 2 Ergebnisse | 5 |
| 2.1 Untersuchungen zu den Kultivierungsbedingungen | 5 |
| 2.1.1 Vorbemerkung | 5 |
| 2.1.2 Variation physikalischer Kulturparameter | 6 |
| 2.1.2.1 Temperatur | 6 |
| 2.1.2.2 Sauerstoffversorgung | 6 |
| 2.1.3 Variation des Nährmediums SNL-H | 7 |
| 2.1.3.1 Hefeextrakt | 7 |
| 2.1.3.2 Glutamin | 8 |
| 2.1.3.3 Sterilfiltriertes SNL-H-Medium | 9 |
| 2.1.3.4 Holzmehl-Medium | 10 |
| 2.1.4 Variation des Nährmediums SNL-B ₁ | 12 |
| 2.1.4.1 Kulturverlauf in SNL-B ₁ und SNL-B ₁ -Gln | 12 |
| 2.1.4.2 Variation der Stickstoffquelle in SNL-B ₁ | 13 |
| 2.1.4.3 Variation der Kohlenstoffquelle in SNL-B ₁ | 14 |
| 2.1.4.4 Ethanol als C-Quelle in SNL-B ₁ | 14 |
| 2.1.5 Komplexe Nährmedien | 15 |
| 2.1.5.1 Shiitake-Medium | 15 |
| 2.1.5.2 Malzextrakt-Sojapepton-Medium | 16 |
| 2.1.6 Definierte Nährmedien | 17 |
| 2.1.6.1 Synthetisches Medium nach LEATHAM | 17 |
| 2.1.6.2 Variation der Inoculummenge | 19 |
| 2.1.7 Kultivierung von <i>Lentinus edodes</i> im Laborbioreaktor | 21 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2 Einsatz faktorieller Versuchspläne zur Optimierung von LEATHAM-Medium | 22 |
| 2.2.1 Plackett-Burman-Design | 22 |
| 2.2.1.1 Vorbemerkung | 22 |
| 2.2.1.2 Aufstellung des Versuchsplans | 23 |
| 2.2.1.3 Wachstumskurve und Effekte des PLACKETT-BURMAN-Designs 1 | 25 |
| 2.2.1.4 Versuchsplan für PLACKETT-BURMAN-Design 2 | 28 |
| 2.2.1.5 Wachstumskurve und Effekte des PLACKETT-BURMAN-Designs 2 | 30 |
| 2.2.2 Optimierung des LEATHAM-Mediums | 33 |
| 2.2.2.1 Glucuronsäure | 33 |
| 2.2.2.2 Mangan | 36 |
| 2.2.2.3 Fruchtkörpererzeugung mit optimiertem Kulturmedium | 37 |
| 2.3 Isolierung, Charakterisierung und Analytik des Aromaprecursors | |
| Lentinsäure | 38 |
| 2.3.1 Vorbemerkungen | 38 |
| 2.3.2 Isolierung aus Fruchtkörpern | 39 |
| 2.3.3 Charakterisierung der Lentinsäure | 41 |
| 2.3.3.1 Elementaranalyse | 41 |
| 2.3.3.2 IR-Spektrum | 41 |
| 2.3.3.3 NMR-Spektren | 43 |
| 2.3.3.4 Massenspektrum | 45 |
| 2.3.4 Analytik der Lentinsäure | 46 |
| 2.3.4.1 Vorbemerkung | 46 |
| 2.3.4.2 Aufarbeitung der Submerskulturen zur Lentinsäure-Bestimmung | 46 |
| 2.3.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie | 48 |
| 2.4 Zusatz von Precursoren zur Steigerung des Lentinsäuregehaltes | 50 |
| 2.4.1 Vorbemerkung | 50 |
| 2.4.2 Aminosäuregehalte in Submerskulturen von <i>Lentinus edodes</i> | 51 |
| 2.4.3 Lentinsäuregehalte aus Submerskulturen ohne Zusatz von Precursoren | 53 |
| 2.4.4 Zusatz von L-Cystein | 54 |
| 2.4.4.1 Bestimmung der Lentinsäuregehalte | 54 |
| 2.4.4.2 Bestimmung der Cysteingehalte | 59 |
| 2.4.5 Zusatz von L-Methionin | 61 |
| 2.4.5.1 Einfluß der Konzentration von L-Methionin | 66 |
| 2.4.6 Lentinsäuregehalte in schwefelfreiem LEATHAM-Medium | 68 |
| 2.4.7 Zusatz von anorganischen Precursoren | 74 |
| 2.4.7.1 Natriumsulfid | 75 |
| 2.4.7.2 Natriumthiosulfat | 76 |

| | |
|--|------------|
| 2.5 Untersuchungen des Aromaprofils von <i>Lentinus edodes</i> | 77 |
| 2.5.1 Gewinnung des Aromaextraktes aus frischen Shiitake | 77 |
| 2.5.2 Untersuchung des Aromaextrakte aus frischen Shiitake | 79 |
| 2.5.2.1 GC-AED und GC-MS | 79 |
| 2.5.3 Gewinnung des Aromaextraktes aus Submerskulturen | 87 |
| 2.5.4 Untersuchung des Aromaextrakte aus Submerskulturen | 88 |
| 2.5.4.1 GC-AED und GC-MS | 88 |
| 2.5.4.2 Olfaktorische Eigenschaften des Aromaextraktes aus frischen Shiitake-Fruchtkörpern | 89 |
| 3 Diskussion | 91 |
| 3.1 Biotechnologischer Einsatz von Basidiomyceten | 91 |
| 3.2 Optimierung physikalischer Parameter und der Nährmedienzusammensetzung | 92 |
| 3.2.1 Temperatur | 93 |
| 3.2.2 Sauerstoffversorgung | 94 |
| 3.2.3 Medienzubereitung | 94 |
| 3.2.4 C-Quelle | 95 |
| 3.2.4.1 Heterotrophe Ernährung bei Pilzen | 95 |
| 3.2.4.2 Variation der C-Quelle | 96 |
| 3.2.5 N-Quelle | 97 |
| 3.2.6 Definiertes Nährmedium nach LEATHAM | 99 |
| 3.2.6.1 Glucuronsäure, Gluconsäure, Galakturonsäure, Pektin | 99 |
| 3.2.7 Anorganische Substanzen mit Ausnahme von Schwefel | 101 |
| 3.2.7.1 Mangan | 102 |
| 3.2.7.2 Calcium | 103 |
| 3.2.7.3 Vitamine und Wachstumsfaktoren | 104 |
| 3.2.7.4 Bioreaktorversuche zur Prozeßvergrößerung | 105 |
| 3.2.7.5 Fruchtkörpererzeugung mit optimiertem LEATHAM-Medium | 107 |
| 3.3 Der Aromaprecursor Lentinsäure | 109 |
| 3.3.1 Vorkommen, Struktur und Isolierung | 109 |
| 3.3.2 Isolierung der Lentinsäure | 111 |
| 3.3.3 Biosynthese von γ -Glytamylopeptiden | 113 |
| 3.3.4 Schwefelmetabolismus | 114 |
| 3.3.4.1 Schwefelassimilation | 115 |
| 3.3.4.2 Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren und Peptide | 116 |
| 3.3.4.3 Möglicher Bildungsweg für Cysteinsulfoxidderivate | 117 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.5 | Precursorstudien bei <i>Lentinus edodes</i> | 117 |
| 3.3.5.1 | Lentinsäuregehalte in Nährmedium mit sulfathaltiger S-Quelle | 117 |
| 3.3.5.2 | Lentinsäuregehalte in Nährmedium ohne Schwefel-Quelle | 118 |
| 3.3.5.3 | Organische Precursoren | 120 |
| 3.3.5.4 | Anorganische Precursoren | 122 |
| 3.3.5.5 | Schwefelbilanz | 123 |
| 3.3.5.6 | Kritische Betrachtung von Precursorexperimenten | 123 |
| 3.3.6 | Die Aromastoffe in Shiitake | 124 |
| 3.3.6.1 | C ₈ -Verbindungen | 124 |
| 3.3.6.2 | Schwefelhaltige Aromastoffe | 126 |
| 3.3.6.3 | Physiologische Bedeutung der Aromastoffe | 129 |
| 3.3.6.4 | Aromaextrakte aus Submerskulturen | 129 |
| 3.4 | Ausblick | 130 |
| 4 | Material und Methoden | 132 |
| 4.1 | Untersuchungsmaterial | 132 |
| 4.2 | Pilzkulturen | 132 |
| 4.3 | Kultivierung | 133 |
| 4.3.1 | Stammhaltung | 133 |
| 4.3.2 | Standardbedingungen für Submerskulturen | 133 |
| 4.3.3 | Vorkulturen | 133 |
| 4.3.3.1 | Vorkulturen 1 | 133 |
| 4.3.3.2 | Vorkulturen 2 | 133 |
| 4.3.3.3 | Vorkulturen 3 | 134 |
| 4.3.4 | Experimentelle Kulturen | 134 |
| 4.3.5 | Inoculumbereitung | 134 |
| 4.3.6 | Zusatz von Precursoren | 134 |
| 4.3.7 | Kultivierung im Bioreaktor | 135 |
| 4.3.8 | Kultivierung zur Fruchtkörpererzeugung | 135 |
| 4.3.9 | Kulturparameter | 136 |
| 4.3.9.1 | pH-Wert | 136 |
| 4.3.9.2 | Glucosegehalt | 136 |
| 4.3.9.3 | Biotrockenmasse | 136 |
| 4.4 | Kulturmedien | 136 |
| 4.4.1 | Herstellung steriler Kulturmedien | 136 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.4.2 | Standardkulturmedien | 137 |
| 4.4.2.1 | Standardnährlösung-B ₁ | 137 |
| 4.4.2.2 | Standardnährmedium-Hefe | 137 |
| 4.4.2.3 | SNL-H-Agar | 137 |
| 4.4.2.4 | LEATHAM-Medium | 138 |
| 4.4.3 | Nährmedien | 139 |
| 4.4.3.1 | SNL-H-doppelt | 139 |
| 4.4.3.2 | Holzmehl-Medium | 139 |
| 4.4.3.3 | SNL-H-Gln | 139 |
| 4.4.3.4 | SNL-B ₁ -N | 139 |
| 4.4.3.5 | SNL-B ₁ -C | 139 |
| 4.4.3.6 | Shiitake-Medium | 139 |
| 4.4.3.7 | Malzextrakt-Sojapepton-Medium | 140 |
| 4.4.3.8 | LEATHAM-Medium-schwefelfrei | 140 |
| 4.4.3.9 | LEATHAM-Medium mit variierter C-Quelle | 140 |
| 4.4.3.10 | LEATHAM-Medium mit variierten Mangan-Konzentrationen | 140 |
| 4.4.3.11 | Optimiertes LEATHAM-Medium | 141 |
| 4.4.3.12 | Faktorieller Versuchplan (PLACKETT-BURMAN-Design) | 141 |
| 4.4.4 | Nährmedienbestandteile | 141 |
| 4.5 | Geräte in der Mikrobiologie | 144 |
| 4.5.1 | Steriles Arbeiten | 144 |
| 4.5.2 | Kultivierung | 144 |
| 4.5.3 | Aufarbeitung | 144 |
| 4.5.4 | Bioreaktor | 145 |
| 4.6 | Chemikalien, Lösungsmittel, Gase und sonstige Geräte | 145 |
| 4.6.1 | Chemikalien | 145 |
| 4.6.2 | Lösungsmittel | 146 |
| 4.6.3 | Gase | 147 |
| 4.6.4 | Sonstige Laborgeräte | 147 |
| 4.7 | Probenvorbereitung | 147 |
| 4.7.1 | Aufarbeitung von Pilzen für die Isolierung von Lentinsäure | 147 |
| 4.7.1.1 | Rohextrakt aus getrockneten Fruchtkörpern | 147 |
| 4.7.1.2 | Rohextrakt aus frischen Fruchtkörpern | 148 |
| 4.7.1.3 | IR 120-Extrakt | 148 |
| 4.7.1.4 | Sephadex [®] DEAE A-25-Extrakt | 148 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.7.2 | Aufarbeitung von Pilzen zur Gewinnung der Aromastoffe | 149 |
| 4.7.2.1 | Rohextrakt | 149 |
| 4.7.2.2 | Kontinuierliche Flüssig/Flüssig-Extraktion | 149 |
| 4.7.2.3 | Soxhlet-Extraktion | 149 |
| 4.7.3 | Aufarbeitung von Pilzmycel aus Submerskulturen für die HPLC | 150 |
| 4.7.4 | Aufarbeitung von Pilzmycel aus dem Bioreaktor | 150 |
| 4.8 | Analytik | 151 |
| 4.8.1 | Ionenaustauschchromatographie | 151 |
| 4.8.1.1 | Stark saurer Kationenaustauscher Amberlite IR 120 | 151 |
| 4.8.1.2 | Schwach basischer Anionenaustauscher Sephadex® DEAE A-25 | 151 |
| 4.8.2 | Dünnschichtchromatographie | 152 |
| 4.8.3 | Hochleistungsflüssigchromatographie | 152 |
| 4.8.3.1 | HPLC mit Fluoreszenzdetektor | 152 |
| 4.8.3.2 | Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie | 153 |
| 4.8.4 | Kapillargaschromatographie | 154 |
| 4.8.4.1 | HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion | 154 |
| 4.8.4.2 | HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor | 154 |
| 4.8.4.3 | HRGC mit Atom-Emission-Detektor | 155 |
| 4.8.4.4 | Berechnung von Kovats-Indices | 155 |
| 4.8.5 | Elementaranalyse | 156 |
| 4.8.6 | Spektroskopische Methoden | 156 |
| 4.8.6.1 | Infrarot-Spektroskopie | 156 |
| 4.8.6.2 | Kernresonanzspektroskopie | 156 |
| 4.9 | Entsorgungshinweise | 157 |
| 4.9.1 | Biologisches Material | 157 |
| 4.9.2 | Lösungsmittel und Chemikalien | 157 |
| 5 | Literatur | 158 |
| 6 | Anhang | 167 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----|
| Abb 2-1 | Trockenmassegehalte in Abhängigkeit von der Kulturtemperatur | 6 |
| Abb 2-2 | Kulturverlauf in Schikanekolben | 7 |
| Abb 2-3 | Kulturverlauf in SNL-H-Medium mit 6,0 g L ⁻¹ Hefeextrakt | 8 |
| Abb 2-4 | Kulturverlauf in SNL-H-Medium mit Glutamin als Stickstoffquelle | 9 |
| Abb 2-5 | Kulturverlauf in sterilfiltriertem SNL-H-Medium | 10 |
| Abb 2-6 | Kulturverlauf von SNL-H-Holzmehl-Medium | 11 |
| Abb 2-7 | Kulturverlauf von Weserchamp und A 20-5 in SNL-B ₁ und SNL-B ₁ -Gln | 12 |
| Abb 2-8 | Kulturverlauf von Weserchamp und von A 20-5 in SNL-B ₁ -Ammoniumsulfat und SNL-B ₁ -Universalpepton | 13 |
| Abb 2-9 | Kulturverlauf von Weserchamp und von A 20-5 in SNL-B ₁ -Maltose und SNL-B ₁ -Stärke | 14 |
| Abb 2-10 | Kulturverlauf in SNL-B ₁ -Ethanol | 15 |
| Abb 2-11 | Kulturverlauf in Shiitake-Medium | 16 |
| Abb 2-12 | Kulturverlauf in Malzextrakt-Sojapepton-Medium | 17 |
| Abb 2-13 | Kulturverlauf in LEATHAM-Medium | 18 |
| Abb 2-14 | pH-Wert von Weserchamp und A 20-5; Glucoseverbrauch von Weserchamp und A 20-5 während des Kulturverlaufs in LEATHAM-Medium | 19 |
| Abb 2-15 | Kulturverlauf in LEATHAM-Medium bei verschiedenen Inoculummengen | 20 |
| Abb 2-16 | Kultivierung von <i>Lentinus edodes</i> Weserchamp im Labor-Bioreaktor | 22 |
| Abb 2-17 | Kulturverläufe der Versuche des PLACKETT-BURMAN-Designs 1 | 26 |
| Abb 2-18 | Effekte verschiedener Medienbestandteile am 6. Kulturtag | 27 |
| Abb 2-19 | Effekte verschiedener Medienbestandteile 21. Kulturtag | 28 |
| Abb 2-20 | Kulturverläufe der Versuche des PLACKETT-BURMAN-Designs 2 | 30 |
| Abb 2-21 | pH-Werte im Kulturverlauf des PLACKETT-BURMAN-Designs 2 | 31 |
| Abb 2-22 | Effekte von Mn, Zn Fe und Cu im PLACKETT-BURMAN-Design 2 | 32 |
| Abb 2-23 | Effekte von Co, Mo, Ni und Sn im PLACKETT-BURMAN-Design 2 | 33 |
| Abb 2-24 | Kulturverlauf von Weserchamp in LM, LM-Galakturonsäure und LM-Gluconsäure | 34 |
| Abb 2-25 | Kulturverlauf von Weserchamp in LEATHAM-Medium | 35 |

| | | |
|----------|---|----|
| Abb 2-26 | Kulturverlauf von Weserchamp in LEATHAM-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mn | 36 |
| Abb 2-27 | Fruchtkörper von <i>Lentinus edodes</i> in LEATHAM-Medium (optimiert) | 38 |
| Abb 2-28 | Aromaprecursor Lentinsäure | 39 |
| Abb 2-29 | Isolierungsschema für die Gewinnung von Lentinsäure aus getrockneten Shiitake-Fruchtkörpern | 40 |
| Abb 2-30 | IR-Spektrum der isolierten Lentinsäure als KBr-Preßling | 42 |
| Abb 2-31 | Vergrößerter Ausschnitt des ESI-MS-Spektrums von Lentinsäure | 46 |
| Abb 2-32 | Aufarbeitungsschema der Submerskulturen zur Bestimmung von Lentinsäure | 47 |
| Abb 2-33 | Übersicht der Reaktionswege von FMOC-Cl bei der Derivatisierung von Aminosäuren | 48 |
| Abb 2-34 | Standardchromatogramm der Aminosäuren und Lentinsäure als FMOC-Derivate | 49 |
| Abb 2-35 | Kalibriergerade Lentinsäure als FMOC-Derivat | 49 |
| Abb 2-36 | AS-Chromatogramme verschiedener Stämme von <i>Lentinus edodes</i> in Submerskultur | 52 |
| Abb 2-37 | Lentinsäuregehalte von Submerskulturen der Stämme Weserchamp, 389.89 und 530.90 | 53 |
| Abb 2-38 | Lentinsäuregehalte von Submerskulturen der Stämme 225.51, 808.91, A 20-5 und A 20-8 | 54 |
| Abb 2-39 | Lentinsäuregehalte von Weserchamp | 55 |
| Abb 2-40 | Lentinsäuregehalte von 389.89 | 56 |
| Abb 2-41 | Lentinsäuregehalte von 530.90 | 56 |
| Abb 2-42 | Lentinsäuregehalte von 225.51 | 57 |
| Abb 2-43 | Lentinsäuregehalte von 808.91 | 57 |
| Abb 2-44 | Lentinsäuregehalte von A 20-5 | 58 |
| Abb 2-45 | Lentinsäuregehalte von A 20-8 | 59 |
| Abb 2-46 | Im Medium verbliebenes L-Cystein in Submerskulturen von 530.90 | 60 |
| Abb 2-47 | Cysteingehalte in Submerskulturen ohne Zusatz | 61 |
| Abb 2-48 | Cysteingehalte in Submerskulturen nach Zusatz von L-Cystein | 61 |
| Abb 2-49 | Lentinsäuregehalte von Weserchamp | 62 |
| Abb 2-50 | Lentinsäuregehalte von 225.51 | 63 |

| | | |
|----------|---|----|
| Abb 2-51 | Lentinsäuregehalte von 389.89 | 64 |
| Abb 2-52 | Lentinsäuregehalte von 530.90 | 64 |
| Abb 2-53 | Lentinsäuregehalte von A 20-5 | 65 |
| Abb 2-54 | Lentinsäuregehalte von A 20-8 | 66 |
| Abb 2-55 | Lentinsäuregehalte von Weserchamp | 67 |
| Abb 2-56 | Feuchtmassen in schwefelfreiem LEATHAM-Medium | 69 |
| Abb 2-57 | Lentinsäuregehalte von Weserchamp in schwefelfreiem und schwefelhaltigem LEATHAM-Medium | 69 |
| Abb 2-58 | Lentinsäuregehalte von 225.51 in schwefelfreiem und schwefelhaltigem LEATHAM-Medium | 70 |
| Abb 2-59 | Lentinsäuregehalte von 389.89 in schwefelfreiem und schwefelhaltigem LEATHAM-Medium | 71 |
| Abb 2-60 | Lentinsäuregehalte von 530.90 in schwefelfreiem und schwefelhaltigem LEATHAM-Medium | 72 |
| Abb 2-61 | Lentinsäuregehalte von 808.91 in schwefelfreiem und schwefelhaltigem LEATHAM-Medium | 72 |
| Abb 2-62 | Lentinsäuregehalte von A 20-5 in schwefelfreiem und schwefelhaltigem LEATHAM-Medium | 73 |
| Abb 2-63 | Lentinsäuregehalte von A 20-8 in schwefelfreiem und schwefelhaltigem LEATHAM-Medium | 74 |
| Abb 2-64 | Lentinsäuregehalte von Weserchamp | 75 |
| Abb 2-65 | Lentinsäuregehalte von Weserchamp | 76 |
| Abb 2-66 | Fließschema zur Gewinnung der Aromaextrakte aus frischen Shiitake | 78 |
| Abb 2-67 | GC-AED-Chromatogramm des Aromaextraktes (Flüssig/Flüssig-Extraktion) aus frischen Shiitake | 80 |
| Abb 2-68 | GC-AED-Chromatogramm des Aromaextraktes (Soxhlet-Extraktion) aus frischen Shiitake | 81 |
| Abb 2-69 | Massenspektrum von 1,2,3,4-Tetrathiolan | 84 |
| Abb 2-70 | Massenspektrum von 2,4,6,7-Tetrathiaoctan-2,2-dioxid | 85 |
| Abb 2-71 | Massenspektrum von 2,3,5,7,9-Pentathiadecan-2,2-dioxid | 86 |
| Abb 2-72 | Massenspektrum von 4-Oxo-1,2,4-Trithiolan | 86 |
| Abb 2-73 | Fließschema zur Gewinnung der Aromaextrakte aus Submerskulturen von <i>Lentinus edodes</i> Stamm Weserchamp | 87 |

| | | |
|----------|--|-----|
| Abb 2-74 | AED-Gaschromatogramm der Shiitake-Fruchtkörper und Submerskultur Weserchamp | 88 |
| Abb 3-1 | Aktivierung von D-Glucuronsäure und D-Galakturonsäure | 100 |
| Abb 3-2 | Bildungswege für γ -Glutamylpeptide im γ -Glutamylzyklus | 113 |
| Abb 3-3 | Assimilatorische Sulfatreduktion | 115 |
| Abb 3-4 | Modell der möglichen Schwefelmetabolismuswege | 116 |
| Abb 3-5 | Hypothetischer Biogeneseweg von 1-Octen-3-ol in Pilzen | 125 |
| Abb 3-6 | Kondensation von Sulfensäure zu Thiosulfinaten | 126 |
| Abb 3-7 | Biogenese schwefelhaltiger Aromastoffe aus Lentinsäure (modifiziert) | 127 |
| Abb 3-8 | Hypothetischer Bildungsweg für 2,3,5,7,9-Pentathiadecan-9,9-dioxid | 128 |
| Abb 3-9 | Schwefel-Sauerstoffverbindungen aus Aromaextrakten von Shiitake | 128 |
| Abb 6-1 | ^1H -NMR Spektrum der Lentinsäure | 167 |
| Abb 6-2 | ^{13}C -NMR Spektrum der Lentinsäure | 168 |
| Abb 6-3 | $^1\text{H}^1\text{H}$ -Korrelationsspektrum der Lentinsäure | 169 |
| Abb 6-4 | ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektrum der Lentinsäure | 170 |
| Abb 6-5 | Massenspektrum von 1,2,3,4,5-Pentathian (10) | 170 |
| Abb 6-6 | Massenspektrum von 1,2,3,4,6-Pentathiepan (12) | 171 |
| Abb 6-7 | Massenspektrum von Dimethyltrisulfid (2) | 171 |
| Abb 6-8 | Massenspektrum von 1,2,4-Trithiolan (3) | 172 |
| Abb 6-9 | Massenspektrum von Methyl(methylthio)methyldisulfid (4) | 172 |
| Abb 6-10 | Massenspektrum von 1,2,4,5-Tetrathian (6) | 173 |
| Abb 6-11 | Massenspektrum von 2,3,5,6-Tetrathiaheptan (7) | 173 |
| Abb 6-12 | Massenspektrum von 1,2,3,5,-Tetrathian (8) | 174 |
| Abb 6-13 | Massenspektrum von 1,2,4,6-Tetrathiepan (11) | 174 |
| Abb 6-14 | Massenspektrum von 1,2,3,5,6-Pentathiepan (Lenthionin) (13) | 175 |
| Abb 6-15 | Massenspektrum von 1,2,3,4,5,6-Hexathiepan (14) | 175 |
| Abb 6-16 | Massenspektrum von 1,2,4,5,7-Pentathiocan (15) | 176 |
| Abb 6-17 | Massenspektrum von 1,2,3,5,6,8-Hexathionan (17) | 176 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----|
| Tab 2-1 | PLACKETT-BURMAN-Versuchsplan | 24 |
| Tab 2-2 | Medienparameter und Konzentrationsstufen für das PLACKETT-BURMAN-Design 1 | 25 |
| Tab 2-3 | Medienparameter und Konzentrationsstufen für das PLACKETT-BURMAN-Design 2 | 29 |
| Tab 2-4 | Versuchsanordnungen und Erträge der Kultivierung zur Fruchtkörpererzeugung | 37 |
| Tab 2-5 | Elementaranalyse der isolierten Lentinsäure | 41 |
| Tab 2-6 | ¹ H-NMR-Daten von Lentinsäure | 43 |
| Tab 2-7 | ¹³ C-NMR-Daten von Lentinsäure | 44 |
| Tab 2-8 | Übersicht über die untersuchten Stämme von <i>Lentinus edodes</i> | 50 |
| Tab 2-9 | Gegenüberstellung der schwefelhaltigen und schwefelfreien Medienbestandteile des LEATHAM-Mediums | 68 |
| Tab 2-10 | Schwefelverbindungen aus dem Aromaextrakt frischer Shiitake-Fruchtkörper (Flüssig/Flüssig-Extraktion) | 82 |
| Tab 2-11 | Identifizierte C ₈ -Verbindungen aus dem Aromaextrakt frischer Shiitake - Fruchtkörper und Submerskultur (Flüssig/Flüssig-Extraktion) von <i>Lentinus edodes</i> | 83 |
| Tab 2-12 | Olfaktorische Eigenschaften der schwefelhaltigen Aromastoffe | 89 |
| Tab 3-1 | Produktion kommerziell kultivierter Speisepilze | 91 |
| Tab 3-2 | Essentielle Mineralstoffe und Spurenelemente | 101 |
| Tab 3-3 | Bedeutung von Vitaminen im Pilzmetabolismus | 104 |
| Tab 3-4 | Wirtschaftlich wichtige biotechnologische Produkte und die beteiligten Organismen | 105 |
| Tab 3-5 | Natürliches Vorkommen von γ -Glutamyl-L-Cysteinsulfoxid-Derivaten | 110 |
| Tab 3-6 | γ -Glutamylpeptide und schwefelhaltige Aminosäuren in <i>Lentinus edodes</i> | 111 |
| Tab 3-7 | Lentinsäuregehalte | 112 |
| Tab 3-8 | Effekte auf Lentinsäurebildung nach Zusatz organischer Precursoren | 120 |
| Tab 3-9 | Lentinsäurebilanz für Weserchamp | 123 |

| | | |
|---------|--|-----|
| Tab 4-1 | Namen und Bezugsquellen der verwendeten Pilzstämme | 132 |
| Tab 4-2 | Versuchsordnung für die Kultivierung zur Fruchtkörpererzeugung | 135 |
| Tab 4-3 | Organische Nährmedienbestandteile | 141 |
| Tab 4-4 | Anorganische Nährmedienbestandteile | 142 |
| Tab 4-5 | Vitamine und Minorkomponenten | 143 |
| Tab 4-6 | Chemikalien für die Analytik | 145 |
| Tab 4-7 | Lösungsmittel | 146 |
| Tab 4-8 | Gase | 147 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| ADAM | Adamantanamin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AED | Atom-Emissions-Detektor |
| Ala | Alanin |
| APS | Adenosin-5'-phosphosulfat |
| Arg | Arginin |
| AS | Aminosäuren |
| Asn | Asparagin |
| Asp | Asparaginsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| C-Quelle | Kohlenstoffquelle |
| Cys | Cystein |
| δ | chemische Verschiebung [ppm] (NMR) |
| d | Dublett ($^1\text{H-NMR}$) |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| eV | Elektronenvolt |
| FAD | Flavin-adenin-dinucleotid |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| FM | Feuchtmasse |
| FMN | Flavinmononucleotid |
| FMOC-Cl | 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid |
| g | Erdbeschleunigung |
| GC | Gaschromatographie |
| GC-O | Gaschromatographie-Olfaktometrie |
| Gln | Glutamin |
| Glu | Glutaminsäure |
| Gly | Glycin |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| γ -GT | γ -Glutamyltranspeptidase |
| His | Histidin |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| Ile | Isoleucin |
| IR | Infrarot |
| ^2J | geminale Kopplung über zwei Bindungen ($^1\text{H-NMR}$) |
| ^3J | vicinale Kopplung über drei Bindungen ($^1\text{H-NMR}$) |
| KI | Kovats-Index |
| Leu | Leucin |
| LM | LEATHAM-Medium |

| | |
|----------|--|
| LM-opt. | optimiertes LEATHAM-Medium |
| Lys | Lysin |
| m | Multipllett ($^1\text{H-NMR}$) |
| M | mol L^{-1} ; Stoffmengenkonzentration |
| Met | Methionin |
| MnP | Manganperoxidase |
| MS | Massenspektrometrie |
| M_w | Molekulargewicht |
| m/z | Masse-Ladungs-Verhältnis |
| NAD(P) | Nicotin-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat) |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| N-Quelle | Stickstoffquelle |
| PAPS | 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat |
| Phe | Phenylalanin |
| ppm | parts per million |
| Pro | Prolin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| s | Singulett ($^1\text{H-NMR}$) |
| Ser | Serin |
| S-frei | Schwefel-frei |
| S-haltig | Schwefel-haltig |
| SNL | Standardnährlösung |
| t | Tripllett ($^1\text{H-NMR}$) |
| THF | Tetrahydrofuran |
| Thr | Threonin |
| Tyr | Tyrosin |
| UDP | Uridindiphosphat |
| UV | Ultraviolett |
| Val | Valin |
| v/v | bei Prozentangaben (Volumen pro Volumen) |

1 Einleitung

Im allgemeinen Sprachgebrauch versteht man unter Pilzen die Klasse der hochentwickelten Ständerpilze (Basidiomyceten), die in Form von differenzierten Fruchtkörpern in Erscheinung treten. Die Bedeutung der Fruchtkörper von Pilzen in der menschlichen Ernährung geht in prähistorische Zeiten zurück, als die Menschen noch als Sammler ihren Nahrungsbedarf deckten. Die Pharaonen schätzten Pilze als Delikatesse, die Griechen glaubten, daß sie Kriegern Stärke verleihen würden. Bei den Römern betrachtete man sie sogar als „Speise der Götter“ und verzehrte sie daher nur zu besonderen Festen [1].

Zu dem Organismenreich der Mycobionta (Pilze) zählen mehr als 250 000 Spezies, von denen rund 10 000 Fruchtkörper ausbilden. Diese Gruppe umfaßt ca. 2000 prinzipiell eßbare Arten, von denen allerdings nur 80 versuchsweise kultiviert wurden. 40 Arten werden wirtschaftlich genutzt und nur die Hälfte dieser Pilze agroindustriell angebaut. Die Kultivierung von einigen Speisepilzen wie dem Steinpilz oder verschiedenen Trüffelarten, die wirtschaftlich von Bedeutung sind, ist bis heute nicht gelungen, da sie zu den obligaten Mykorrhizapilzen gehören. Nur etwa 5 bis 6 Arten werden in großindustriellen Produktionen angebaut, die globale Bedeutung haben [2].

Der zunehmende Stellenwert der Kultur von Speisepilzen spiegelt sich in den steigenden Zahlen der Weltproduktion wider. Die Ursache für die große Nachfrage nach Kulturspeisepilzen hat verschiedene Gründe. Pilze werden hauptsächlich wegen ihres charakteristischen Geschmacks und Aromas verzehrt, wobei die Zuchtpilze bei denen die Unsicherheiten bzgl. der genießbarkeit bzw. die Risiken der Belastung mit Schwermetallen ausgeschlossen sind, einen großen Vorteil gegenüber den gesammelten wildwachsenen Pilzen haben. Darüber hinaus sind sie aufgrund ihrer Kultivierungsbedingungen nahezu das ganze Jahr verfügbar, während die wildwachsenen Pilze nur saisonale Bedeutung haben [3].

Neben ihren geschmacklichen Vorzügen spielt heutzutage die ernährungsphysiologische Bedeutung eines Lebensmittels eine immer größere Rolle. In Untersuchungen Ende des 19. Jahrhunderts schätzte man den Proteingehalt des Speisepilzes so hoch ein, daß Pilze sogar als „Fleisch des Waldes“ bezeichnet wurden. Obwohl das Pilzprotein durchaus wertvoll für die menschliche Ernährung ist, da alle neun essentiellen Aminosäuren enthalten sind, liegt der Gehalt wegen des hohen Wasseranteils lediglich im Bereich typischer Frischgemüsesorten.

Aus heutiger Sicht sind Pilze aufgrund ihres hohen Mineralstoff- und B-Vitamingehaltes sowie eines geringen Fett- und Kohlenhydratanteils ernährungsphysiologisch interessant, da sie ein kalorienarmes und ballaststoffreiches Lebensmittel darstellen [2, 4, 5].

Der Shiitake (*Lentinus edodes*) ist der populärste Speisepilz Asiens und wird nach dem Champignon (*Agaricus bisporus*) und dem Austernseitling (*Pleurotus sapidus*) weltweit am häufigsten angebaut. Seine Bezeichnung entstammt der japanischen Sprache. Der Baum auf dem dieser Pilz wächst ist der Shii-Baum (*Pasania cuspita*), „Take“ ist die japanische Bezeichnung für Pilz.

Während die Produktionszahlen beim Champignon in den letzten Jahren stagnierten bzw. leicht rückläufig waren, wurde für den Shiitake ein deutlicher Anstieg verzeichnet, der nicht nur auf den asiatischen Raum beschränkt war, sondern vor allem in den westlichen Ländern zu beobachten war [6].

Für den verstärkten Anbau des Shiitake in den westlichen Ländern sprechen mehrere Gründe, deren Ursache unter anderem in den veränderten Ernährungsgewohnheiten liegen, die aufgrund zunehmender Globalisierung durch den Wunsch nach exotischen Lebensmitteln hervorgerufen wurden. Der Shiitake zeichnet sich durch einen sehr würzigen Geschmack und ein charakteristisches Aroma nach Knoblauch und Rettich aus, der ihn somit von dem „typischen“ Speisepilz dem Champignon stark unterscheidet. Darüber hinaus ist er für seine gesundheitsfördernden Wirkungen bekannt, über die in China schon in der Ming-Dynastie (1368 - 1644) berichtet wurde.

Dem Shiitake werden folgende gesundheitliche Wirkungen zugesprochen [7, 8, 9]:

1. Eine cholesterolsenkende Wirkung, für dessen Effekt, der sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen festgestellt wurde, die aus den Fruchtkörpern isolierte Verbindung Eritadenin - ein Derivat des Adenins - verantwortlich gemacht wird.
2. Eine antivirale Wirkung, dessen aktives Prinzip auf einer doppelsträngigen RNA beruht, die aus Sporen und Fruchtkörperextrakten gewonnen wurde und auf im Pilz vorhandene Viruspartikeln zurückgeführt wird. Diese RNA wurde als hochgradig interferon- und abwehrkraftstimulierend gegenüber Virusinfektionen erkannt.
3. Eine Antitumorwirkung, die besonders in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde. Als aktive Substanz konnte das Polysaccharid Lentinan isoliert werden, bei dem es sich um ein β -Glucan handelt. Über die genauen molekularen Wirkungen gibt es jedoch noch keine einheitlichen Vorstellungen.

Der Shiitake (*Lentinus edodes*) ist einer der ältesten kultivierten Speisepilze - in Japan und China kennt man den Pilz seit etwa 2000 Jahren. Die Anbautechnologie des Shiitake wurde in China zur Zeit der Sung-Dynastie (960-1127) entwickelt und ist schriftlich festgehalten.

Im 16. Jahrhundert führten chinesische Bauern den Shiitake-Anbau in Japan ein, wo er weiterentwickelt wurde. Aus botanischer Sicht gehört der Shiitake zu der Familie der Weißfäulepilze und ist damit in der Lage, sowohl das Lignin als auch - allerdings zu einem geringeren Anteil - Cellulosen und Hemicellulosen als Substrat aufzuschließen und zu verwerten. Aufgrund der Fähigkeit des Pilzes auf abgestorbenem Holz zu wachsen, wird der Shiitake in China und Japan seit mehr als 300 Jahren auf Baumstämmen kultiviert. Diese Anbaumethode wird auch heute noch vor allem von Kleinbauern praktiziert. Hierbei wird das Pilzmycel zunächst auf kleinen Eichenholzpflocken vorgezchtet, mit denen dann entsprechend präparierte Baumstämme beimpft werden. Nach einer vollständigen Besiedlung des Holzes mit Pilzmycel wird die Fruchtkörperbildung induziert. Bis zur Ernte können 15 Monate bis 2 Jahre vergehen [10, 11].

Erst in den letzten Jahrzehnten hat sich der Anbau von Shiitake auch in den westlichen Ländern entwickelt. Aufgrund klimatischer Unterschiede und dem mit vielen Risiken verbundenen traditionellen Anbau auf Holz, hat sich hier eine alternative Kultivierung auf Schüttsubstraten durchgesetzt, deren Hauptbestandteil Sägemehl von Laubbäumen ist, die auch im traditionellen Anbau verwendet werden. Dem Substrat werden weitere Nährstoffe zugesetzt, bei denen es sich hauptsächlich um leicht verfügbare Stickstoff- und Kohlenhydratquellen handelt, die die Besiedlungsphase beschleunigen sollen.

Obwohl diese Anbaumethode hinsichtlich der Umweltfaktoren und Nährstoffansprüche der auf Naturholz ähnelt, bestehen bei der Dauer des Anbauzyklus gravierende Unterschiede. Auf Schüttsubstraten können die Fruchtkörper nach sechs bis acht Monaten geerntet und durch den Zusatz von weiteren Nährstoffen zum Substrat eine Ertragssteigerung erzielt werden [12, 13, 14].

1.1 Problemstellung

Die Produktion von Speisepilzen im großindustriellen Maßstab stellt einen erheblichen wirtschaftlichen Faktor dar, der aufgrund steigender Nachfrage weiter an Bedeutung gewinnen wird. In Deutschland entfällt der überwiegende Anteil der Kultivierung auf den Champignon (*Agaricus bisporus*), der Shiitake (*Lentinus edodes*) wird jedoch mittlerweile auch in agroindustrieller Produktion auf oben genannten Schüttsubstraten angebaut. Für ein gegenüber dem asiatischen Markt konkurrenzfähiges Produkt muß das Aromaprofil noch verbessert werden. Darüber hinaus ist eine Reduzierung der Kultivierungsdauer von wirtschaftlichem Interesse.

Die durch den Anbau auf Schüttsubstraten produzierten Shiitake wurden als weniger aromaintensiv eingestuft, als die des traditionellen Anbaus auf Holz. Gerade dieser Faktor ist beim Shiitake besonders erwünscht, da er als Würzpilz verwendet wird [9].

Für das charakteristische Aromaprofil des Shiitake werden schwefelhaltige Substanzen, v.a. das Lenthionin verantwortlich gemacht. Für die schwefelhaltigen Aromastoffe wird dabei eine gemeinsame Vorstufe, das schwefelhaltige γ -Glutamylpeptid Lentinsäure angenommen.

In dieser Arbeit sollte der Pilz *Lentinus edodes* hinsichtlich einer Steigerung des Gehaltes an Lentinsäure vor dem Hintergrund einer Aromaintensivierung untersucht werden. Dazu mußte eine Methode zur schnellen und quantitativen Bestimmung des Lentinsäuregehaltes entwickelt werden. Aufgrund des mehrmonatigen Anbauzyklus bei der konventionellen Anzucht, sollten die Arbeiten an Submerskulturen durchgeführt werden, wodurch eine deutliche Reduzierung des Kultivierungszeitraums möglich ist und damit auch eine Standardisierung der durchzuführenden Experimente erreicht werden kann.

Für die Ziele dieser Arbeit wurden folgende Schwerpunkte formuliert:

- ⇒ die Optimierung der Nährmedien- und Kulturparameter und die Überprüfung der Übertragbarkeit in eine „upscaling“-Stufe im Bioreaktor
- ⇒ die Isolierung und Charakterisierung des Aromaprecursors Lentinsäure
- ⇒ die Entwicklung einer geeigneten Analytik zur quantitativen Bestimmung der Lentinsäure aus Submerskulturen
- ⇒ die Suche nach geeigneten Precursoren zur Steigerung des Lentinsäuregehaltes
- ⇒ die Untersuchung der Stammspezifität
- ⇒ Vergleich der Aromaprofile von frischen Fruchtkörpern und Biomasse aus Submerskultivierung

2 Ergebnisse

2.1 Untersuchungen zu den Kultivierungsbedingungen

2.1.1 Vorbemerkung

ABRAHAM [15] verwendete in seinen Versuchen zur Kultivierung von Basidiomyceten in Submerskulturen ein modifiziertes SPRECHER-Medium [16]. In diesem komplexen Medium diente Hefeextrakt sowohl als Stickstoff- als auch als Vitamin- und Spurenelementquelle (SNL-H, siehe 4.4.2.2). Als Kohlenstoffquelle wurde dem Nährmedium 30 g L^{-1} an Glucose zugesetzt. Damit erzielte er bei den untersuchten Stämmen gute Wachstumsraten.

Um die Wachstumseigenschaften des Basidiomyceten *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp und Stamm A 20-5 zu untersuchen, wurde in den ersten Versuchsreihen mit diesem Medium gearbeitet.

Eine Standardisierung der Kultivierung von mycelbildenden Pilzen ist im Vergleich zu einzelligen Mikroorganismen relativ schwierig, da die Zahl der Wachstumszentren, die als Inoculum eingesetzt werden bzw. die Größe der Mycelaggregate (Pellets) nur schwer kontrollierbar sind. Um Schwankungen innerhalb einer Versuchsreihe möglichst gering zu halten, wurden nahezu alle Versuche als Doppelkolbenbestimmung durchgeführt. Die Experimente wurden in 200 mL Erlenmeyerkolben mit 90 mL Medium angesetzt und nach dem Autoklavieren mit 10 mL Inoculum aus der entsprechenden Vorkultur beimpft (siehe 4.3.3.2 und 4.3.3.3). Die angegebenen Ergebnisse verstehen sich als Mittelwerte aus den beiden Einzelbestimmungen. Zur Bestimmung der Trockenmasse (siehe 4.3.9.3) wurde der gesamte Kolbeninhalt verwendet. Nach Abtrennung des Mycels wurden im Kulturmedium pH-Wert und der Glucoseverbrauch ermittelt (siehe 4.3.9.1 und 4.3.9.2). In der Regel lagen die pH-Werte bei der ersten Probenahme im sauren Bereich (pH 3,3 – 3,7) und veränderten sich über den Kulturverlauf kaum. Wurden abweichende Ergebnisse erhalten, sind sie bei den entsprechenden Versuchen aufgeführt. Bei der Bestimmung des Glucoseverbrauchs handelt es sich um eine orientierende Messung mit Teststäbchen. Sie wurde nur bei den Versuchen durchgeführt, bei denen Glucose als Kohlenstoffquelle im Medium vorhanden war. In der Regel war am Ende der Kultivierung nicht die gesamte Glucose verbraucht. Wurden abweichende Ergebnisse erhalten, sind sie bei den entsprechenden Versuchen aufgeführt.

2.1.2 Variation physikalischer Kulturparameter

2.1.2.1 Temperatur

Die Umgebungstemperatur stellt einen physikalischen Umweltfaktor dar, der bei Pilzen Einfluß sowohl auf das vegetative Wachstum als auch auf die Steuerung der Fruchtkörperentwicklung hat. Der Effekt von zwei verschiedenen Kultivierungstemperaturen - 24 und 27 °C - auf die Wachstumsrate in Kulturen von *Lentinus edodes* wurde daher untersucht.

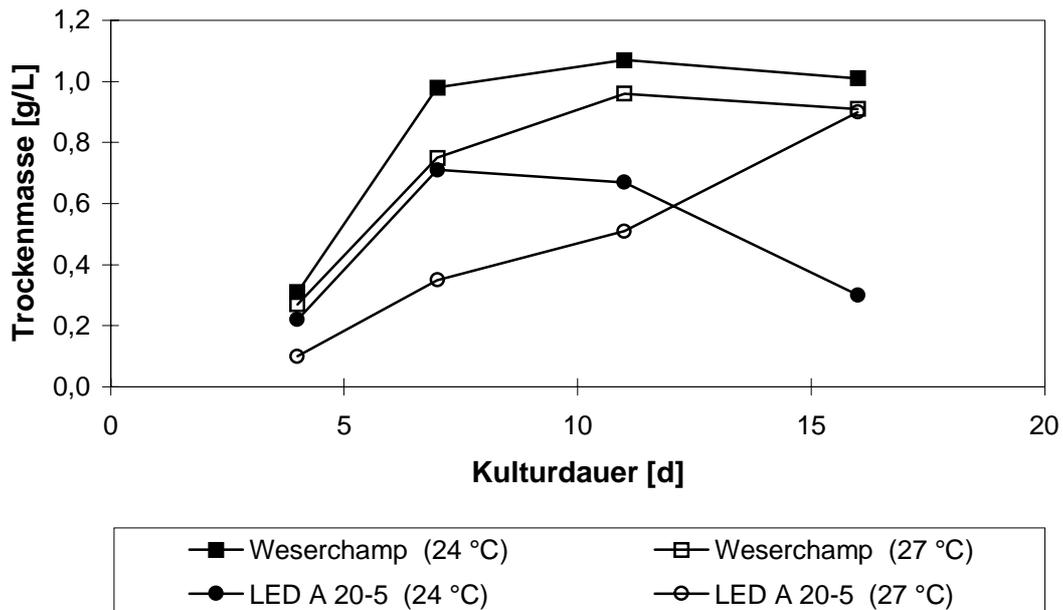


Abb 2-1 Trockenmassegehalte in Abhängigkeit von der Kulturtemperatur

Anhand der ähnlichen Kurvenverläufe in Abb 1-1 zeigte sich bei Weserchamp nur ein geringer Einfluß der Kulturtemperatur auf die Trockenmasse, wobei ein geringfügig besseres Wachstum bei 24 °C erzielt wurde.

Bei A 20-5 zeigte sich bei den beiden gewählten Kulturtemperaturen ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten. Es wurden bei 27 °C höhere Trockenmassen erzielt, wobei die Wachstumsgeschwindigkeit unterhalb derer bei 24 °C lag. Die höchsten Gehalte wurden jedoch erst am 16. Kulturtag erreicht, während bei der niedrigeren Kultivierungstemperatur das Wachstumsmaximum schon am 7. Kulturtag beobachtet wurde.

2.1.2.2 Sauerstoffversorgung

Die Kultivierung von Basidiomyceten in Submerskultur gelingt nur bei ständiger Agitation des Pilzmycels im Kulturmedium. Dadurch wird der Gaseintrag ins Medium und damit die Versorgung des Mycels mit Sauerstoff verbessert. Der Einfluß einer verbesserten Sauerstoffversorgung auf das Wachstum wurde in folgendem Versuchsaufbau untersucht.

Die üblicherweise verwendeten Erlenmeyerkolben zur Kultivierung wurden durch Schikanekolben mit vier Schikanen ersetzt, gleichzeitig aber die Schüttelgeschwindigkeit auf 120 rpm verringert, um ein Hochspritzen des Mediums zu vermeiden. Als Kultivierungstemperatur wurde in diesem Versuch 24 °C gewählt, die auch als Standardkultivierungstemperatur in allen folgenden Versuchen beibehalten wurde (siehe 4.3.2).

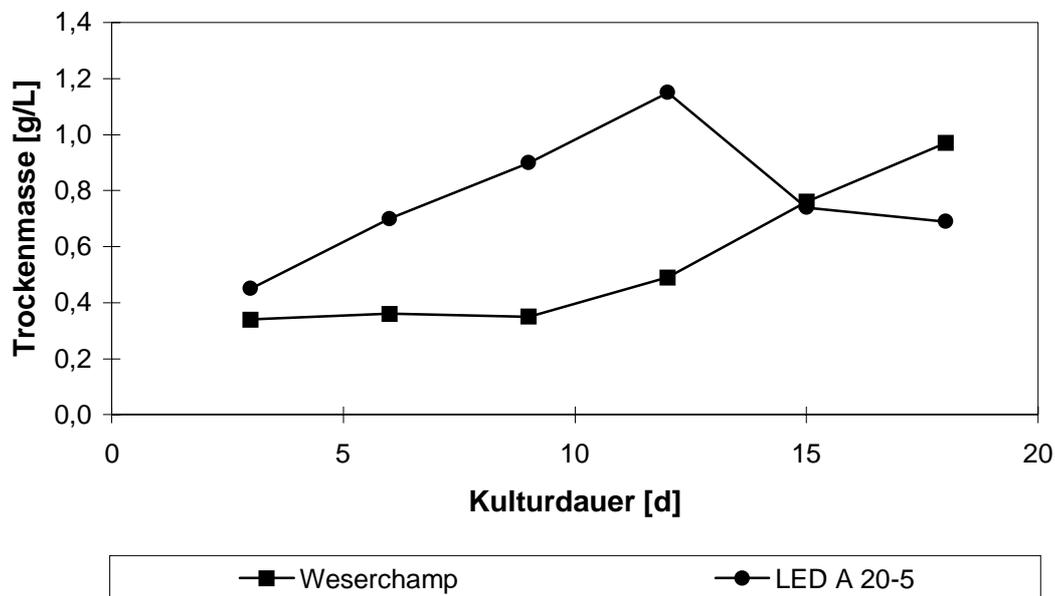


Abb 2-2 Kulturverlauf in Schikanekolben

Die maximal erzielten Trockenmassen lagen im Bereich von etwa 1 g L^{-1} für Weserchamp bzw. $1,2 \text{ g L}^{-1}$ für A 20-5 und erreichten dabei ähnliche Werte wie bei der Kultivierung in Erlenmeyerkolben. Bei der Kultivierung in Schikanekolben kam es durch das Hochspritzen des Kulturmediums jedoch vermehrt zur Bildung von unerwünschtem Luftmycel, das an den Wandungen des Kulturgefäßes festwuchs. Darüber hinaus bildete sich oberhalb des Kulturmediums ein stabiler Schaum durch das Schütteln in Schikanekolben, der eine Aufarbeitung deutlich erschwerte. Daher wurde diese Art der Kultivierung als ungeeignet erachtet und bei Folgeexperimenten nicht mehr eingesetzt.

2.1.3 Variation des Nährmediums SNL-H

2.1.3.1 Hefeextrakt

Da die unter 1.1.2 beschriebenen Änderungen physikalischer Parameter keine Steigerung der Trockenmassengehalte bewirkten, sollte dies durch Variation des Kulturmediums erreicht werden.

Der Einfluß einer höheren Konzentration an komplexen Nährmedienbestandteilen auf das Wachstum wurde durch Zugabe von $6,0 \text{ g L}^{-1}$ statt $3,0 \text{ g L}^{-1}$ an Hefeextrakt zum SNL-H-Medium überprüft.

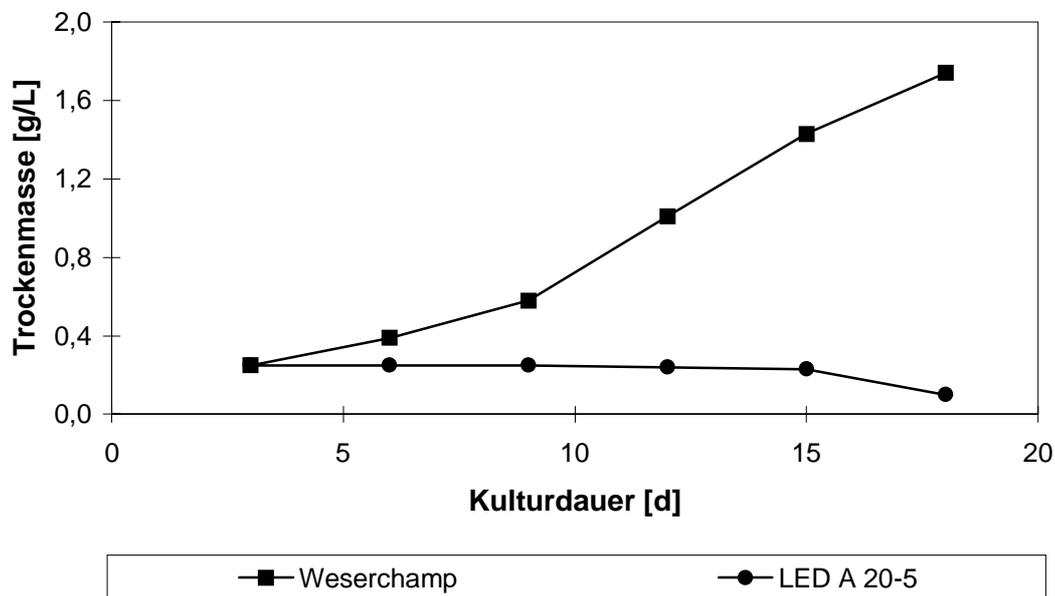


Abb 2-3 Kulturverlauf in SNL-H-Medium mit $6,0 \text{ g L}^{-1}$ Hefeextrakt

Der Zusatz einer höheren Konzentration an Hefeextrakt bewirkte bei A 20-5 eine Stagnation des Mycelwachstums, während bei Weserchamp der maximale Trockenmassegehalt mit etwa $1,7 \text{ g L}^{-1}$ höher als im reinen SNL-H-Medium mit 3 g L^{-1} Hefeextrakt ausfiel. Es konnte jedoch ein verzögertes Wachstumsverhalten beobachtet werden, das dadurch charakterisiert war, daß das Wachstumsmaximum (Übergang in die stationäre Wachstumsphase) am 18. Kulturtag noch nicht erreicht wurde.

2.1.3.2 Glutamin

Die Metabolisierung einer alternativen Stickstoffquelle mit einer möglicherweise verbesserten Ausnutzung im Stoffwechsel und damit wachstumssteigernder Wirkung sollte durch einen Austausch von Asparagin durch Glutamin überprüft werden.

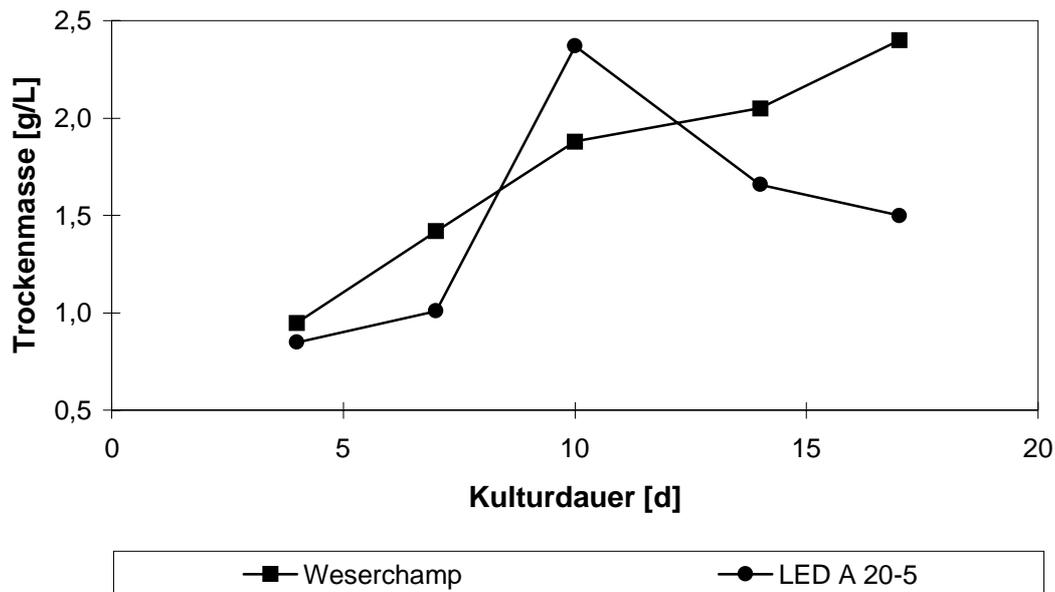


Abb 2-4 Kulturverlauf in SNL-H-Medium mit Glutamin als Stickstoffquelle

Im Vergleich zu Asparagin konnte mit Glutamin als Stickstoffquelle ein etwas besseres Wachstum erzielt werden. Die maximalen Trockenmassegehalte lagen sowohl bei A 20-5 als auch bei Weserchamp bei $2,4 \text{ g L}^{-1}$, wobei diese nicht nach der gleichen Kultivierungszeit erreicht wurden. A 20-5 zeigte sein Wachstumsoptimum schon nach 10 Tagen, während bei Weserchamp der Übergang in die stationäre Wachstumsphase am 17. Kulturtag noch nicht vollzogen – und damit das Optimum nicht ermittelt werden konnte. Es konnten daher im Rahmen der gewählten Kultivierungsbedingungen keine exakten Aussagen über die maximal erzielbaren Trockenmassen gemacht werden.

2.1.3.3 Sterilfiltriertes SNL-H-Medium

Eine Sterilität von Kulturmedien kann u.a. durch Autoklavieren oder Sterilfiltration erreicht werden. Es wurde durch Vergleichsexperimente überprüft, ob beim Autoklavieren des Kulturmediums wachstumshemmende Verbindungen entstehen, die einen negativen Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Weserchamp und A 20-5 ausüben. Diese Verbindungen können beim Erhitzen durch chemische Reaktionen wie z.B. der Maillard-Reaktion entstehen und damit eine Veränderung der Medienbestandteile hervorrufen.

Weiterhin können beim Autoklavieren auch hitzelabile Bestandteile wie z.B. Thiamin teilweise abgebaut werden und sich ebenfalls negativ auf das Wachstum auswirken.

Das SNL-H-Medium wurde mit einer Sterilfiltrationseinheit (siehe 4.5.1) sterilfiltriert und anschließend mit Pilzmycel von Weserchamp bzw. A 20-5 inoculiert.

Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht allerdings in einer im Vergleich zum Autoklavieren erhöhten Kontaminationsgefahr.

Da bei den vorangegangenen Versuchen beim Stamm Weserchamp das Wachstumsmaximum nicht eindeutig ermittelt werden konnte, wurde im folgenden Versuch die Kulturdauer auf 23 Tage verlängert.

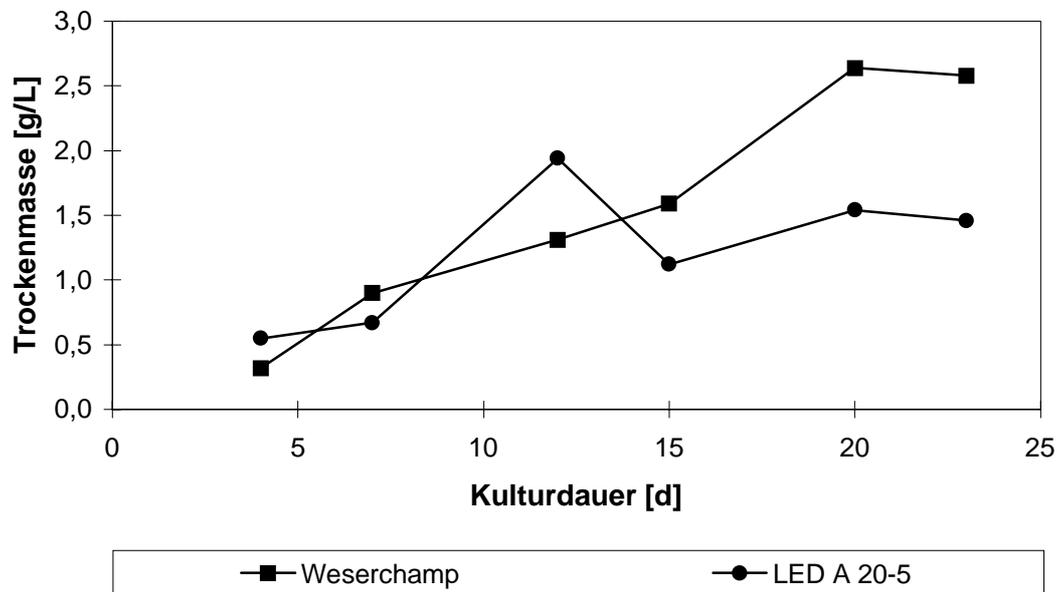


Abb 2-5 Kulturverlauf in sterilfiltriertem SNL-H-Medium

Das Wachstumsverhalten der beiden Stämme Weserchamp und A 20-5 zeigten im sterilfiltrierten einen ähnlichen Verlauf wie im autoklavierten Medium (siehe 2.1.3.2), wobei hier für Weserchamp der Übergang in die stationäre Wachstumsphase um den 20. Kulturtag ermittelt werden konnte. Die erzielten Gehalte an Trockenmassen lagen geringfügig höher als im autoklavierten Medium und sind vergleichbar mit den Ergebnissen aus dem SNL-H-Medium mit Glutaminzugabe. Aufgrund der geringeren Kontaminationsgefahr bei ansonsten nahezu identischen Kulturverläufen wurde in Folgeexperimenten die Sterilisation durch Autoklavieren eingesetzt.

2.1.3.4 Holzmehl-Medium

Lentinus edodes gehört zu der Familie der Weißfäulepilze, die auf abgestorbenem Holz wachsen. Die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt durch lignolytischen Abbau des Holzes. Ein Zusatz von Holzmehl zum Kulturmedium (SNL-H) sollte daher das Wachstum von Weserchamp und A 20-5 stimulieren und dadurch höhere Trockenmassegehalte erzielen. Dazu wurde dem Medium vor dem Autoklavieren $2,0 \text{ g L}^{-1}$ an feingemahlenem Buchenholzmehl zugesetzt.

Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte bei diesem Versuch abzüglich der zugesetzten Menge an Holzmehl. Unberücksichtigt blieb dabei, daß während der Kultivierungsdauer nicht bestimmbare Mengenanteile des Holzmehls durch das Pilzmycel aufgeschlossen und metabolisiert wurden. Da aber eine Abtrennung des Pilzmycels vom Holzmehl nicht möglich war, konnte die Abnahme durch Lignolyse nicht berücksichtigt werden.

Die Autoklavierzeit wurde in diesem Versuch von 20 min auf 30 min verlängert.

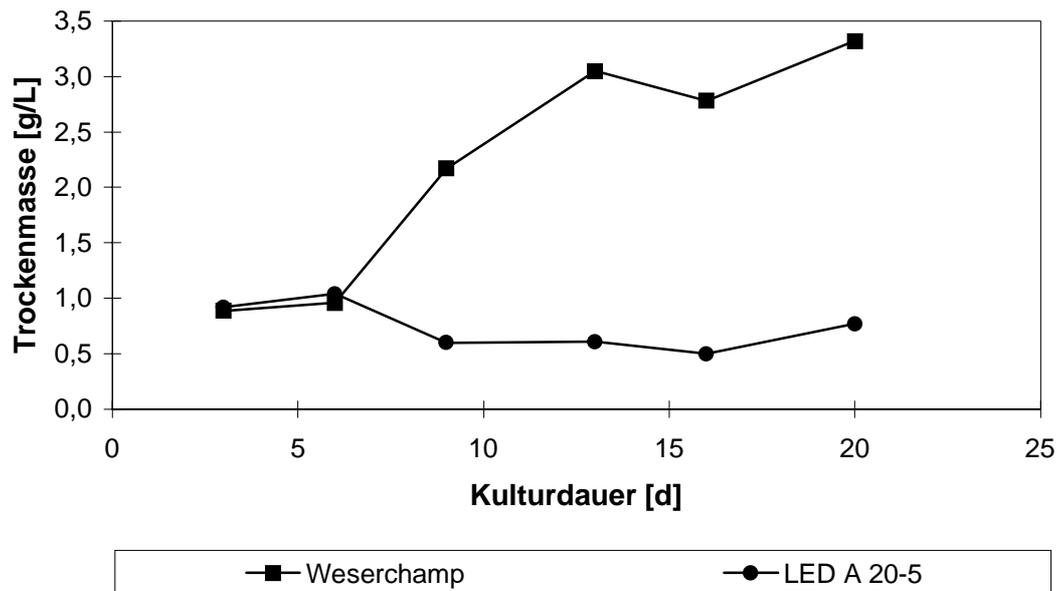


Abb 2-6 Kulturverlauf von SNL-H-Holzmehl-Medium

Im Kulturverlauf von A 20-5 wurde ein maximaler Trockenmassengehalt von 1 g L^{-1} am 6. Kulturtag erreicht. Das in den vorangegangenen Versuchen ausgeprägte Maximum war hier nicht zu beobachten.

Bei Weserchamp wurden am 20. Kulturtag Trockenmassegehalte von $3,3 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, wobei das Ende der Wachstumsphase noch nicht erreicht zu sein schien. Obwohl für Weserchamp die höchsten Trockenmassegehalte erzielt wurden, ist diese Art der Kultivierung ungeeignet, da das Pilzmycel durch den Zusatz des Holzmehls dazu neigte, zusammenzuklumpen und keine Pellets mehr auszubilden. Außerdem entstanden während der Kultivierung Polysaccharide, die ins Kulturmedium abgegeben wurden und dessen Viskosität erhöhten. Diese erschwerten zusammen mit dem Holzmehl eine Abtrennung des Kulturmediums vom Pilzmycel sowohl durch Zentrifugation als auch Filtration.

2.1.4 Variation des Nährmediums SNL-B₁

2.1.4.1 Kulturverlauf in SNL-B₁ und SNL-B₁-Gln

Das SNL-H-Medium hat durch Hefeextraktzusätze zu den Nährmedienbestandteilen eine komplexe Zusammensetzung. Der Hefeextrakt enthält eine Reihe von Peptiden und Aminosäuren sowie Vitamine und Spurenelemente, wobei die genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist.

Beim SNL-B₁-Medium, das auch zur Kultivierung der Stammkulturen (siehe 4.4.2.1) verwendet wurde, handelt es sich dagegen um ein definiertes Nährmedium, dessen Nährmedienbestandteile genau bekannt sind. Nur bei genauer Kenntnis der Inhaltsstoffe und Konzentrationen ist eine systematische Untersuchung verschiedener Einflußgrößen sinnvoll. Es wurde daher untersucht, wie das Wachstum der beiden Stämme *Weserchamp* und *A 20-5* im SNL-B₁-Medium während der Kultivierung verläuft und wie sich – in Analogie zu 2.1.3.2 - ein Ersatz der Stickstoffquelle Asparagin durch Glutamin auswirkt.

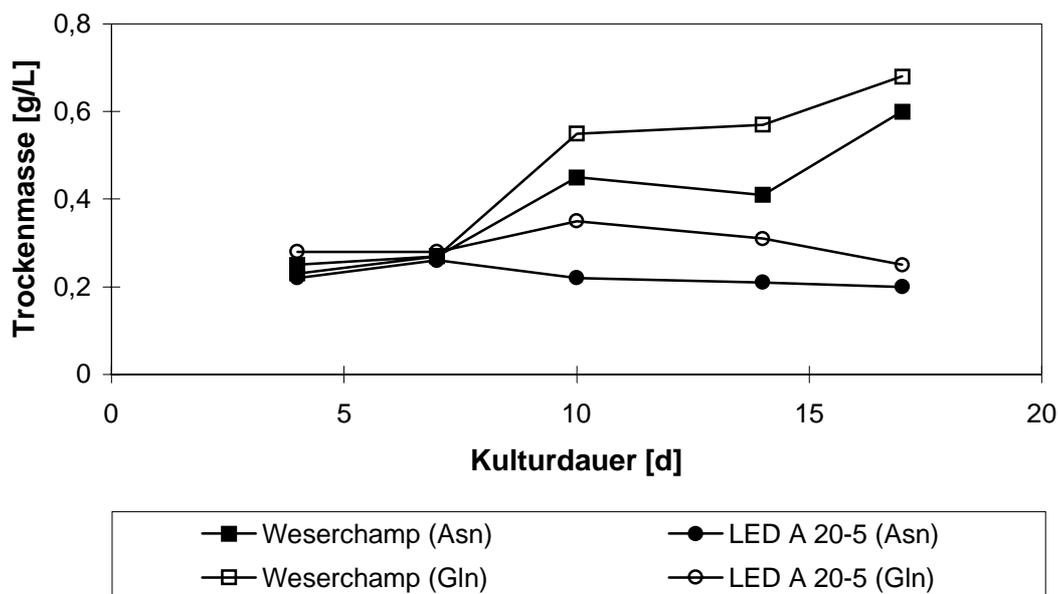


Abb 2-7 Kulturverlauf von *Weserchamp* und *A 20-5* in SNL-B₁ und SNL-B₁-Gln

Die Trockenmassegehalte waren in beiden Medien sehr gering und lagen deutlich unter den erzielten Gehalten in SNL-H-Medien. Während *Lentinus edodes* A 20-5 fast überhaupt kein Wachstum zeigte, war der Kurvenverlauf bei *Lentinus edodes* *Weserchamp* vergleichbar zu vorangegangenen Versuchen, wobei allerdings die maximal erreichten Trockenmassen mit etwa $0,6 \text{ g L}^{-1}$ sehr gering ausfielen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 2.1.3.2 konnten mit Glutamin anstatt Asparagin als Stickstoffquelle im Nährmedium geringfügig bessere Wachstumsraten erzielt werden.

2.1.4.2 Variation der Stickstoffquelle in SNL-B₁

Der Einfluß einer Variation der Stickstoffquelle auf das Wachstum sollte in folgendem Versuchsaufbau untersucht werden. In zwei Experimenten wurde die im SNL-B₁ enthaltene Stickstoffquelle Asparagin ($4,5 \text{ g L}^{-1}$) durch Ammoniumsulfat ($4,5 \text{ g L}^{-1}$) bzw. durch Universalpepton ($6,0 \text{ g L}^{-1}$) ersetzt.

Ammoniumsulfat stellt im Gegensatz zum Asparagin eine anorganische Stickstoffquelle dar, während das Universalpepton als alternative komplexe Stickstoffquelle zum Hefeextrakt anzusehen ist.

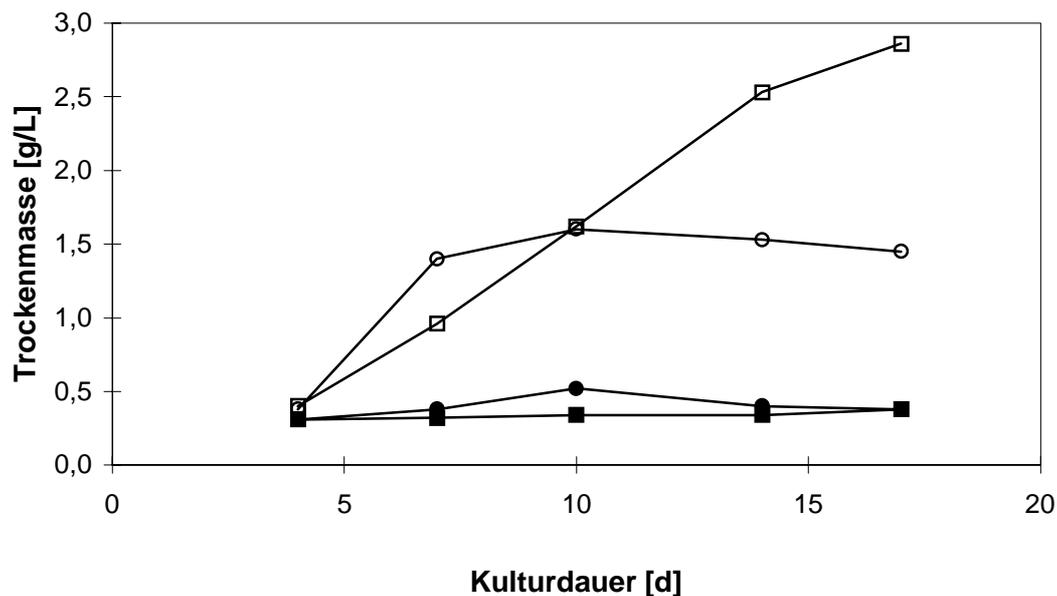


Abb 2-8 Kulturverlauf von Weserchamp in SNL-B₁-Ammoniumsulfat (-■-) und SNL-B₁-Universalpepton (-□-); Kulturverlauf von A 20-5 in SNL-B₁-Ammoniumsulfat (-●-) und in SNL-B₁-Universalpepton (-○-)

Der Austausch von Asparagin durch Ammoniumsulfat als anorganische Stickstoffquelle zeigte keine Verbesserung des Wachstums, bei Weserchamp kam das Wachstum sogar vollständig zum Erliegen.

Das Universalpepton zeigte einen positiven Einfluß auf das Wachstum beider Stämme. Die erhaltenen Trockenmassen lagen dabei mit knapp $2,9 \text{ g L}^{-1}$ für Weserchamp und $1,6 \text{ g L}^{-1}$ für A 20-5 im Bereich dessen, was mit dem SNL-H-Medium mit Hefeextraktzugabe unter 2.1.3.1 erzielt werden konnte.

2.1.4.3 Variation der Kohlenstoffquelle in SNL-B₁

Zur Beurteilung des Einflusses unterschiedlicher Kohlenstoffquellen auf das Wachstumsvermögen und damit auf die Bildung von Trockenmasse, wurde Glucose durch das Disaccharid Maltose bzw. in einem zweiten Versuch durch das Polysaccharid Stärke ersetzt. Die Menge an Maltose und Stärke im Kulturmedium (30 g L⁻¹) entsprach der Konzentration an Glucose in SNL-B₁-Medium.

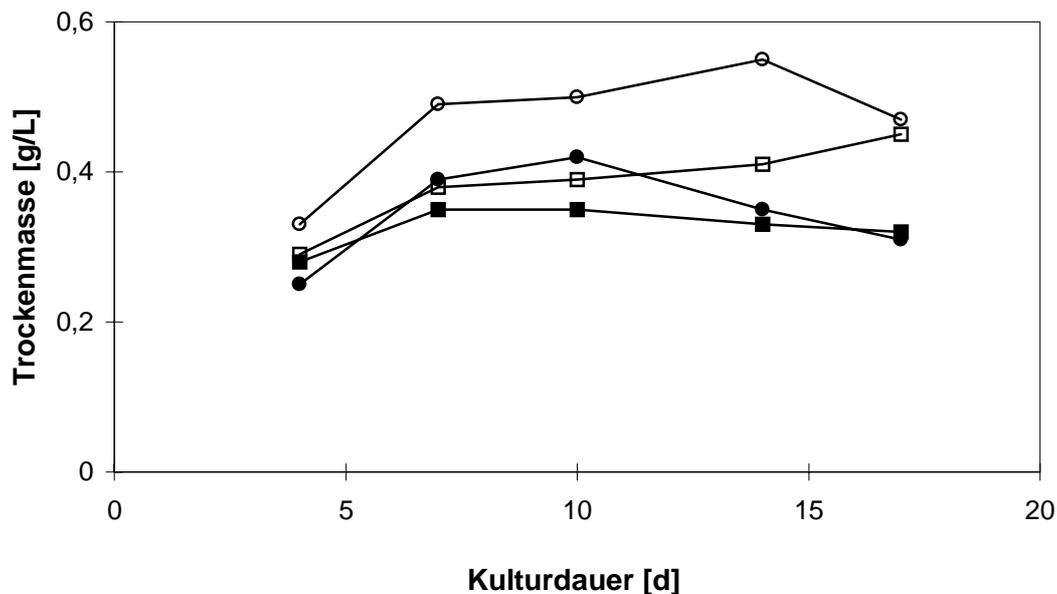


Abb 2-9 Kulturverlauf von *Weserchamp* in SNL-B₁-Maltose (-■-) und SNL-B₁-Stärke (-□-); Kulturverlauf von A 20-5 in SNL-B₁-Maltose (-●-) und in SNL-B₁-Stärke (-○-)

Sowohl Maltose als auch Stärke waren als Kohlenstoffquelle ungeeignet, da die beiden Stämme von *Lentinus edodes* kaum Wachstum zeigten. Die Trockenmassegehalte fielen gegenüber dem reinen SNL-B₁-Medium noch etwas geringer aus.

2.1.4.4 Ethanol als C-Quelle in SNL-B₁

Die Fähigkeit des *Lentinus edodes* *Weserchamp* und A 20-5 nicht-kohlenhydrathaltige Kohlenstoffquellen verwerten zu können, wurde durch Ersatz der Glucose durch Ethanol (2% (v/v)), der dem Kulturmedium nach dem Autoklavieren als alleinige Kohlenstoffquelle zupipettiert wurde, überprüft. Die Zugabemenge, die deutlich geringere Kohlenstoffmengen enthielt als bei den zuvor untersuchten Nährmedien, richtete sich nach Angaben aus der Literatur [17].

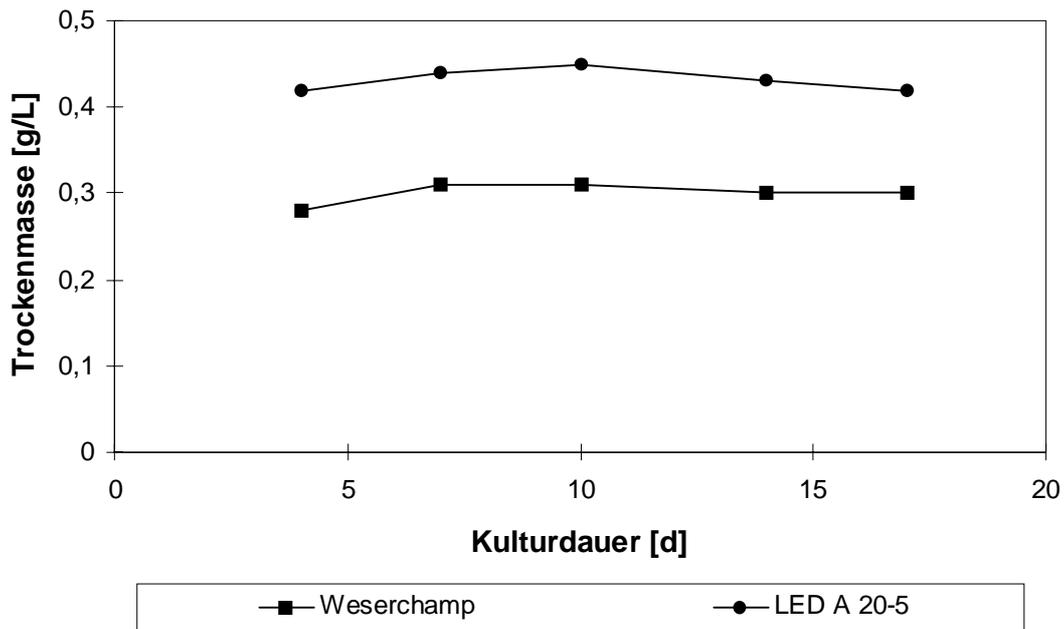


Abb 2-10 Kulturverlauf in SNL-B₁-Ethanol

Weder Weserchamp noch A 20-5 konnten Ethanol als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen. Es konnte kein Wachstum erkannt werden.

2.1.5 Komplexe Nährmedien

In den vorangegangenen Versuchen zeigte *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp in denjenigen Medien das beste Wachstum, in denen eine komplexe Stickstoffquelle zugesetzt war. So wurden in den Kulturmedien mit Zusatz von Hefeextrakt maximale Trockenmassengehalte von $2,5 \text{ g L}^{-1}$ und bei Zusatz von Universalpepton von $2,9 \text{ g L}^{-1}$ erreicht. In den folgenden Versuchen wurden Medien mit komplexer Zusammensetzung eingesetzt, die auch in der Literatur [18, 19] zur Kultivierung von *Lentinus edodes* beschrieben wurden.

2.1.5.1 Shiitake-Medium [19]

Das Shiitake-Medium enthält Malz- und Hefeextrakt (genaue Zusammensetzung siehe 4.4.3.6).

Der aus Gerstenmalz gewonnene Malzextrakt ist reich an verschiedenen Kohlenhydraten, vor allem an Maltose. Der zugesetzte Hefeextrakt dient in diesem Kulturmedium sowohl als Stickstoff- als auch als Vitamin- und Spurenelementquelle. Das Wachstumsvermögen von Weserchamp und A 20-5 in Shiitake-Medium wurde anhand der Bestimmung der Trockenmassen als Wachstumsindikator über den Kulturverlauf untersucht.

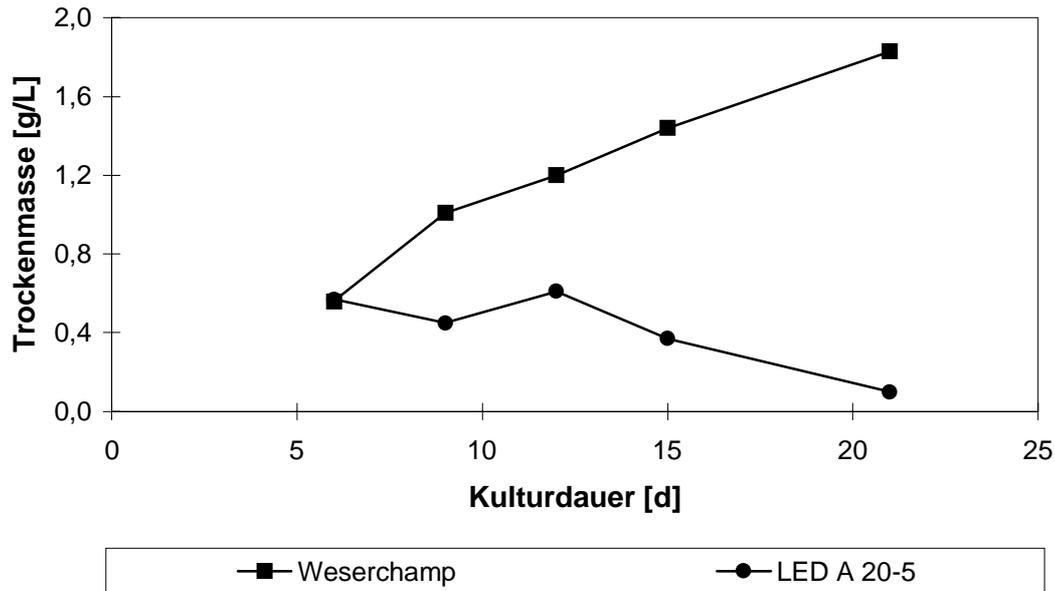


Abb 2-11 Kulturverlauf in Shiitake-Medium

Für den Stamm Weserchamp wirkte sich ein Zusatz von komplexen Medienbestandteilen positiv auf das Wachstum aus, so daß die erreichten Trockenmassegehalte mit etwa $1,9 \text{ g L}^{-1}$ im Bereich dessen lagen, was auch in SNL-H-Medium erzielt werden konnte und damit das definierte Medium SNL-B₁ übertreffen.

2.1.5.2 Malzextrakt-Sojapepton-Medium [18]

Da mit Universalpepton als komplexem Medienbestandteil bisher die höchsten Trockenmassegehalte mit nahezu 3 g L^{-1} bei Weserchamp erzielt wurden, sollte untersucht werden, ob ein Zusatz anderer Peptone den positiven Einfluß noch verstärken kann.

Das aus entfettetem Sojabohnenmehl durch Aufschluß mit Papain hergestellte Sojapepton zeigt durch den hohen Gehalt an Kohlenhydraten und Vitaminen ein breites Nährstoffspektrum und sollte daher eine gute Alternative zum Universalpepton darstellen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Wachstumsverhalten von *Lentinus edodes* Weserchamp und A 20-5 in einem Kulturmedium untersucht, das in Anlehnung an 2.1.5.1 unter Austausch des Hefeextraktes gegen Sojapepton ($5,0 \text{ g L}^{-1}$) angesetzt wurde.

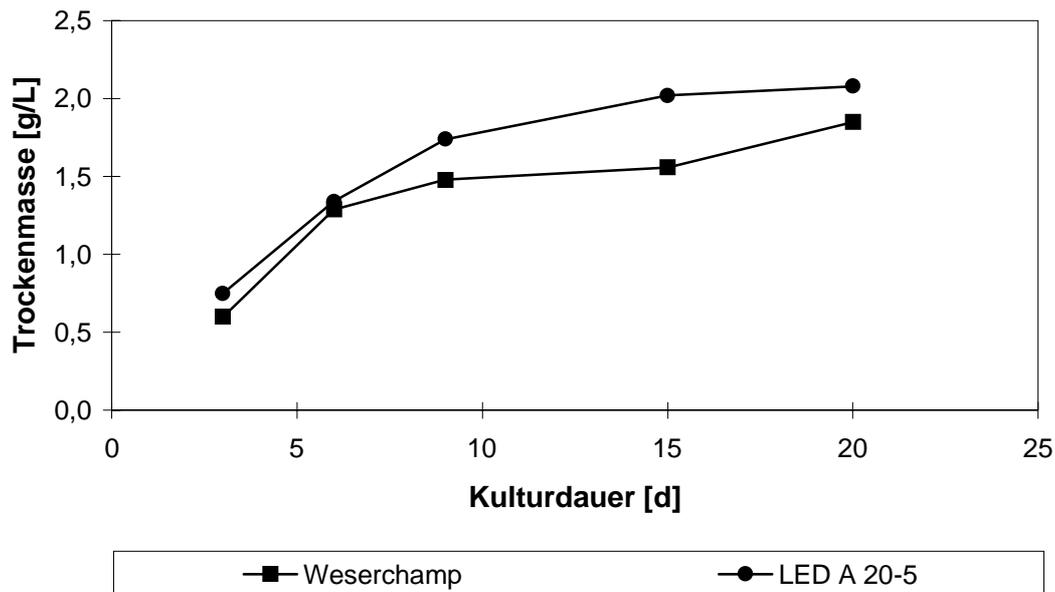


Abb 2-12 Kulturverlauf in Malzextrakt-Sojapepton-Medium

Während A 20-5 ein etwas besseres Wachstum zeigte, als in den vorangegangenen Versuchen, ergaben sich bei Weserchamp keine Unterschiede im Wachstumsverhalten bzw. in der Menge der gebildeten Trockenmasse im Vergleich zum Shiitake-Medium. Die maximal erzielten Trockenmassen lagen bei beiden untersuchten Stämmen bei etwa 2 g L^{-1} . A 20-5 zeigte dabei ein gegenüber den vorangegangenen Versuchen verändertes Wachstumsverhalten. Der deutliche Übergang in die stationäre Phase konnte nach dem exponentiellen Wachstumsverlauf zwischen dem 15. und 20. Kulturtag beobachtet werden, während bei den zuvor durchgeführten Versuchen keine ausgeprägte stationäre Phase auftrat, sondern die Trockenmassegehalte nach Erreichen eines Maximums wieder stark abnahmen.

2.1.6 Definierte Nährmedien

In den vorangegangenen Versuchen wurde durch Zusatz komplexer Stickstoff- oder Kohlenstoffquellen nur ein geringes Wachstum erreicht. Es wurden zwar höhere Trockenmassen erzielt als im definierten SNL-B₁-Medium, jedoch lagen sie bei nur maximal etwa 3 g L^{-1} auf vergleichbar (siehe Folgeexperimente) niedrigem Niveau.

2.1.6.1 Synthetisches Medium nach LEATHAM [20]

Es sollte überprüft werden, ob das in der Literatur beschriebene definierte Medium nach LEATHAM zur Kultivierung von *Lentinus edodes*, welches für Experimente zur Fruchtkörper

erzeugung eingesetzt wurde, für die hier untersuchten Stämme Weserchamp und A 20-5 ein geeignetes Nährmedium für die Submerskultivierung darstellt.

Als Kohlenstoffquelle fungierten Glucose (25 g L^{-1}) und Glucuronsäure ($4,0 \text{ g L}^{-1}$); Glutaminsäure ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) diene als organische Stickstoffquelle. Außerdem wurden dem Medium komplex zusammengesetzte Mineralien-, Spurenelement- und Vitaminlösungen zugesetzt (genaue Zusammensetzung des Mediums siehe 4.4.2.4). Abweichend von der in der Literatur beschriebenen Zusammensetzung wurde dem Medium keine Salicylsäure (1 mg L^{-1}) zugesetzt, und die Sterilität des Mediums wurde durch Autoklavieren statt einer Sterilfiltration erreicht. Der pH-Wert des Kulturmediums wurde vor dem Autoklavieren auf pH 4,0 eingestellt.

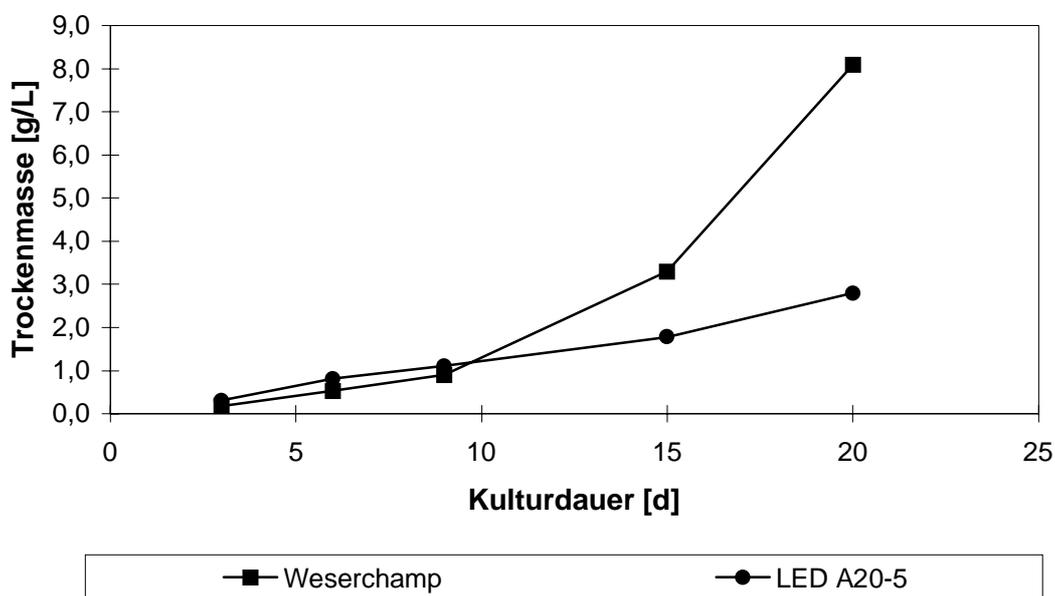


Abb 2-13 Kulturverlauf in LEATHAM-Medium

Der in Abb 2-13 dargestellte Kulturverlauf zeigte sowohl für Weserchamp als auch für A 20-5 eine stark ausgeprägte lag-Phase. Erst am 9. (Weserchamp) bzw. am 15. (A 20-5) Kulturtag war der Übergang in den exponentiellen Verlauf der Wachstumsphase zu beobachten, die am 20. Kulturtag bei beiden Stämmen noch nicht beendet war.

Es wurden für Weserchamp Trockenmassegehalte von über 8 g L^{-1} erreicht - das definierte LEATHAM-Medium wirkte sich damit positiv auf die Bildung von Biomasse aus.

Der positive Einfluß des Mediums auf das Wachstum spiegelte sich auch im Kulturverlauf von A 20-5 wider. Hier wurde eine Trockenmasse von $2,8 \text{ g L}^{-1}$ erreicht, die oberhalb der Werte aus den vorangegangenen Versuchen lag. Da aber die exponentielle Wachstumsphase noch nicht beendet war, sollten bei Ausdehnung der Kultivierungsdauer noch höhere Werte erreicht werden.

Das gute Wachstum zeigte sich ebenfalls in der Entwicklung des pH-Wertes und des Glucoseverbrauchs während des Kulturverlaufs, wie es in Abb 2-14 dargestellt ist. Bei Weserchamp wurde die gesamte Glucose verstoffwechselt und auch bei A 20-5 war erstmals eine deutliche Abnahme der Glucosekonzentration im Medium auf 50 % des Ausgangswertes zu beobachten.

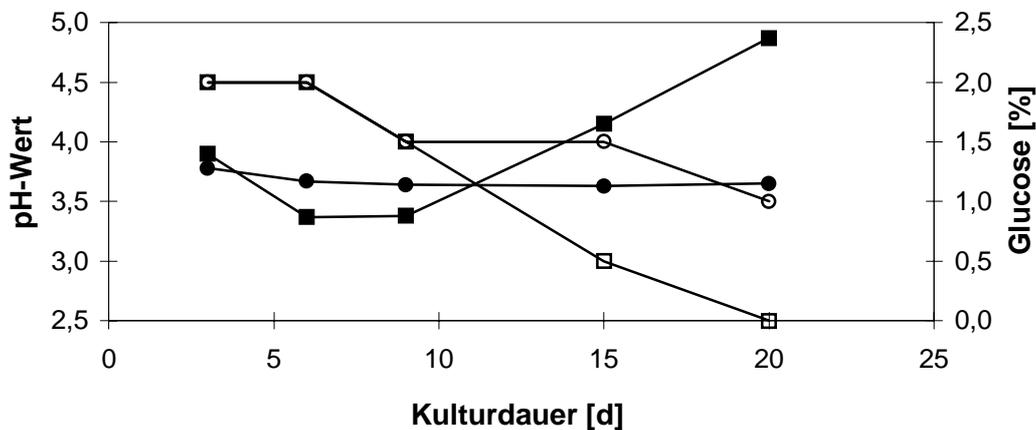


Abb 2-14 pH-Wert von Weserchamp (-■-) und A 20-5 (-●-); Glucoseverbrauch von Weserchamp (-□-) und A 20-5 (-○-) während des Kulturverlaufs in LEATHAM-Medium

2.1.6.2 Variation der Inoculummenge

Die Wachstumseigenschaften von Mikroorganismen hängen unter anderem von den Inoculumbedingungen wie z.B. der zugesetzten Biomasse bzw. Zellzahl ab.

Es wurde untersucht, inwieweit sich durch Variation der eingesetzten Inoculummenge die Ausbeute an Trockenmasse noch steigern läßt. Da im vorangegangenen Versuch v.a. bei A 20-5 das Wachstum noch nicht in die stationäre Phase übergegangen war und damit auch keine maximalen Werte für die Trockenmasse ermittelt werden konnten, wurde in diesem Versuch die Kultivierungszeit auf 27 Tage verlängert. Dazu wurde mit den in Abb 2-15 aufgeführten Mengen (10, 20, 40 mL) aus den Vorkulturen 3 (siehe 4.3.3.3) inoculiert, deren Trockenmassen für Weserchamp zu 0,45; 0,90 und 1,8 g L⁻¹ und für A 20-5 zu 0,42; 0,84 und 1,68 g L⁻¹ bestimmt wurden.

Abweichend von den bisher in 200 mL Erlenmeyerkolben durchgeführten Experimenten wurde die Kultivierung in 300 mL Erlenmeyerkolben vorgenommen. Dabei wurde die Menge des Mediums so gewählt, daß das Inhaltsvolumen insgesamt nach Inoculierung 150 mL betrug. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte nach der unter 4.3.9.3 beschriebenen Schnellmethode als Doppelbestimmung.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die erhaltenen Werte zum Zeitpunkt der Inoculierung auf null normiert.

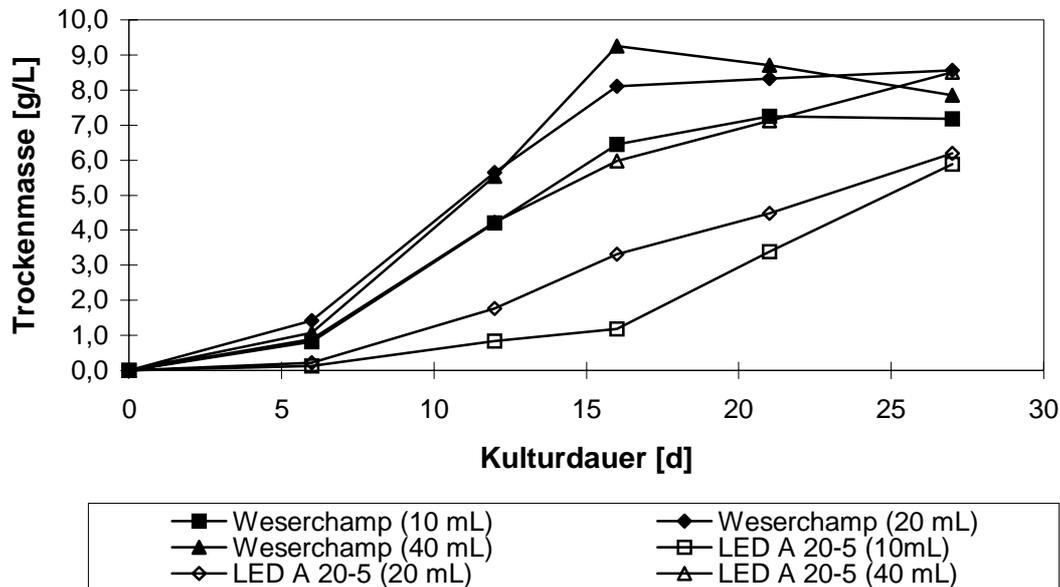


Abb 2-15 Kulturverlauf in LEATHAM-Medium bei verschiedenen Inoculummengen (10, 20, 40 mL)

Bei Weserchamp führte eine Verdoppelung der Inoculummenge von 10 auf 20 mL zu einer deutlichen Zunahme der Biomasse von 6,5 auf 8,2 g L⁻¹, während bei einer weiteren Verdoppelung der Inoculummenge von 20 auf 40 mL die Biomasse kaum noch zunahm. Die exponentiellen Verläufe der Wachstumsphasen verliefen bei diesen beiden Versuchen nahezu parallel; der maximale Trockenmassegehalt von 9,3 g L⁻¹ am 16. Kulturtag wurde bei einer Inoculummenge von 40 mL erzielt. Zum Ende der Kultivierung wurde jedoch bei dieser Konzentration eine deutliche Abnahme der Biomasse beobachtet, während bei einer Inoculummenge von 20 mL die Trockenmassegehalte zwischen dem 16. und 27. Kulturtag leicht zunehmen konnten.

Bei A 20-5 hatte die Menge an Inoculum einen deutlich größeren Einfluß auf das Wachstumsverhalten und die gebildete Biomasse. Hier wurde durch eine Erhöhung an Inoculum eine Verkürzung der lag-Phase erreicht, wobei am Ende der Kultivierung eine nahezu gleiche maximale Trockenmasse von etwa 6 g L⁻¹ sowohl bei einem Inoculum von 10 als auch bei 20 mL erzielt wurde. Lediglich bei einem Inoculum von 40 mL war eine gesteigerte Biomassebildung zu beobachten, wobei am 27. Kulturtag das Maximum der Wachstumsphase noch nicht erreicht war. Mit Trockenmassegehalten von 8,5 g L⁻¹ wurde ein ähnlich hoher Gehalt erreicht wie bei Weserchamp.

Die im vorangegangenen Versuch 2.1.6.1 extrem lange lag-Phase wurde hier nicht beobachtet. Der exponentielle Verlauf der Wachstumsphase beginnt bei beiden Stämmen zwischen dem 6. und 10. Kulturtag; bei A 20-5 wurden deutlich höhere Trockenmassen erzielt. Dieses auffällige Verhalten könnte mit einer Adaption an das LEATHAM-Medium zusammenhängen, da die Kultivierung der Vorkulturen ebenfalls in diesem Medium erfolgte.

2.1.7 Kultivierung von *Lentinus edodes* im Laborbioreaktor

Die bislang durchgeführten Optimierungsversuche erfolgten im Schüttelkolbenmaßstab. Es sollte untersucht werden, ob eine Übertragung der Kultivierung ohne Probleme bzgl. des Wachstums in den Labortischfermentermaßstab möglich war.

Die Möglichkeit einer Kultivierung im Bioreaktor ist eine wichtige Voraussetzung für eine Maßstabsvergrößerung der Kultivierung. Aufgrund veränderter Parameter wie z.B. ein Ansteigen des Eintrags mechanischer Energie oder des Sauerstoffs können das „upscaling“ des biotechnischen Prozesses negativ beeinflussen. Daneben können eine vermehrte Schaumbildung und eine Viskositätszunahme des Mediums apparativ problematisch sein.

Die Kultivierung wurde mit *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp in LEATHAM-Medium durchgeführt. Für das Experiment im Bioreaktor wurde ein Infors-Fermenter mit einem 5 L Kulturgefäß gewählt, das über ein Doppelmantelgefäß mit externem Wasserkreislauf temperiert (24 °C) werden kann. Der pH-Wert und die Sauerstoffsättigung des Mediums wurden online durch eingebaute Meßelektroden bestimmt, während die Glucosekonzentration an Proben offline bestimmt wurde. Die Probenahme erfolgte durch einen sterilisierbaren Probenahmestutzen, wobei für die Bestimmung der Trockenmasse ca. 100 mL des Mediums entnommen wurden, um eine möglichst repräsentative Stichprobe des gesamten Inhalts des Bioreaktors zu erhalten.

Problematisch bei der Kultivierung war vor allem die starke Schaumbildung und damit das Aufschwimmen und Festwachsen von Biomasse im Kopfraum des Reaktors. Dies führte darüber hinaus zu einem Biomasseaustag aus dem Medium durch die Abluftleitungen. Aufgrund dieses Problems und des recht großen Probenahmenvolumens wurde an den Probenahmetagen das entnommene bzw. entwichene Medium durch frisches Kulturmedium (200 mL) ersetzt.

Das Mycel bildete an den Armaturen v.a. am Belüftungsrohr größere Aggregate, die teilweise zum Zuwachsen der Belüftungslöcher führten.

Die Sauerstoffversorgung unterlag daher im Laufe der Kultivierung starken Schwankungen, so daß bei diesem Parameter keine fehlerfreien Messungen durchgeführt werden konnten. Der Wachstumsverlauf und die Parameter Glucoseverbrauch und pH-Wert sind in Abb 2-16 dargestellt.

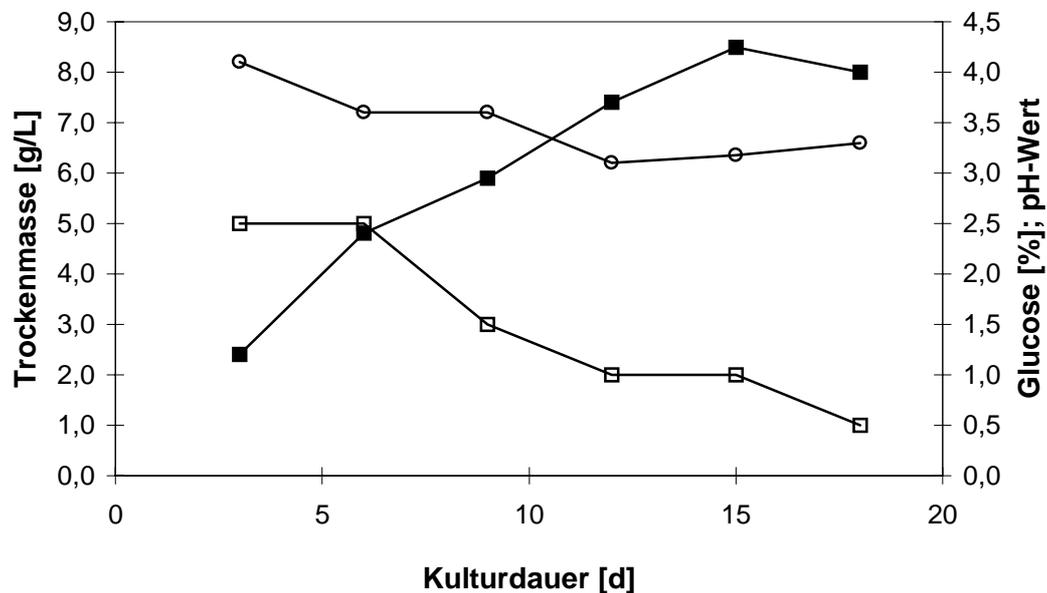


Abb 2-16 Kultivierung von *Lentinus edodes* Weserchamp im Labor-Bioreaktor in LEATHAM-Medium (-■- Trockenmasse, -□- Glucose, -○- pH-Wert)

Die Kultivierung von *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp im Labor-Bioreaktor zeigte trotz der oben beschriebenen Probleme einen ähnlichen Verlauf wie in den Schüttelkolbenkulturen. Mit einer maximalen Trockenmassenausbeute von $8,5 \text{ g L}^{-1}$ wurden vergleichbare Werte erzielt.

Die Ergebnisse aus den Schüttelkolbenkulturen sind damit übertragbar und ein „upscaling“ prinzipiell möglich.

2.2 Einsatz faktorieller Versuchspläne zur Optimierung von LEATHAM-Medium

2.2.1 Plackett-Burman-Design

2.2.1.1 Vorbemerkung

Die Untersuchung von Einflüssen der Medienbestandteile auf das Wachstum und damit die Bildung von Biomasse von *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp wurde mit Hilfe eines statistischen Versuchsplans durchgeführt.

Um die Auswahl geeigneter Parameter zu treffen, die in folgenden Versuchen weiter optimiert werden können, wurde ein Versuchsdesign nach PLACKETT und BURMAN [21, 22] angewendet. Beim PLACKETT-BURMAN-Design handelt es sich um ein fraktionelles faktorielles Design mit zwei Konzentrationsstufen. Um $(n - 1)$ verschiedene Parameter auf zwei Konzentrationsstufen zu untersuchen, benötigt man hier nur n Experimente, während man für ein vollständiges faktorielles Design 2^n Experimente benötigen würde (für 11 Variablen also 2048 Experimente). Aufgrund der starken Reduzierung der durchzuführenden Experimente werden in dem PLACKETT-BURMAN-Design Haupt- und Wechselwirkungseffekte aller Ordnungen miteinander vermengt, so daß hier nur Haupteffekte abzuschätzen sind, für die eine Rangordnung erstellt werden kann.

2.2.1.2 Aufstellung des Versuchsplans

Für die Untersuchung der Bildung von Biomasse bei *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp wurde ein Design mit 11 Variablen in 12 Experimenten (entsprechend 12 Medienvariationen) entwickelt [23]. Die Faktorkombinationen sind Tab 2-1 zu entnehmen. 8 der Variablen waren echte Medienbestandteile, während 3 Variablen als sog. „Dummies“ eingesetzt wurden (siehe Tab 2-2). Dummies sind Variablen im Design, die keinem Medienbestandteil zugeordnet sind, deren Level (niedrig oder hoch) nicht zu realen Effekten führen sollte. Die Zuordnung von + und – bei den Dummies stellt somit eine Fortsetzung des Schemas für den Versuchsplan dar. Der „Effekt“ der Dummies ist im Idealfall = 0. Die Dummyvariablen sind daher geeignet, statistische Schwankungen und daraus die Signifikanz der realen Effekte durch die anderen Variablen abzuschätzen. Die Auswahl der 8 Variablen orientierte sich an definiert zusammengesetzten Medien. Dies war sowohl das SNL-B₁-Medium, da hier mit Weserchamp nur ein geringes Wachstum erzielt werden konnte, als auch das LEATHAM-Medium, da mit diesem Kulturmedium die größten Trockenmassegehalte erreicht wurden. Mit Ausnahme der Glutaminsäure dienten alle im SNL-B₁-Medium vorhandenen Bestandteile als niedrige Konzentrationsstufe während die des LEATHAM-Mediums als hohe Konzentrationsstufen fungierten, so daß im PLACKETT-BURMAN-Design ermittelt werden konnte, welcher der Medienbestandteile des LEATHAM-Mediums das Wachstum und die Bildung von Biomasse begünstigt.

Tab 2-1 PLACKETT-BURMAN-Versuchsplan für $(n - 1) = 11$ Variablen in $n = 12$ Experimenten

| Variable → | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| Vers.Nr. ↓ | | | | | | | | | | | |
| 1 | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - |
| 2 | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - | + |
| 3 | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - |
| 4 | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - | - |
| 5 | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - |
| 6 | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + |
| 7 | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + | + |
| 8 | + | + | - | - | - | + | - | + | + | - | + |
| 9 | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + | - |
| 10 | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + | + |
| 11 | + | - | + | + | + | - | - | - | + | - | + |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

(+ = hohe Konzentration; - = niedrige Konzentration)

Zu den Medienbestandteilen, die nicht als Variablen gehandhabt wurden, gehörten Glucose (25 g L^{-1}) und KH_2PO_4 ($2,0 \text{ g L}^{-1}$), da es zwischen dem LEATHAM-Medium und dem SNL-B₁-Medium keine signifikanten Konzentrationsunterschiede gibt. Medienbestandteile, die im LEATHAM-Medium aber nicht im SNL-B₁-Medium enthalten waren, wurden als niedrige Konzentrationsstufe dem entsprechenden Versuch nicht zugesetzt. Sowohl Thiamin als auch die Vitamin-Mischung wurde nach dem Autoklavieren als sterilfiltrierte Lösung zupipettiert.

Tab 2-2 Medienparameter und Konzentrationsstufen für das PLACKETT-BURMAN-Design 1

| Variable | Medienbestandteil | Design-Versuch Konzentrationsstufen | |
|-----------|---|-------------------------------------|-----------------------|
| | | hoch | niedrig |
| 1 | L-Glutaminsäure | 4,5 g L ⁻¹ | 2,5 g L ⁻¹ |
| 2 | D-Glucuronsäure | 4,0 g L ⁻¹ | 0 |
| 3 | MgSO ₄ | 2,0 g L ⁻¹ | 0,5 g L ⁻¹ |
| 4 | CaCl ₂ | 37 mg L ⁻¹ | 0 |
| 5 | <u>Mineralstoffe</u> | | |
| | MnSO ₄ | 31 mg L ⁻¹ | 30 µg L ⁻¹ |
| | ZnSO ₄ | 22 mg L ⁻¹ | 90 µg L ⁻¹ |
| | Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ | 14 mg L ⁻¹ | 80 µg L ⁻¹ |
| | CuSO ₄ | 0,78 mg L ⁻¹ | 5 µg L ⁻¹ |
| 6 | <u>Spurenelemente</u> | | |
| | CoCl ₂ | 80 µg L ⁻¹ | 0 |
| | (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ | 90 µg L ⁻¹ | 0 |
| | NiCl ₂ | 80 µg L ⁻¹ | 0 |
| | SnCl ₂ | 40 µg L ⁻¹ | 0 |
| 7 | Thiamin | 2 mg L ⁻¹ | 1 mg L ⁻¹ |
| 8 | <u>Vitamine</u> | | |
| | myo-Inosit | 1 mg L ⁻¹ | 0 |
| | Pyridoxin-HCl | 1 mg L ⁻¹ | 0 |
| | Nicotinsäure | 0,1 mg L ⁻¹ | 0 |
| | Ca-Panthotenat | 0,1 mg L ⁻¹ | 0 |
| | p-Aminobenzoesäure | 0,1 mg L ⁻¹ | 0 |
| | Riboflavin | 0,1 mg L ⁻¹ | 0 |
| | Biotin | 30 µg L ⁻¹ | 0 |
| | Folsäure | 10 µg L ⁻¹ | 0 |
| | Vit. B ₁₂ | 10 µg L ⁻¹ | 0 |
| 9, 10, 11 | Dummy | — | — |

2.2.1.3 Wachstumskurve und Effekte des PLACKETT-BURMAN-Designs 1

Die Versuche wurden jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt. Aufgrund der großen Anzahl von Kulturen ($n = 24$), die aus einer Vorkultur beimpft wurden, wurde die Trockenmasse des Inoculums bestimmt (Schnellmethode, siehe 4.3.9.3). Dieser Wert diente als Trockenmassegehalt der Kulturen am 0. Kulturtag und ist damit bei allen Versuchen gleich. Da es sich gezeigt hat, daß in vorherigen Versuchen die stationäre Wachstumsphase am

20. Kulturtag noch nicht abgeschlossen war, wurde der Kulturverlauf des PLACKETT-BURMAN-Designs bis zum 30. Kulturtag ermittelt.

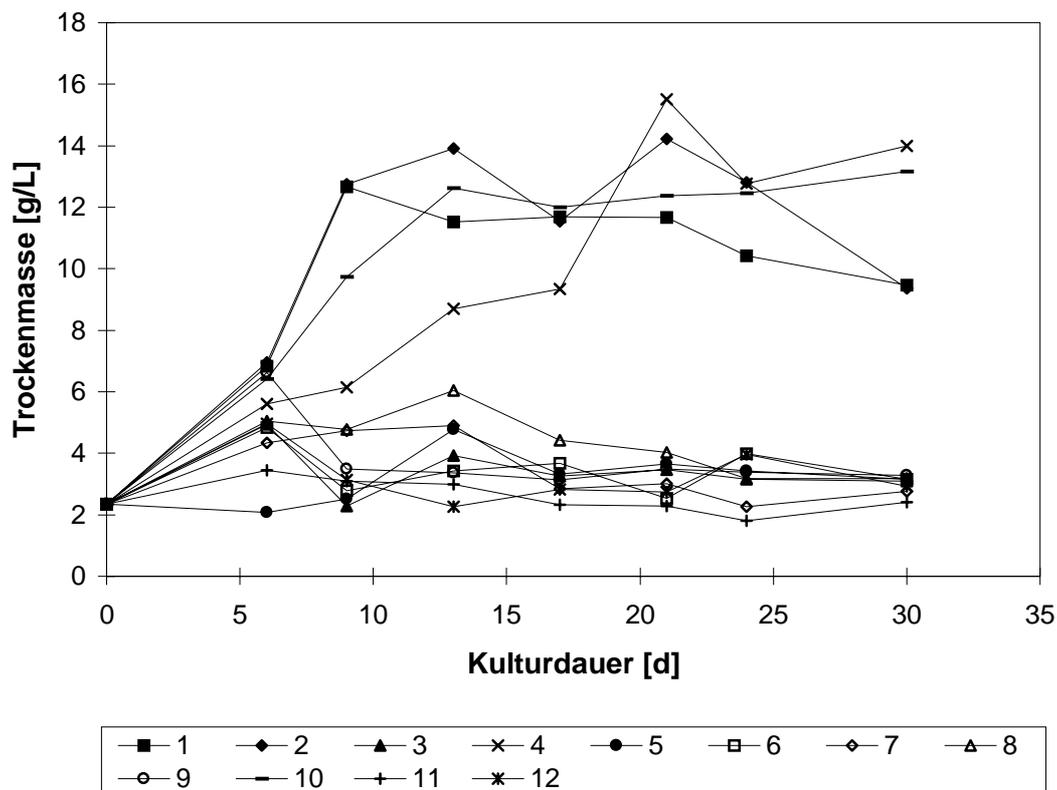


Abb 2-17 Kulturverläufe der Versuche des PLACKETT-BURMAN-Designs 1

Die Wachstumsverläufe im PLACKETT-BURMAN-Design zeigten bei fast allen Versuchen eine relativ kurze lag-Phase, die am 6. Kulturtag in den exponentiellen Verlauf der Wachstumsphase überging. Diese war bei den Versuchen 1, 2, 4 und 10 besonders deutlich ausgeprägt, wobei Trockenmassegehalte von bis zu 15 g L^{-1} erzielt wurden. Schon aus den Wachstumskurven wird der Einfluß der unterschiedlichen Medienbestandteile deutlich. Neben den vier erwähnten Versuchen, die eine ausgeprägte Biomassebildung zeigten, ergaben sich bei den Versuchen 7 und 8 deutlich geringere Trockenmassegehalte, obwohl auch hier ein Wachstum zu erkennen war. Bei den übrigen Versuchen 3, 5, 6, 9, 11 und 12 stagnierte das Wachstum bzw. es kam zu einer Wachstumsdepression wie z.B. bei Versuch 11. Die Effekte der einzelnen Variablen wurden wie unter 4.4.3.12 beschrieben am 6. und 21. Kulturtag ermittelt und sind Abb 2-18 resp. Abb 2-19 zu entnehmen.

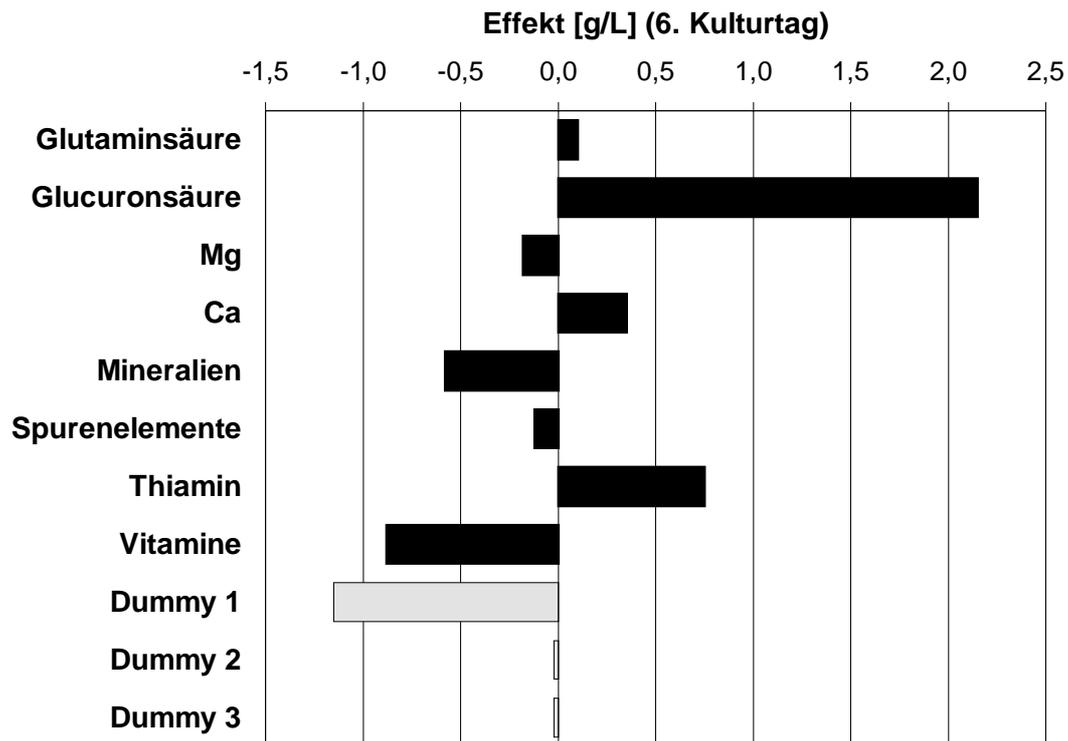


Abb 2-18 Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Trockenmasse am 6. Kulturtag

Unter Berücksichtigung der Dummyvariablen ergab sich zu Beginn der Kultivierung nur für die Glucuronsäure ein deutlich positiver Effekt mit über 2 g L^{-1} .

Die übrigen Medienbestandteile zeigten nur geringfügige sowohl positive als auch negative Effekte, die im Schwankungsbereich der Dummies lagen.

Am 21. Kulturtag waren die erzielten Effekte auf die Trockenmasse im PLACKETT-BURMAN-Design 1 deutlicher ausgeprägt, wie man auch schon in den Kulturverläufen der einzelnen Versuche (siehe Abb 2-17) erkennen konnte. Die Glucuronsäure zeigte auch zu diesem Zeitpunkt den größten positiven Effekt von allen untersuchten Medienbestandteilen auf das Wachstum und damit die Bildung von Biomasse. Der Effekt auf die Trockenmasse steigerte sich gegenüber dem 6. Kulturtag noch deutlich und lag bei $7,3 \text{ g L}^{-1}$.

Unter Berücksichtigung der Dummyvariablen ergaben sich für den Zusatz von Calcium ein leicht positiver ($2,8 \text{ g L}^{-1}$) und für eine höhere Konzentration an Mineralien im Medium ein deutlich positiver Effekt ($3,6 \text{ g L}^{-1}$). Glutaminsäure, die als einzige Stickstoffquelle in den Versuchen zugesetzt wurde, zeigte einen negativen Effekt, so daß sich hier die in höherer Konzentration zugesetzte Menge negativ auf die Trockenmassegehalte auswirkte. Alle übrigen Medienbestandteile zeigten unter Berücksichtigung der Dummyvariablen nur marginale, meist positive Effekte.

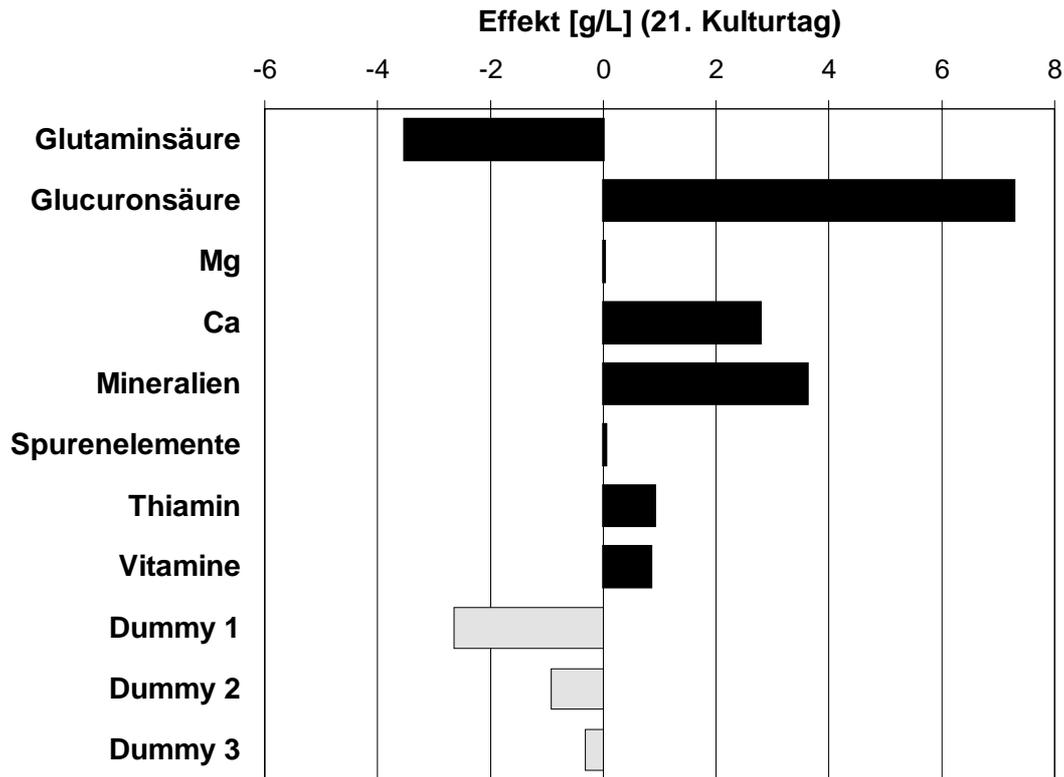


Abb 2-19 Effekte verschiedener Medienbestandteile auf die Trockenmasse am 21. Kulturtag

2.2.1.4 Versuchsplan für PLACKETT-BURMAN-Design 2

Die Variable 5 im PLACKETT-BURMAN-Design 1 war ein aus den Mineralsalzen MnSO_4 , ZnSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und CuSO_4 bestehender zusammengesetzter Parameter, so daß der beobachtete Einfluß nur einen Summeneffekt aus den vier Medienbestandteilen darstellte. Es konnte daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob der positive Effekt durch eines oder mehrere der Metallsalze bedingt war und ob ein negativer Effekt eines oder mehrerer Bestandteile überdeckt wurde.

Daher wurde diese zusammengesetzte Variable in einem weiteren faktoriellen Versuch durch Aufteilung in separate Variablen näher untersucht. Zur Vereinfachung der Versuchsdurchführung wurde wieder das PLACKETT-BURMAN-Design gewählt, und es wurden nicht nur die Summenvariable der Mineralien, sondern auch die der Spurenelemente miteinbezogen.

Der Versuchsplan ist Tab 2-1, die Zuordnung der Variablen sowie die Konzentrationen ist Tab 2-3 zu entnehmen. Die übrigen Medienbestandteile, die nicht im Versuchsplan untersucht werden sollten, wurden konstant gehalten.

Sie wurden in gleichen Konzentrationen eingesetzt, wie sie im LEATHAM-Medium vorliegen, da mit diesem Medium vor allem mit den Medienbestandteilen Glucuronsäure, CaCl_2 und den Mineralsalzen positive Effekte auf die Bildung von Biomasse erzielt wurden (für die übrigen Medienbestandteile Glucose, Glucuronsäure, Glutaminsäure, KH_2PO_4 , MgSO_4 und Vitaminlösung siehe 4.4.2.4).

Tab 2-3 Medienparameter und Konzentrationsstufen für das PLACKETT-BURMAN-Design 2

| Variable | Medienbestandteil | Design-Versuch Konzentrationsstufen | |
|------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------|
| | | hoch | niedrig |
| <u>Mineralstoffe</u> | | | |
| 1 | MnSO_4 | 31 mg L ⁻¹ | 30 µg L ⁻¹ |
| 2 | ZnSO_4 | 22 mg L ⁻¹ | 90 µg L ⁻¹ |
| 3 | $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ | 14 mg L ⁻¹ | 80 µg L ⁻¹ |
| 4 | CuSO_4 | 0,78 mg L ⁻¹ | 5 µg L ⁻¹ |
| <u>Spurenelemente</u> | | | |
| 5 | CoCl_2 | 0,08 mg L ⁻¹ | 0 |
| 6 | $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ | 0,09 mg L ⁻¹ | 0 |
| 7 | NiCl_2 | 0,08 mg L ⁻¹ | 0 |
| 8 | SnCl_2 | 0,04 mg L ⁻¹ | 0 |
| 9, 10, 11 | Dummy | — | — |

Auch im PLACKETT-BURMAN-Design 2 wurden zur Fehlerabschätzung die Variablen 9, 10 und 11 als Dummies eingesetzt, die wie im PLACKETT-BURMAN-Design 1 keinem Medienbestandteil zugeordnet wurden und daher auch keine Effekte zeigen sollten.

2.2.1.5 Wachstumskurve und Effekte des PLACKETT-BURMAN-Designs 2

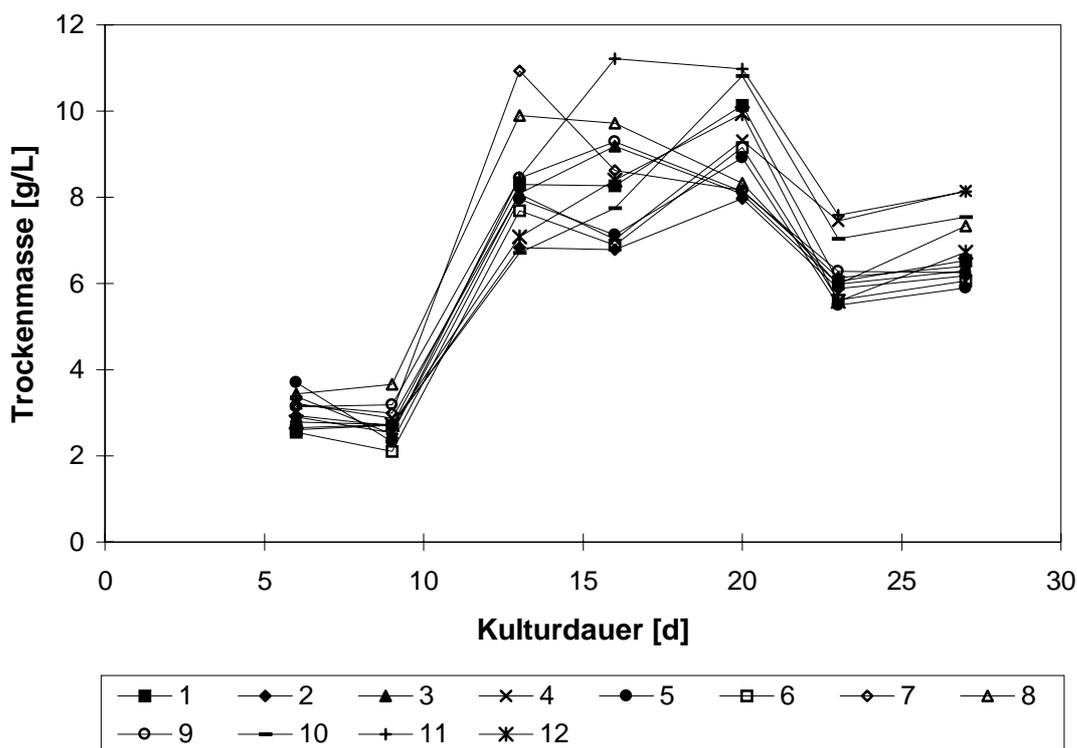


Abb 2-20 Kulturverläufe der Versuche des PLACKETT-BURMAN-Designs 2

Die Wachstumskurven verliefen im PLACKETT-BURMAN-Design 2 bis zum 9. Kulturtag bei allen Versuchen sehr ähnlich und auch im weiteren Kulturverlauf waren die Unterschiede in gebildeter Biomasse nicht signifikant. In den Versuchen 7, 9, 10 und 11 wurden mit $11,2 \text{ g L}^{-1}$ die höchsten Trockenmassegehalte erzielt.

Dennoch zeigte sich in den Versuchen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Dieses spiegelte sich bei den pH-Werten, die während der Kultivierung ermittelt wurden wider (Abb 2-21). Bei einer Kultivierung, die ein positives Wachstum und eine rasche Produktion von Biomasse zeigt, wird der pH-Wert des Mediums zunächst durch Bildung von organischen Säuren abgesenkt und steigt dann mit zunehmendem Verbrauch von Glucose zum Ende der Kultivierung wieder an. Ist das Wachstum weniger ausgeprägt bzw. verläuft langsamer, wird der pH-Wert des Kulturmediums lediglich abgesenkt. Ein erneuter Anstieg des pH-Wertes kann innerhalb des Kultivierungszeitraumes nicht beobachtet werden. In den Versuchen des PLACKETT-BURMAN-Designs 2 konnte man in den Versuchen 1,3,7,8,9 und 11 zum Ende der Kultivierung einen Anstieg des pH-Wertes verzeichnen, während bei den übrigen Versuchen der pH-Wert des Kulturmediums über den gesamten Kultivierungszyklus im sauren Bereich blieb.

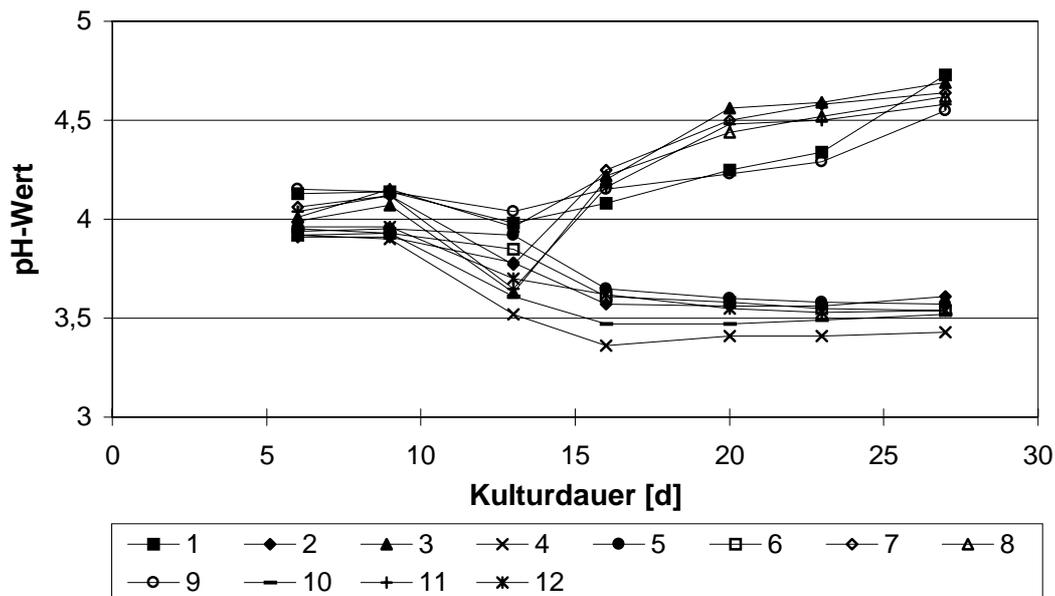


Abb 2-21 pH-Werte im Kulturverlauf des PLACKETT-BURMAN-Designs 2

Um den Einfluß der Variablen im PLACKETT-BURMAN-Design 2 auf die Trockenmassegehalte zu bestimmen, wurden die Effekte der einzelnen Variablen über den gesamten Kulturverlauf wie unter 4.4.3.12 beschrieben berechnet. Die Effekte der Mineralsalze MnSO_4 , ZnSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und CuSO_4 sind in Abb 2-22 und die der Spurenelemente CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, NiCl_2 und SnCl_2 in Abb 2-23 dargestellt. Die Einflüsse der Dummies, die ebenfalls bestimmt wurden, lagen über den gesamten Kulturverlauf nicht höher als $\pm 0,28 \text{ g L}^{-1}$ und geben die Schwankungsbreite des Designs an. Zunächst war beim Vergleich der beiden PLACKETT-BURMAN-Designs zu beobachten, daß die Effekte im zweiten Design geringer ausfielen, da hier in allen Versuchen Glucuronsäure als Medienbestandteil vorhanden war. Diese hatte zuvor im PLACKETT-BURMAN-Design 1 den größten positiven Effekt gezeigt, der im zweiten Design bei allen Versuchen einfließt.

Die ermittelten Effekte der Mineralsalze zeigten, daß sich tatsächlich nicht alle vier Bestandteile der Summenvariable des PLACKETT-BURMAN-Designs 1 positiv auf die Trockenmassegehalte auswirken. Mangan zeigte in der exponentiellen Wachstumsphase der Kultivierung einen positiven Effekt, der am 16. Kulturtag mit über 2 g L^{-1} ein Maximum erreichte. Am 20. bzw. 23. Kulturtag, an dem sich der Pilz am Ende der stationären Wachstumsphase befindet, wie im Kulturverlauf (Abb 2-20) deutlich wird, waren die Effekte unter Berücksichtigung der Dummies mit $-0,3$ bzw. $+0,2 \text{ g L}^{-1}$ nur noch marginal vorhanden. Der Einfluß der höheren Konzentration von Zink im Medium fiel recht gering aus und lag nur wenig über der Schwankungsbreite der Dummies, wobei aber kein eindeutiger Trend zu erkennen war, da er sich sowohl positiv als auch negativ auswirkte. Eisen und Kupfer zeigten qualitativ ähnliche Effekte, die entgegengesetzt zu denen des Mangans verliefen. Während sie bis zum 13.

Kulturtag mit steigender Tendenz negativ ausfielen, zeigten Eisen ab dem 16. und Kupfer ab dem 20. Kulturtag positive Effekte.

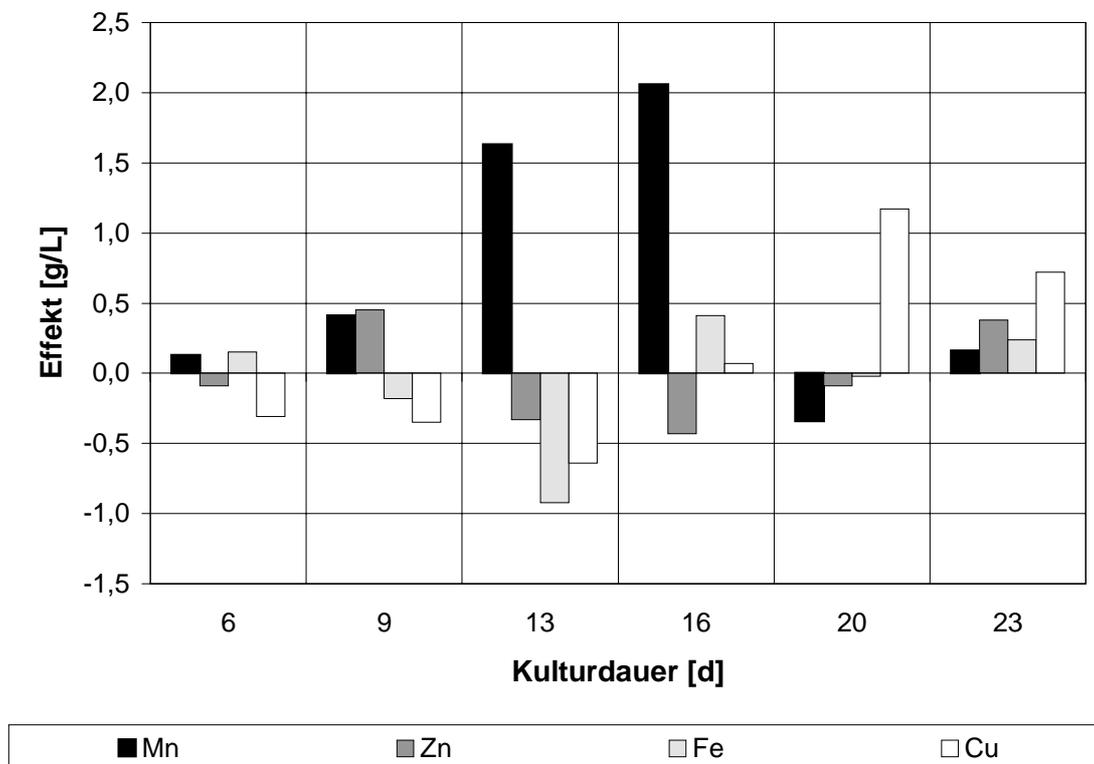


Abb 2-22 Effekte von Mn, Zn Fe und Cu im PLACKETT-BURMAN-Design 2

Die im PLACKETT-BURMAN-Design 1 als Summenvariable eingesetzten Spurenelemente CoCl_2 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, NiCl_2 und SnCl_2 hatten nur einen geringen Einfluß auf das Wachstum und damit den Gehalt an Trockenmasse. Im PLACKETT-BURMAN-Design 2, in dem jedes Spurenelement als einzelne Variable untersucht wurde, zeigte sich für die Bestandteile ein recht uneinheitliches Bild.

Die Effekte von Kobalt waren gering und wirkten sich an den einzelnen Kulturtagen unsystematisch positiv und negativ aus. Für Molybdän ergab sich durchgängig ein negativer Effekt auf die Trockenmassegehalte, wobei er ab dem 16. Kulturtag bei etwa $-0,8 \text{ g L}^{-1}$ lag. Ähnliche Einflüsse wurden beim Zusatz von Nickel zum Kulturmedium beobachtet. Hier überwogen ebenfalls die negativen Effekte, die am 20. Kulturtag ein Maximum von $-1,38 \text{ g L}^{-1}$ erreichten. Für die Anwesenheit von Zinn im Kulturmedium ergab sich qualitativ ein vergleichbar uneinheitliches Bild wie beim Kobalt.

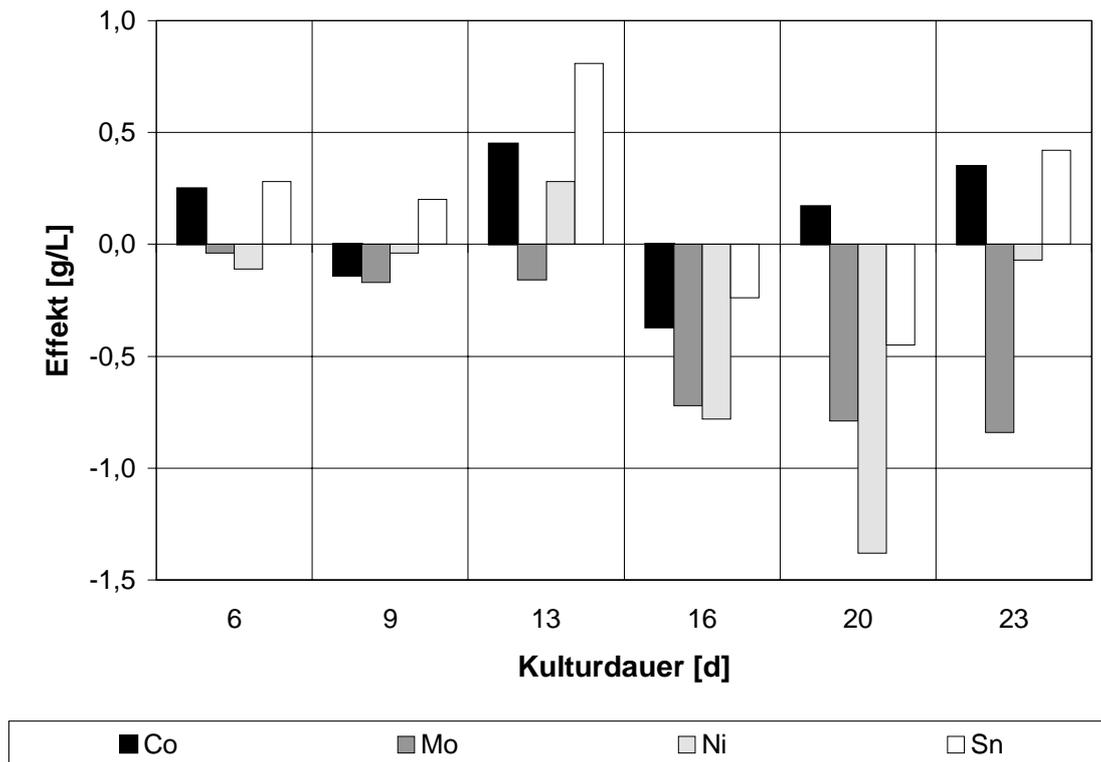


Abb 2-23 Effekte von Co, Mo, Ni und Sn im PLACKETT-BURMAN-Design 2

2.2.2 Optimierung des LEATHAM-Mediums

In den beiden durchgeführten PLACKETT-BURMAN-Design-Versuchsanordnungen 1 und 2 wurden die einzelnen Medienbestandteile hinsichtlich ihres Potentials, einen positiven Einfluß auf das Wachstum auszuüben, untersucht. Die größten Effekte konnten bei dem Zusatz von Glucuronsäure (Konzentration im Medium $4,0 \text{ g L}^{-1}$) und Mangan (Konzentration im Medium 31 mg L^{-1}) erzielt werden.

2.2.2.1 Glucuronsäure

Glucuronsäure gehört zu der Gruppe von Zuckersäuren, die unter Erhaltung der Carbonylfunktion an C1 nur an der HOCH_2 -Gruppe zur Säure oxidiert sind.

Da dieser Medienbestandteil für eine kommerzielle Anwendung verhältnismäßig kostenintensiv ausfällt, wurde nach einer preisgünstigeren Alternative gesucht. Es wurde geprüft, wie sich ein Ersatz der Glucuronsäure im LEATHAM-Medium durch Galakturonsäure bzw. Gluconsäure auf das Wachstum bzw. auf die Bildung von Biomasse auswirkt.

Dabei wurden Galakturon- bzw. Gluconsäure in gleichen Konzentrationen ($4,0 \text{ g L}^{-1}$) wie Glucuronsäure eingesetzt.

Alle übrigen Medienbestandteile sowie ihre eingesetzten Konzentrationen wurden nicht verändert.

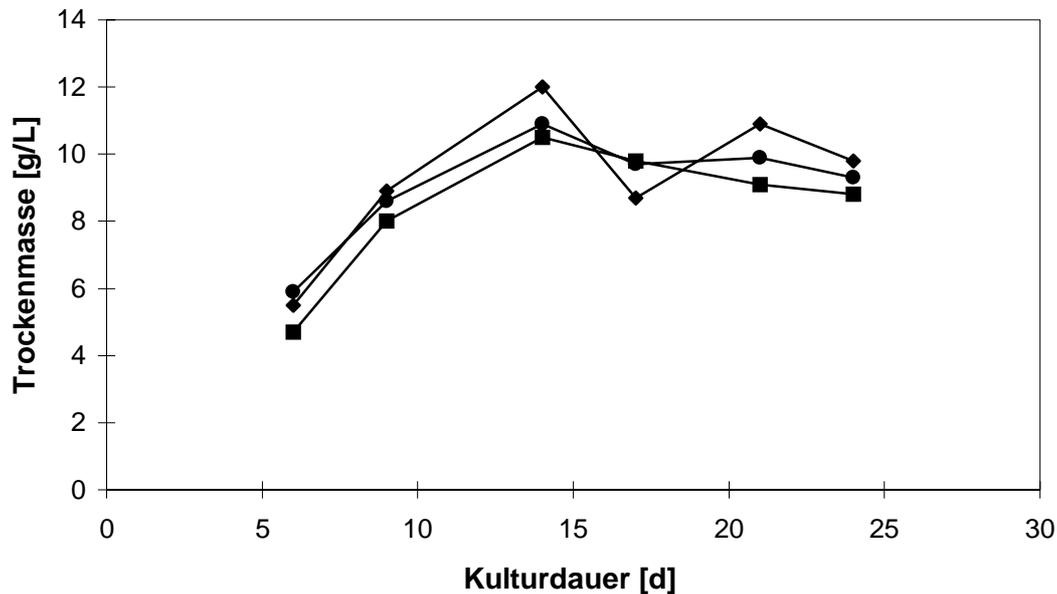


Abb 2-24 Kulturverlauf von Weserchamp in LM (-■-), LM-Galakturonsäure (-●-) und LM-Gluconsäure (-◆-)

Der Zusatz unterschiedlicher Zuckersäuren zum LEATHAM-Medium zeigte im Wachstumsverhalten von Weserchamp keine signifikanten Unterschiede, die Wachstumskurven verliefen nahezu parallel. Die höchsten Trockenmassegehalte wurden mit dem LM-Gluconsäure-Medium erzielt. Am 14. Kulturtag wurden in diesem Medium 12 g L^{-1} an Trockenmasse erreicht, während in den beiden anderen Medien die Trockenmassegehalte bei etwa $10,5 \text{ g L}^{-1}$ lagen. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, daß man die Glucuronsäurequelle durch alternative und preiswertere Zuckersäuren ersetzen kann.

In einem Folgeexperiment wurden die Zuckersäuren durch Polysaccharide, deren Bausteine überwiegend aus Zuckersäuren bestehen, ausgetauscht. Glucuronsäure wurde durch Pektin ersetzt, das vorwiegend aus (1 → 4)-verknüpfter α -D-Galakturonsäure besteht. In einem Vergleichsversuch wurde die Glucuronsäure durch das Monomer des Pektins, also reine Galakturonsäure ersetzt. Als Kontrollversuch kam ein Medium ohne Zusatz von Zuckersäuren oder Polysacchariden zum Einsatz. Pektin wurde außerdem als Mischung in wechselnden Anteilen mit Galakturonsäure dem LEATHAM-Medium zugesetzt (genaue Zusammensetzung der Medien siehe 4.4.3.9).

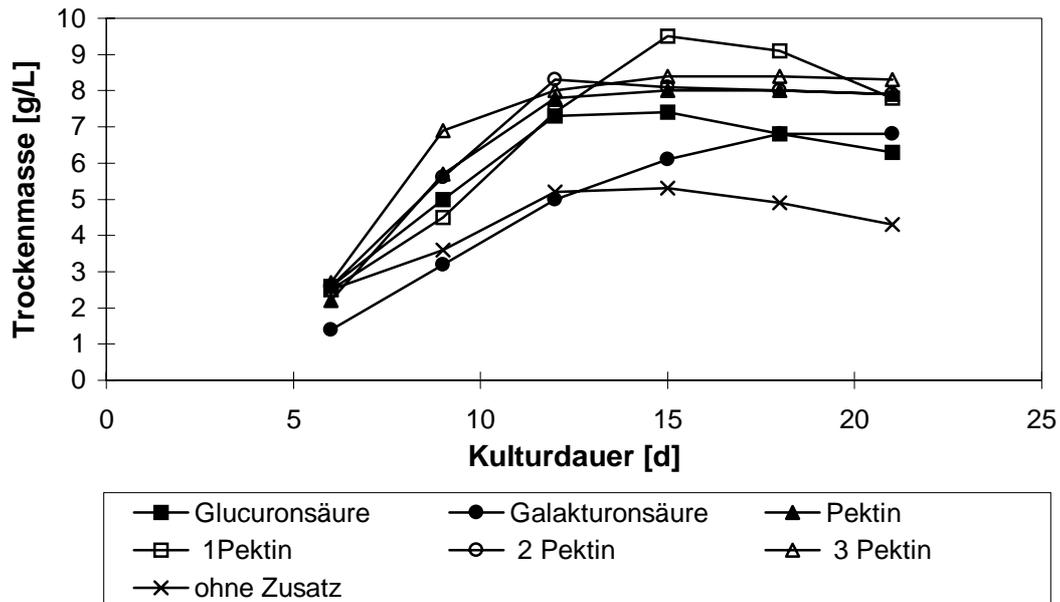


Abb 2-25 Kulturverlauf von Weserchamp in LEATHAM-Medium (Zusammensetzung siehe 4.4.3.9)

Die größten Unterschiede im Wachstumsverhalten zeigten sich im Vergleich zum Medium ohne Zusatz von Zuckersäuren. Hier wurden als maximale Trockenmassen $5,2 \text{ g L}^{-1}$ erzielt, während in den anderen Versuchen die höchsten Trockenmassegehalte bei $7,3 \text{ g L}^{-1}$ (Glucuronsäure), ca. 8 g L^{-1} (Pektin, 2 Pektin und 3 Pektin) und $9,5 \text{ g L}^{-1}$ (1 Pektin) lagen. Eine Ausnahme bildete der Versuch mit einem Zusatz an reiner Galakturonsäure, bei dem etwas geringere maximale Trockenmassen von $6,9 \text{ g L}^{-1}$ erzielt wurden. Allerdings liegt die Wachstumskurve schon zu Beginn der Kultivierung deutlich unterhalb der anderen Versuche, so daß hier der Einfluß einer zu geringen Inoculummenge (siehe auch 2.1.6.2) sichtbar wird. Die geringere Inoculummenge zeigte sich ebenfalls an einer differenziert verlaufenden Wachstumskurve. Während bei den anderen Versuchen das Wachstumsmaximum zwischen dem 12. und 15. Kulturtag erreicht wurde, trat es im Versuch mit Galakturonsäure als Zusatz erst am 20. Kulturtag auf.

Die beschriebenen Experimente zur Variation der Kohlenhydratquelle konnten zeigen, daß es möglich ist, Glucuronsäure durch ein komplexes Polysaccharid zu ersetzen, wobei sich ein Gemisch aus Galakturonsäure und Pektin (3:1) als besonders günstig bezüglich Biomassebildung auswirkte.

2.2.2.2 Mangan

Im PLACKETT-BURMAN-Design 2 wurde beim Zusatz einer höheren Konzentration an Mangan (31 mg L^{-1}) ein deutlich positiver Effekt auf das Wachstum festgestellt. In einem Folgeexperiment sollte der optimale Konzentrationsbereich an Mangan für das Wachstumsverhalten ermittelt werden. In der Versuchsreihe wurde dem LEATHAM-Medium MnSO_4 in den Konzentrationen 120 mg L^{-1} , 60 mg L^{-1} , 30 mg L^{-1} , 3 mg L^{-1} , $300 \mu\text{g L}^{-1}$ und $30 \mu\text{g L}^{-1}$ zugesetzt und als Blindversuch ein Medium ohne Zusatz ($0 \mu\text{g L}^{-1}$) von MnSO_4 angesetzt (genaue Zusammensetzung der Medien siehe 4.4.3.10).

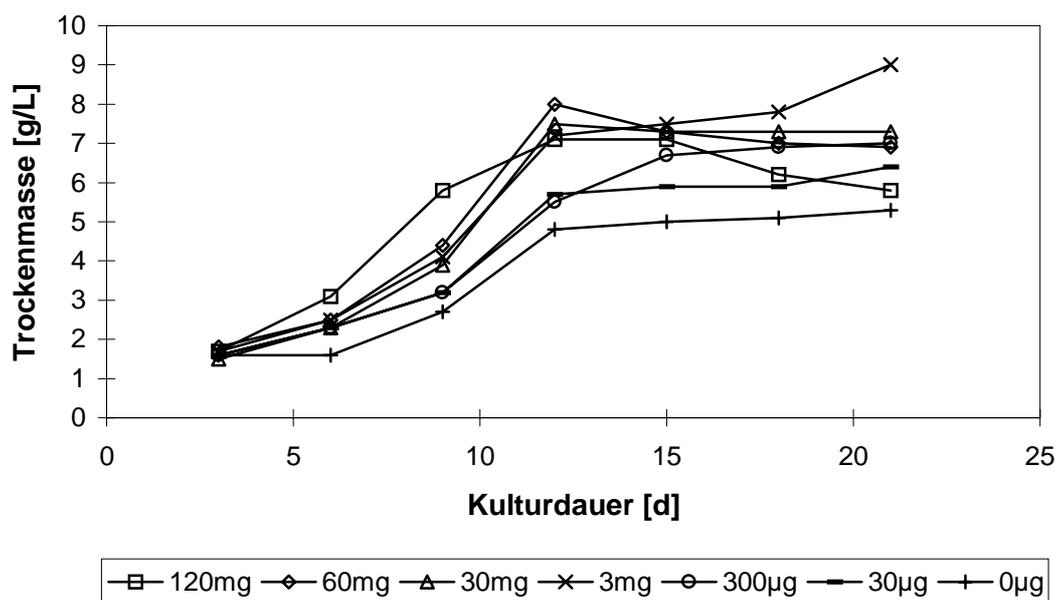


Abb 2-26 Kulturverlauf von Weserchamp in LEATHAM-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Mn

Der positive Effekt des Mangans auf das Wachstum und damit die gesteigerte Bildung von Biomasse, der im PLACKETT-BURMAN-Design 2 ermittelt wurde, konnte bestätigt werden. Im Kontrollversuch ohne Manganzusatz wurden die niedrigsten Trockenmassengehalte gefunden. Der Übergang vom exponentiellen Verlauf der Wachstumsphase in die stationäre Phase erfolgte am 12. Kulturtag mit etwa 5 g L^{-1} gebildeter Trockenmasse. Die Wachstumskurven der übrigen Versuche spiegeln ebenfalls das Ergebnis des PLACKETT-BURMAN-Designs wider. Höhere Konzentrationen an Mangan im Medium wirkten sich wachstumsbeschleunigend aus, so daß bei den Versuchen mit 120 , 60 und 30 mg L^{-1} MnSO_4 vergleichbare Wachstumsmaxima mit $7,1$, $8,0$ und $7,5 \text{ g L}^{-1}$ am 12. Kulturtag erreicht wurde. Die Versuche mit 3 mg , $300 \mu\text{g}$ und $30 \mu\text{g L}^{-1}$ zeigten ein verlangsamtes Wachstum, so daß die höchsten Trockenmassegehalte erst am 21. Kulturtag oder noch später erreicht wurden.

Im Versuch, in dem 3 mg L^{-1} Mangan im Medium vorhanden war, wurde mit 9 g L^{-1} Trockenmasse der höchste Wert aller Versuche gefunden. Die beiden geringeren Konzentrationsvariationen (300 und $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) wiesen am Ende der Kultivierung ähnliche Trockenmassegehalte auf, wie die Versuche, in denen das beschleunigte Wachstum durch Zugabe deutlich höherer Mengen an MnSO_4 zu beobachten war.

2.2.2.3 Fruchtkörpererzeugung mit optimiertem Kulturmedium

Mit den Ergebnissen der Versuche aus PLACKTETT-BURMAN-Design 1 und 2 (siehe 2.2.1.3 und 2.2.1.5) und den daran anschließenden weiteren Optimierungsversuchen (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2) konnte das LEATHAM-Medium für den untersuchten Stamm Weserchamp bezüglich des Wachstums verbessert werden. Dieses optimierte LEATHAM-Medium (LM-opt.) (genaue Zusammensetzung siehe 4.4.3.11) wurde für anschließende Versuche zur Fruchtkörpererzeugung eingesetzt, die im Labormaßstab durchgeführt wurden, um unter möglichst standardisierten Versuchsbedingungen zu arbeiten. Die detaillierte Versuchsdurchführung ist unter 4.3.8 beschrieben, wobei die Versuche jeweils als Doppelbestimmungen angesetzt wurden. Die eingesetzten Substratgrundlagen wurden so ausgewählt, daß sie dem Pilz keine weiteren Nährstoffe zur Verfügung stellen, um möglichst nur den Einfluß des Kulturmediums auf die Bildung von Fruchtkörpern zu erfassen. Sie sollten lediglich den Stand entwickelter Fruchtkörper auf dem Medium stabilisieren. Aufgrund der großen Öffnung des Kulturgefäßes und der nur relativ dünnen Watteschicht als Sterilbarriere, fand eine starke Verdunstung statt, die zu einer schnellen Austrocknung des Kulturgefäßes führte. Dies konnte dadurch verhindert werden, daß alle 5 Tage im Wechsel entweder 10 mL steriles Wasser oder 10 mL frisches Medium (LM-opt.) zupipettiert wurde. Die Kultivierung fand bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Lichtausschluß und Zugang zur Umgebungsluftfeuchtigkeit statt.

Tab 2-4 Versuchsanordnungen und Erträge der Kultivierung zur Fruchtkörpererzeugung

| Versuch | Kulturmedium + Hilfsmittel | Inoculum | Fruchtkörper | Kulturtag [d] |
|---------|-------------------------------|--|--------------|---------------|
| 1 | LM-opt. + Glaswolle | Agar | — | — |
| 2 | LM-opt. + Glaswolle | 10 mL Inoculum aus Vorkultur 3* | ja (1) | 37 |
| 3a | LM-opt. + Watte | Agar | ja (2) | 37 |
| 3b | LM-opt. + Watte | Agar | ja (1) | 42 |
| 4 | LM-opt. + Watte | 10 mL Inoculum aus Vorkultur 3* | ja (1) | 30 |

*siehe 4.3.3.3



Abb 2-27 Fruchtkörper von *Lentinus edodes* in LEATHAM-Medium (optimiert)

Nach rund 40 Kulturtagen konnten auf Basis des optimierten LEATHAM-Mediums (LM-opt.) als Nährstofflösung voll ausgebildete Fruchtkörper von *Lentinus edodes* beobachtet werden. Wie in Abb 2-27 deutlich wird, fällt die Farbe des Hutes wesentlich heller als bei handelsüblichen Produkten aus, was jedoch an der Kultivierung unter Lichtausschluß liegen könnte. Die ersten Fruchtkörper bildeten sich mit dem optimierten LEATHAM-Medium schon nach 30 Kulturtagen, so daß der Einfluß der unter 2.2.2 beschriebenen Optimierung sich nicht nur auf die Menge an gebildeter Biomasse zu beschränken scheint, sondern auch die Wachstumsgeschwindigkeit erhöht.

2.3 Isolierung, Charakterisierung und Analytik des Aromaprecursors Lentinensäure

2.3.1 Vorbemerkungen

Das unter dem Trivialnamen Lentinensäure bekannte Dipeptid 2-(γ -Glutamylamino)-4,6,8,10,10-Tetrathiaundecansäure wurde erstmals von YASUMOTO [24] aus Shiitake-Fruchtkörpern (*Lentinus edodes*) isoliert und charakterisiert. Darüber hinaus wurde das Dipeptid auch aus anderen Basidiomyceten der Arten *Collybia* und *Micromphale* isoliert [25].

In Untersuchungen zum Abbau dieser Substanz unter enzymaktivierenden Bedingungen konnten die charakteristischen Aromastoffe des Shiitake nachgewiesen werden, so daß die Lentinsäure als Aromaprecursor eingestuft wurde.

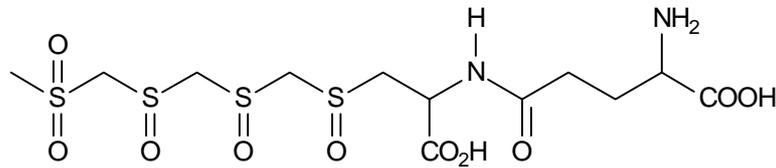


Abb 2-28 Aromaprecursor Lentinsäure ($C_{12}H_{22}O_{10}N_2S_4$)

2.3.2 Isolierung aus Fruchtkörpern

Die Isolierungsmethode von Lentinsäure aus getrockneten Fruchtkörpern lehnt sich im Wesentlichen an die Arbeiten von LUXA und N'-GALAMULUME-TREVES [25, 26] an und basiert auf der zwitterionischen Form des γ -Glutamyl-Peptids.

Durch Ionenaustauschchromatographie an dem stark sauren Kationenaustauscher Amberlite IR 120 (H^+ -Form) wurden zunächst aus den Pilz-Extrakten die gesamten Aminosäuren und Peptide angereichert. Man erreichte damit gleichzeitig eine Vorreinigung, da andere Inhaltsstoffe des Pilzextraktes wie z.B. Kohlenhydrate abgetrennt wurden. Die so gewonnene Mischung aus neutralen, sauren und basischen Aminosäuren bzw. Peptiden wurde durch Ionenaustauschchromatographie an dem schwach basischen Anionenaustauscher Sephadex[®] DEAE A-25 weiter aufgereinigt, wobei sich die neutralen und basischen Aminosäuren im Durchlauf sammelten, während die sauren Aminosäuren und Peptide zurückgehalten wurden.

Durch einen Essigsäure/Wasser-Gradienten wurden letztere in der Reihenfolge L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure, saure Peptide (darunter auch Lentinsäure) eluiert.

Die Isolierungsmethode, die unter 4.7.1 genau beschrieben wird, ist in der folgenden Abb 2-29 schematisch dargestellt.

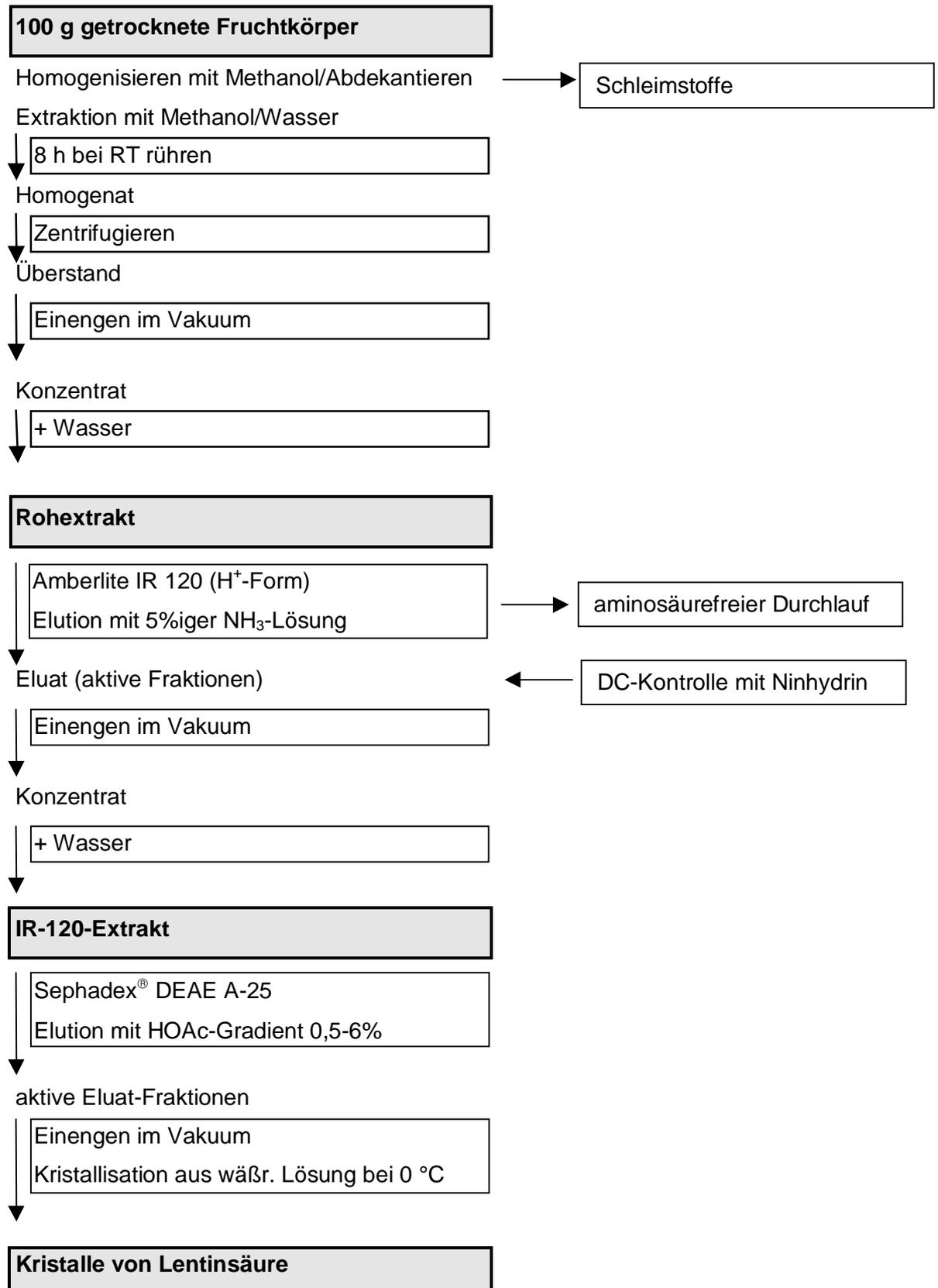


Abb 2-29 Isolierungsschema für die Gewinnung von Lentinsäure aus getrockneten Shiitake-Fruchtkörpern

Analog wurde auch aus frischen Shiitake-Fruchtkörpern Lentinsäure isoliert, wobei die Gewinnung des Rohextraktes leicht modifiziert wurde (siehe 4.7.1.2).

2.3.3 Charakterisierung der Lentinsäure

2.3.3.1 Elementaranalyse

Bei der von YASUMOTO et al. [24] erstmals isolierten Lentinsäure wurde durch Elementaranalyse als Summenformel $C_{12}H_{22}O_{10}N_2S_4$ und als entsprechendes Molekulargewicht $M_W = 482,5 \text{ g mol}^{-1}$ ermittelt.

Tab 2-5 Elementaranalyse der isolierten Lentinsäure

| | C [%] | H [%] | O [%] | N [%] | S [%] |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| berechnet | 29,87 | 4,60 | 33,16 | 5,80 | 26,58 |
| gemessen | 29,74 | 4,89 | n.b. | 5,64 | 24,59 |
| Literatur [24] | 29,40 | 4,62 | 32,53 | 5,83 | 25,88 |

n.b. = nicht bestimmt

Mit den in 2.3.2 isolierten Kristallen wurde eine Elementaranalyse der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel durchgeführt. Ein Vergleich mit den berechneten und den Literaturdaten zeigte eine gute Übereinstimmung. Lediglich der Wert für Schwefel wich um 6,5% von den berechneten Werten ab, was aber im Rahmen der Meßungenauigkeit noch zu tolerieren ist.

2.3.3.2 IR-Spektrum

Von der aus den getrockneten Shiitake-Fruchtkörpern isolierten Verbindung, bei der es sich aufgrund der Elementaranalyse um Lentinsäure handelt, wurde ein IR-Spektrum aufgenommen.

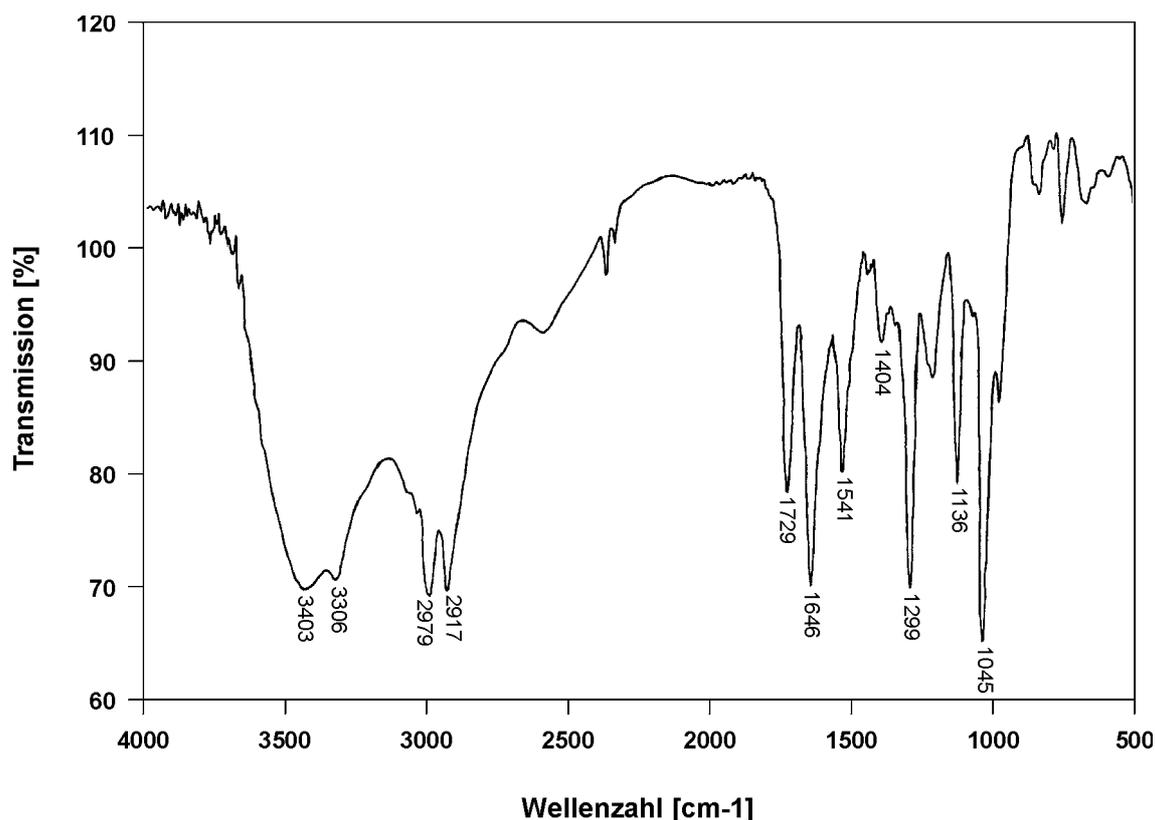
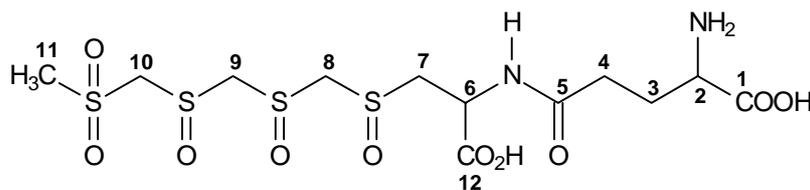


Abb 2-30 IR-Spektrum der isolierten Lentinsäure als KBr-Preßling

Die wesentlichen Strukturelemente der Lentinsäure konnten IR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Das Dipeptid zeigte eine breite Bande im Bereich von 3200 - 3600 cm⁻¹, die typisch ist für -O-H-Valenzschwingungen in intermolekularen Wasserstoffbrücken. Die normalerweise als scharfe Bande ausgeprägten -N-H-Valenzen für primäre Amine bzw. Amide, sind bei 3306 cm⁻¹ zu erkennen. Sie werden von der breiten -O-H-Valenz überlagert. Weitere Banden, die für Amide charakteristisch sind, finden sich bei 1646 cm⁻¹ (-C=O-Valenz, Amidbande I) und bei 1541 cm⁻¹ (-N-H-Deformationsschwingung, Amidbande II). Die starke Absorption bei 1729 cm⁻¹ zeigt die -C=O-Valenz gesättigter Carbonsäuren. Gesättigte C-H-Bindungen absorbieren zwischen 2910 und 2980 cm⁻¹ (-C-H-Valenzschwingung) und bei 1404 cm⁻¹ (-C-H-Deformationsschwingung). Die intensiv ausgeprägte Bande bei 1299 cm⁻¹ könnte aus einer Überlagerung der -C-N-Valenz mit der -SO₂-Valenz resultieren, da beide Schwingungstypen in diesem Bereich liegen und in der Lentinsäure als funktionelle Gruppen auftreten. Charakteristisch für Sulfonylverbindungen ist die Bande bei 1136 cm⁻¹, die ebenfalls einer -SO₂-Valenzschwingung zugeordnet werden kann. Bei 1045 cm⁻¹ ist als deutlich ausgeprägte Absorption die -S=O-Valenz für Sulfoxide zu erkennen, die als Strukturelement in der Lentinsäure zu finden ist. Die ermittelten Daten des IR-Spektrums stimmen sehr gut mit denen des Literaturspektrums [24] überein.

2.3.3.3 NMR-Spektren

¹H-NMR (500 MHz, D₂O)¹³C-NMR (125 MHz, D₂O)Tab 2-6 ¹H-NMR-Daten von Lentinsäure

| H-Atom an C-Atom-Nr. | Chemische Verschiebung δ [ppm] | Multiplizität | Kopplungs- konstanten | Integral |
|-------------------------|--------------------------------------|---------------|---|----------------------|
| 2 | 3,93 | t | ³ J _{HH} = 6,4 Hz | 1-H, CH |
| 3 | 2,18 | m | — | 2-H, CH ₂ |
| 4 | 2,54 | m | — | 2-H, CH ₂ |
| 6 | 4,80 | dd | n.b. | 1-H, CH |
| 7 | 3,45 | dd | ² J _{HH} = 10,7 Hz; ³ J _{HH} = 13,6 Hz | 1-H, CH _H |
| 7' | 3,88 | dd | ² J _{HH} = 3,7 Hz; ³ J _{HH} = 9,9 Hz | 1-H, CH _H |
| 8 | 4,67 | d | ² J _{HH} = 130 Hz | 1-H, CH _H |
| 8' | 4,87 | d | ² J _{HH} = 130 Hz | 1-H, CH _H |
| 9 | 4,93 | m | — | |
| 10 | n.b. | | | |
| 11 | 3,14 | s | — | 3-H, CH ₃ |

n. b. = nicht bestimmt

Tab 2-7 ^{13}C -NMR-Daten von Lentinsäure

| C-Atom Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| δ [ppm] | 172,8 | 53,3 | 26,0 | 31,4 | 174,8 | 48,4 |
| C-Atom Nr. | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| δ [ppm] | 53,7 | 66,6 | 71,5 | 74,1 | 43,4 | 173,3 |

Die eindeutige NMR-spektroskopische Charakterisierung der Lentinsäure gestaltet sich aufgrund strukturell ähnlicher Untereinheiten relativ schwierig. Durch moderne ein- und zweidimensionale Korrelationstechniken wie DEPT, ^1H - ^1H -COSY und ^1H - ^{13}C -COSY konnten die Protonen und Kohlenstoffatome der Glutamyluntereinheit eindeutig zugeordnet und mit Literaturdaten [24, 27, 28] verglichen werden.

Das Methinproton der Cysteinyl-Untereinheit an C-6 wird partiell vom Restprotonensignal des D_2O Lösungsmittels verdeckt; das erwartete Aufspaltungsmuster zum Dublett von Dubletts durch die diastereotopen Protonen an C-7 wurde nicht beobachtet. Durch CH- und HH-Korrelation konnte dem Proton eine chemische Verschiebung von 4,80 ppm zugeordnet werden.

Lentinsäure besitzt in der Dipeptiduntereinheit zwei chirale Zentren (C-2 und C-6), wodurch die Protonen aller Methylengruppierungen diastereotop aufgespalten werden. Dies führt z.T. zu komplizierten Fein und Hyperfeinstrukturen, die trotz der hohen Meßfrequenz des 500 MHz NMR-Spektrometers nicht ausreichend aufgelöst wurden, um Kopplungskonstanten bestimmen zu können.

Die Protonen H-7 und H-7' an C-7 besitzen mit 3,45 resp. 3,88 ppm ungewöhnlich unterschiedliche chemische Verschiebungen, was auf eine erhebliche Enantioseitendifferenzierung schließen läßt.

Die NH-sowie Carboxyl-Protonen werden durch H-D-Austausch mit bzw. Wasserstoffbrückenbindung zum Lösungsmittel D_2O nicht detektiert.

Da die Sulfonyl- bzw. Sulfoxid- ständigen Methylengruppen durch den Schwefel isoliert vorliegen, konnte keine Long Range CH-Korrelation durchgeführt werden, um die eindeutige Zuordnung der Protonen bzw. Kohlenstoffatome zum Lentinsäuregerüst zu treffen.

Es können lediglich Protonen- zu Kohlenstoffsignalen durch ^1H - ^{13}C -GHSQC-Korrelation (inverse Heterokorrelation mit Gradiententechnik) zugeordnet werden. Beim Lösen der Lentinsäure in D_2O werden sechs der in diesem Fragment enthaltenen Protonen gegen Deuterium ausgetauscht [25].

Die erwarteten Aufspaltungsmuster der drei AB Spinsysteme ($\text{SO}_2\text{-CH}_2\text{SOCH}_2\text{SOCH}_2\text{SO}$) konnte durch den Isotopenaustausch mit dem Lösungsmittel nicht beobachtet werden, so daß in Übereinstimmung mit Literaturdaten [24, 27, 28, 29] die Signale dieser Methylen-gruppierungen als Gruppen von Singulettts zwischen $\delta = 4,5$ und $\delta = 5,1$ ppm charakterisiert wurden.

Es konnten bei $\delta = 4,88; 4,91; 4,96; 4,99$ ppm Protonensignale demselben Kohlenstoff zugeordnet werden.

Die Protonen von zwei Methylen-gruppierungen werden durch das Restwasserstoffsignal des Lösungsmittels D_2O verdeckt, konnten jedoch in der $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ -GHSQC-Korrelation bei $\delta = 4,78$ ppm detektiert und Kohlenstoffsignalen bei $\delta = 71,5$ und $74,4$ ppm zugeordnet werden.

Die exakte Zuordnung aller Methylenprotonensignale könnte durch Messungen in verschiedenen deuterierten Lösungsmitteln bei unterschiedlichen pH-Werten [28] erreicht werden, ist jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

2.3.3.4 Massenspektrum

Die massenspektrometrische Analyse der Lentinsäure erfolgte mittels Elektrospray-Ionisation (ESI), da sich aufgrund des stark polaren Charakters des Dipeptids und des relativ hohen Molekulargewichtes andere Ionisierungsverfahren als ungeeignet erwiesen. Sie führen durch eine intensive Fragmentierung zum Verlust struktureller Informationen.

Dagegen wird die Ionisierung bei der ESI durch Desolvatisierung gelöster Ionen erreicht, wobei nur wenig zusätzliche innere Energie auf die Ionen übertragen wird. Die Ionen werden bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert. Dabei erfolgt ein kontinuierlicher Lösungsmittelverlust durch Verdampfen und damit eine Zunahme der Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche bis es schließlich zu einer Desolvatisierung des Analytmoleküls beim Transfer in das Massenspektrometer kommt [30]. Es kommt im positiven Scan-Modus zu einem Ionensignal, das sich bezüglich der Masse um eine Ladung und durch Addition eines Protons unterscheidet. Das Molekulargewicht der Lentinsäure beträgt $M_w = 482 \text{ g mol}^{-1}$, so daß im Massenspektrum als Molekülion $m/z = 483 \text{ [M+H]}^+$ zu finden war. Dies bestätigt, daß es sich bei der isolierten Verbindung tatsächlich um Lentinsäure handelt. Die Peaks bei m/z 484 und 485 sind auf die Isotopenverteilung zurückzuführen. Aufgrund der natürlichen Häufigkeitsverteilung von ^{13}C bzw. ^{34}S ergaben sich rechnerisch für m/z 484 eine relative Intensität von ca. 17% und für m/z 485 ca. 19%. Diese Werte stimmen mit den gemessenen Werten gut überein, wobei m/z 485 aufgrund der Isotopenhäufigkeit von ^{34}S (4,4%) [31] auch Aufschluß über die Anwesenheit von vier Schwefelatomen im Molekül gibt.

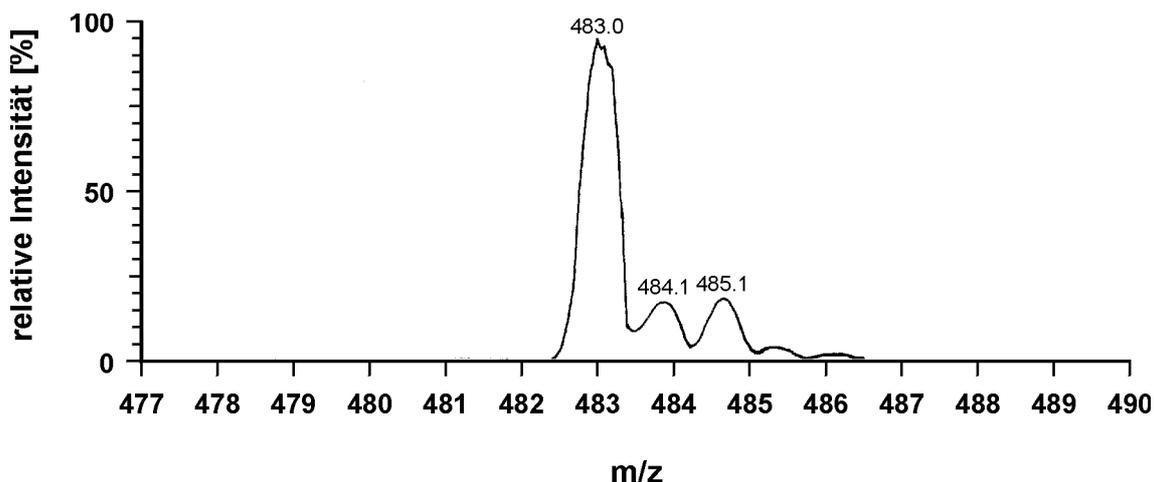


Abb 2-31 Vergrößerter Ausschnitt des ESI-MS-Spektrums von Lentinsäure

2.3.4 Analytik der Lentinsäure

2.3.4.1 Vorbemerkung

Die Isolierungsmethode der Lentinsäure aus Shiitake-Fruchtkörpern gestaltete sich aufgrund der fehlenden Vergleichsmöglichkeit mit einer Standardsubstanz aufwendig, da eine Abtrennung der Aminosäuren und Peptide von anderen Zellinhaltsstoffen sowie eine Aufreinigung der Lentinsäure von den übrigen Aminosäuren und Peptiden erforderlich war. Zur gravimetrischen Quantifizierung waren darüber hinaus größere Mengen an Ausgangsmaterial nötig, die bei einer Untersuchung von Submerskulturen auf den Lentinsäuregehalt nicht zur Verfügung standen.

Daher sollte die Analysenmethode sowohl Lentinsäure als auch andere Aminosäuren parallel erfassen und eine Quantifizierung möglich machen. Aminosäuren bzw. Peptide enthalten nur in wenigen Fällen UV-absorbierende Chromophore und sind daher im nativen Zustand meist nur mit geringer Empfindlichkeit detektierbar, die durch Derivatisierung mit einem fluoreszierenden Reagens deutlich gesteigert werden kann [32]. Eines der gängigsten Reagenzien zur Vorsäulenderivatisierung ist 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-chlorid (FMOC-Cl). Die polaren nativen Aminosäuren werden so in hydrophobe Derivate umgewandelt, die an einer Reversed-Phase-Säule hochleistungsflüssigkeitschromatographisch getrennt werden können [34].

2.3.4.2 Aufarbeitung der Submerskulturen zur Lentinsäure-Bestimmung

Bei der Aufarbeitung der Shiitake-Fruchtkörper reichte zum Zellaufschluß und damit zur Freisetzung der im Cytosol enthaltenen Aminosäuren bzw. der Lentinsäure die Homogenisation mit dem Waring Blendor.

Für einen Zellaufschluß der submers geführten Kulturen von *Lentinus edodes* ist diese Methode nicht mehr ausreichend, da die Zellwandstruktur sehr robust und die Pilzmycelstruktur aufgrund der Pelletbildung sehr kompakt ist. Nach TAUBERT [36] gelingt der effizienteste Aufschluß der Zellen von Basidiomyceten mit mechanischen Verfahren, wobei sich eine Naßvermahlung mit Hilfe einer Schwingmühle und Glasperlen als Mahlhilfsmittel als besonders geeignet erwies.

Die Pellets aus den Submerskulturen von *Lentinus edodes* wurden mit einer nach dem gleichen Prinzip arbeitenden Rührwerkskugelmühle aufgeschlossen, die sich durch größeres Füllvolumen und bessere Kühlkapazität von der oben genannten Schwingmühle unterschied. Als Aufschlußlösung wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch (70:30 v/v) verwendet, um eine Enzyminaktivierung zu erreichen und somit einen Abbau der Lentinsäure zu verhindern. Die Isolierungsmethode, die unter 4.7.3 genau beschrieben wird, ist in der folgenden Abb 2-32 schematisch dargestellt.

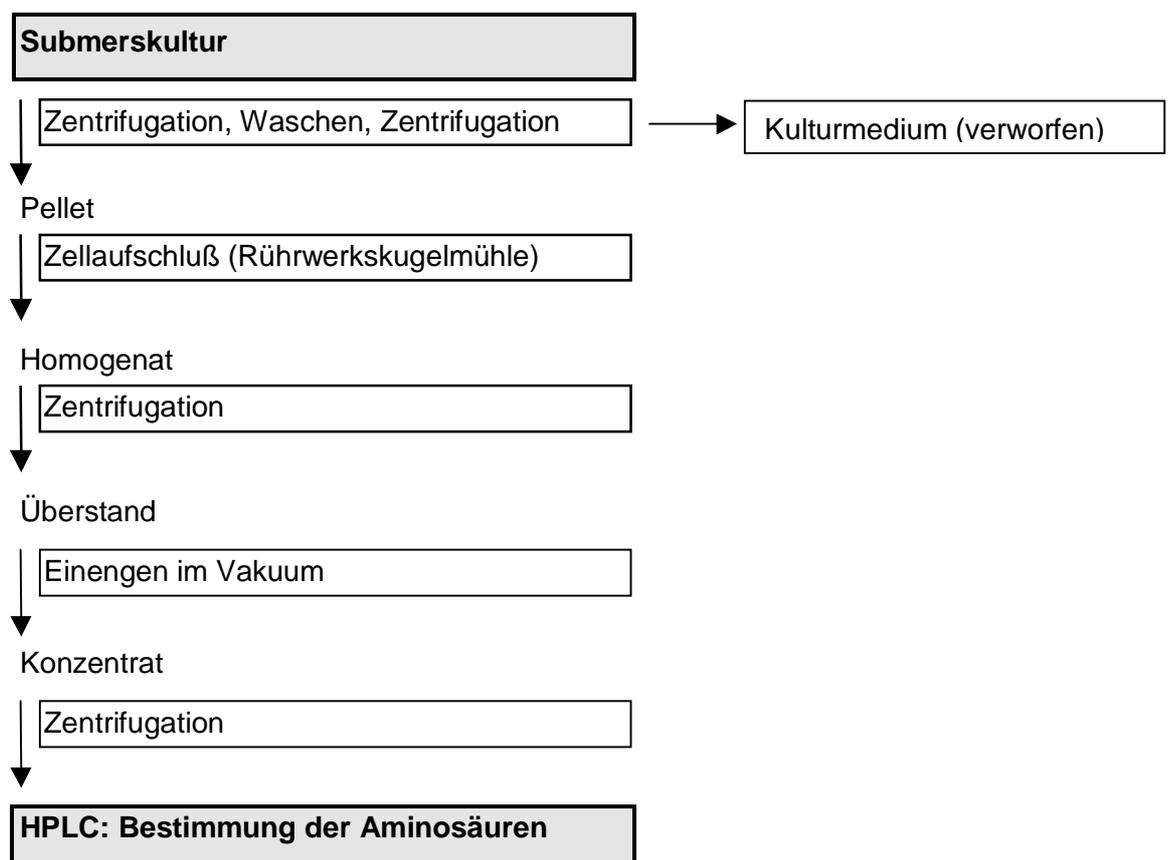


Abb 2-32 Aufarbeitungsschema der Submerskulturen zur Bestimmung von Lentinsäure

2.3.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

FMOC-Cl, ein Ester der Chlorameisensäure, reagiert schnell und quantitativ sowohl mit primären als auch sekundären Aminen zu stabilen Urethanverbindungen. Ein Nachteil der Derivatisierung mit FMOC-Cl besteht in seiner Eigenfluoreszenz und damit im Auftreten eines relativ großen Reagenzienpeaks im Elutionsbereich der Aminosäurederivate. Eine Reduzierung der Intensität des Reagenzienpeaks kann durch eine erneute Derivatisierung mit einem sehr unpolaren Amin wie z.B. Adamantanamin (ADAM) erzielt werden [37]. Die Reaktion ist in Abb 2-33 dargestellt.

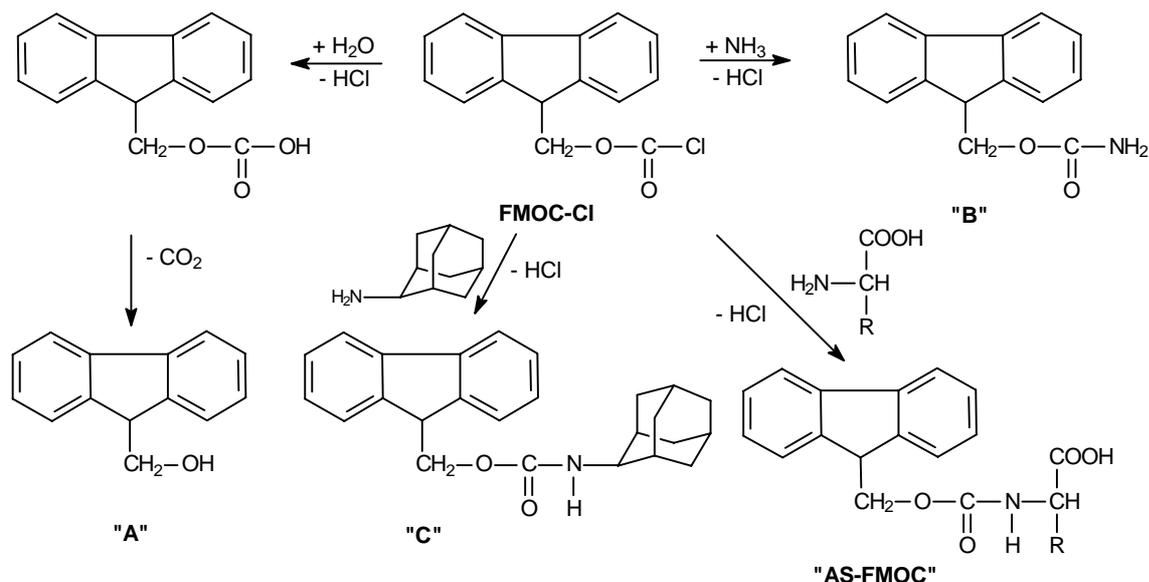


Abb 2-33 Übersicht der Reaktionswege von FMOC-Cl bei der Derivatisierung von Aminosäuren (AS) [39]

Mit der beschriebenen Methode war es möglich, mit Ausnahme von Tryptophan die proteinogenen Aminosäuren sowie Lentinsäure parallel zu erfassen (siehe Abb 2-34). Während das Hydrolyseprodukt „A“ und das Reaktionsprodukt „B“ aus FMOC und Ammoniak im Elutionsbereich der Aminosäuren liegen, erscheint das Oxycarbonyl-ADAM-Derivat „C“ als letzter Peak im Chromatogramm und stört somit nicht mehr die Detektion der Aminosäuren.

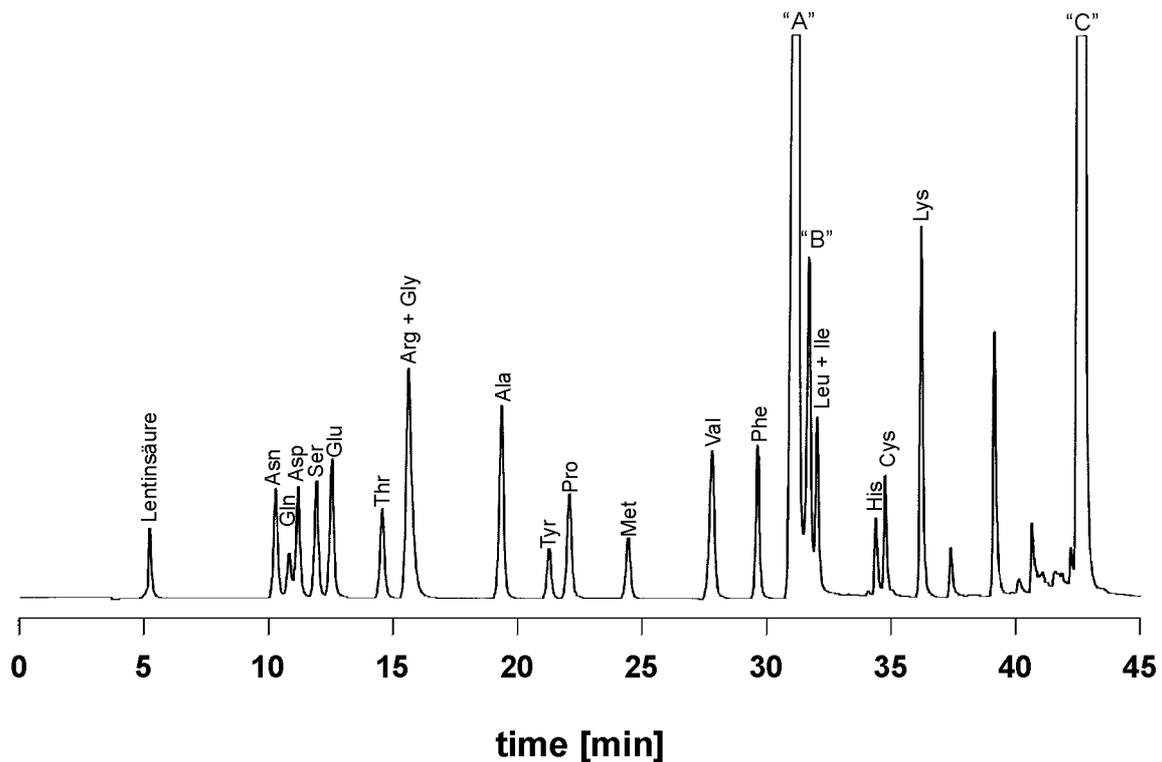


Abb 2-34 Standardchromatogramm der Aminosäuren und Lentinsäure als Fmoc-Derivate

Zur quantitativen Bestimmung der Lentinsäure wurde mit externen Standards kalibriert, wobei sich im Bereich von $20\text{-}200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ein linearer Bereich ergab. Die Auswertung der Daten erfolgte durch Auftragung der Konzentrationen der Standardlösungen gegen die Fläche der Peaks im Chromatogramm.

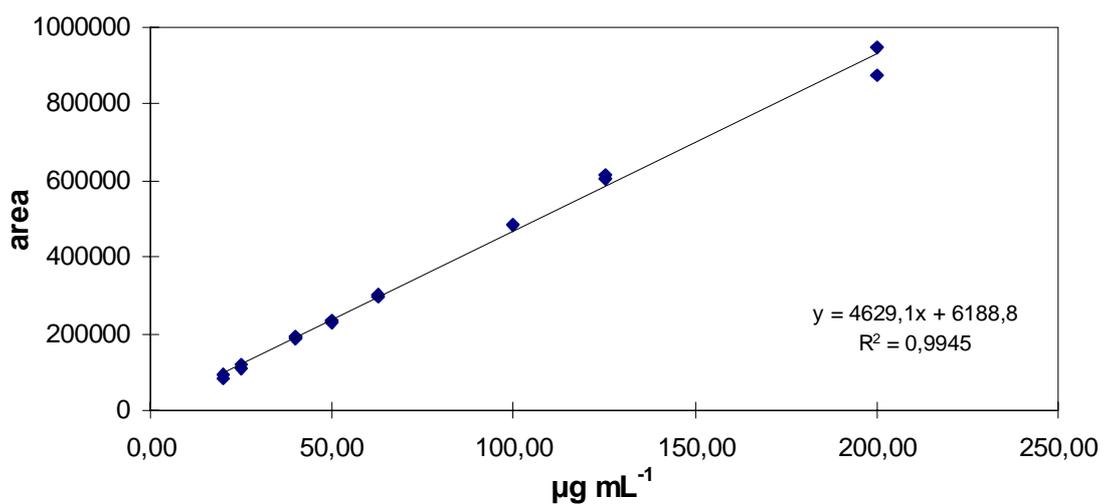


Abb 2-35 Kalibriergerade Lentinsäure als Fmoc-Derivat

2.4 Zusatz von Precursoren zur Steigerung des Lentinsäuregehaltes

2.4.1 Vorbemerkung

Die Produktion von Sekundärmetaboliten kann durch den Zusatz metabolischer Vor- bzw. Zwischenstufen gesteigert werden, die entweder selbst Substanzen des Sekundärstoffwechsels sind oder aus dem Primärstoffwechsel stammen. Precursoren für die Synthese von γ -Glutamyl-Peptiden, wie sie in der Lentinsäure vorliegen, könnten sowohl aus dem Glutamat- als auch dem Cysteinestoffwechsel hervorgehen. Neben den in den Versuchen zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen verwendeten Stämme Weserchamp und A 20-5 wurden in den nachfolgenden Experimenten alternative Stämme in die Untersuchungen einbezogen. Laut Angaben der Kultursammlungen stammen einige aus dem asiatischen Raum und werden z.T. zur Fruchtkörpererzeugung eingesetzt [40].

Tab 2-8 Übersicht über die untersuchten Stämme von *Lentinus edodes*

| Stammbezeichnung | Herkunft | industrielle Anwendung |
|-------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Weserchamp | Deutschland | Fruchtkörperproduktion |
| A 20-5 | k. A.* | k. A.* |
| A 20-8 | k. A.* | k. A.* |
| 225.51 | Japan | k. A.* |
| 389.89 | k. A.* | Fruchtkörperproduktion |
| 530.90 | Japan | Fruchtkörperproduktion |
| 808.91 | China | Fruchtkörperproduktion |

*k. A. = keine Angaben verfügbar

Bei den nachfolgenden Experimenten wurden endogene Metabolite der submers kultivierten Stämme von *Lentinus edodes* bestimmt.

Die Kultivierungen wurden in 500 mL Erlenmeyerkolben mit 250 mL LEATHAM-Nährmedium durchgeführt, da im Nährmedienscreening hiermit das beste Wachstum und damit die höchsten Trockenmassegehalte erzielt wurden.

Da zur Aufarbeitung das frische Pilzmycel verwendet wurde, wurden die Ergebnisse auf das Frischgewicht bezogen und auf eine Bestimmung der Trockenmasse in diesem Fall verzichtet.

Um während des gesamten Kulturverlaufs einen Überblick über die Gehalte der endogenen Metabolite zu erhalten, wurde - in Anlehnung an die bei den Optimierungsversuchen erhaltenen Ergebnissen zum Kulturverlauf - jeweils am 9., 15. und 21. Kulturtag aufgearbeitet.

2.4.2 Aminosäuregehalte in Submerskulturen von *Lentinus edodes*

Die qualitative und quantitative Bestimmung der neben der Lentinsäure enthaltenen Aminosäuren sollte am 9. Kulturtag durch Aufarbeitung der Submerskulturen nach der in 4.7.3 beschriebenen Methode erfolgen.

Abb 2-36 zeigt Chromatogramme derjenigen Stämme, bei denen sich die größten qualitativen und quantitativen Unterschiede in der Zusammensetzung der Aminosäuren zeigten. Allen Stämmen war gemeinsam, daß Glutamin, Glutaminsäure und Alanin in den höchsten Konzentrationen vorlagen, während Methionin nur bei 808.91 nachzuweisen war.

Neben den Standardaminosäuren zeigten alle Chromatogramme bei 8 und 28 min (v.a. bei 808.91 als deutlicher Peak zu erkennen) nicht identifizierte Peaks, die aber aufgrund der spezifischen Derivatisierungsmethode unbekanntes Aminosäuren bzw. Peptiden zugeordnet werden können.

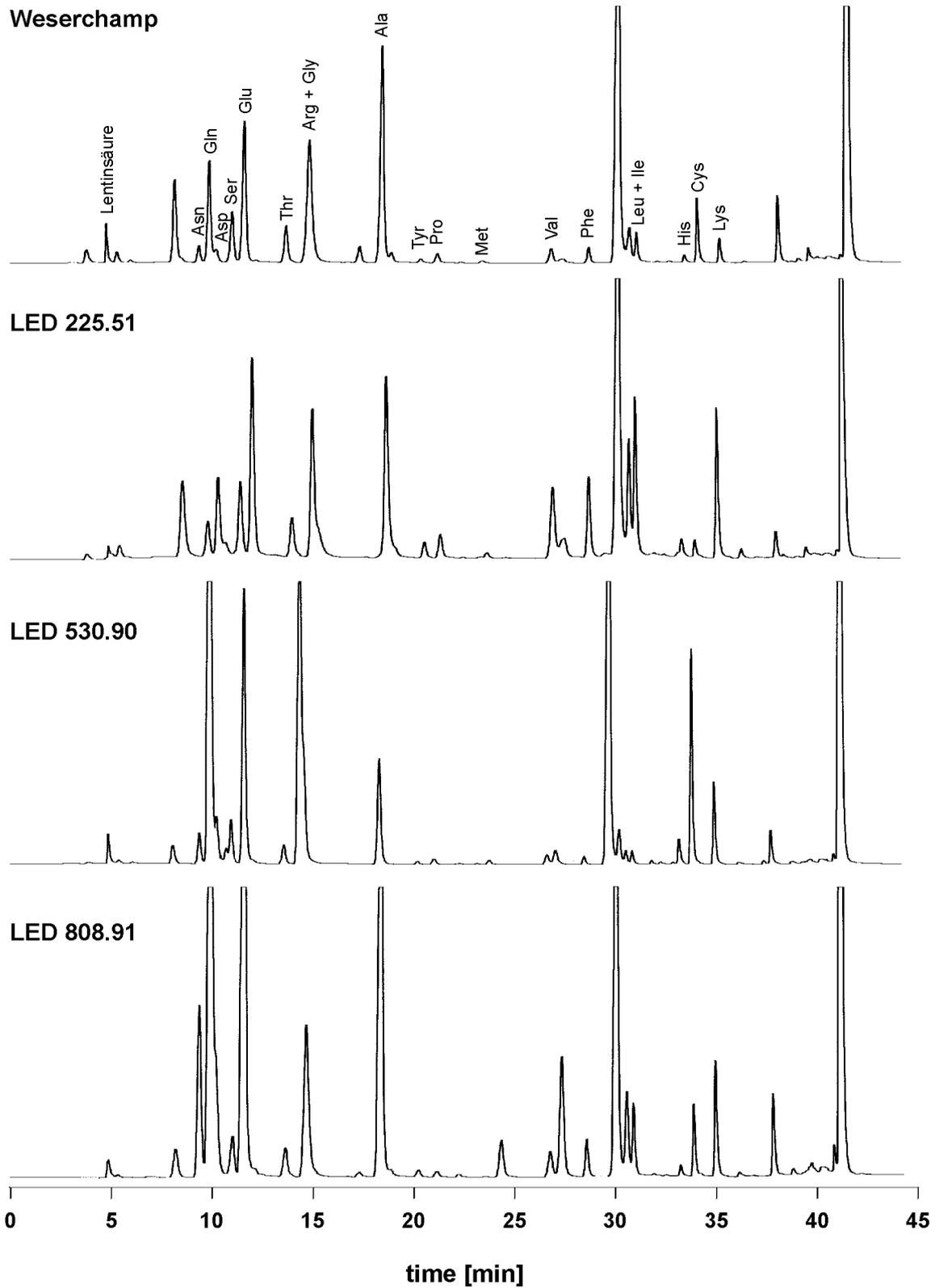


Abb 2-36 AS-Chromatogramme verschiedener Stämme von *Lentinus edodes* in Submerskultur

2.4.3 Lentinsäuregehalte aus Submerskulturen ohne Zusatz von Precursoren

Es wurde zunächst der Lentinsäuregehalt der Submerskulturen von *Lentinus edodes* ohne Zusatz metabolischer Vorstufen an drei unterschiedlichen Kulturtagen bestimmt (Doppelbestimmungen), um quantitative Unterschiede im Lentinsäuregehalt zu erfassen. Am 9. Kulturtag befand sich der Pilz im Übergang von der lag- in den exponentiellen Verlauf der Wachstumsphase, die am 21. Kulturtag in die stationäre Wachstumsphase überging.

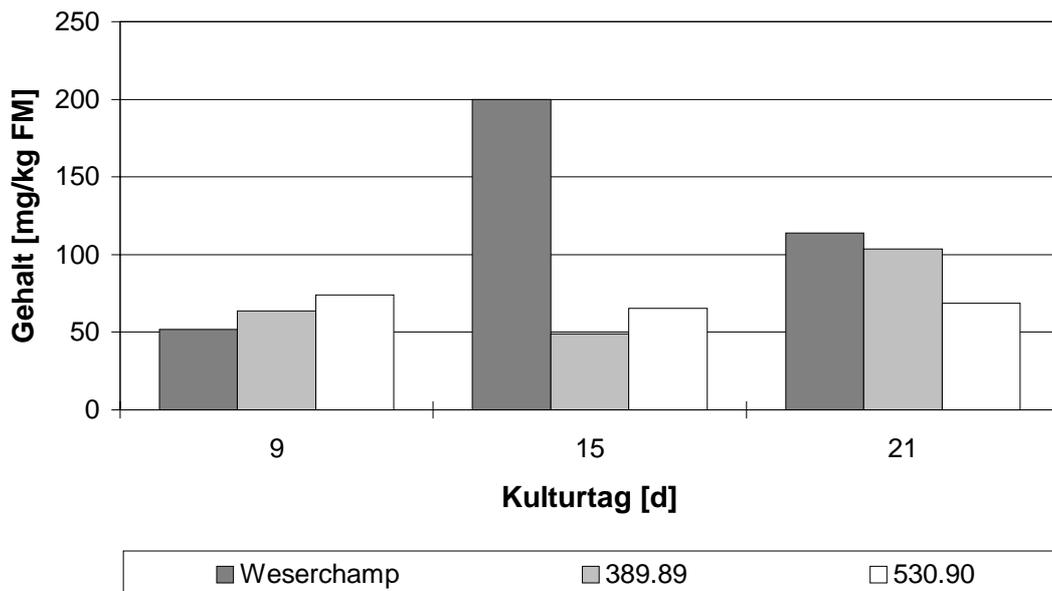


Abb 2-37 Lentinsäuregehalte von Submerskulturen der Stämme Weserchamp, 389.89 und 530.90 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Für *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp wurden an den drei ausgewählten Kulturtagen deutlich unterschiedliche Lentinsäuregehalte ermittelt, wobei am 15. die höchsten Gehalte mit 200 mg kg^{-1} erzielt wurden, während an den beiden anderen Kulturtagen deutlich weniger Lentinsäure nachgewiesen werden konnte. Dabei waren die Gehalte zu Beginn der Kultivierung am geringsten, stiegen dann deutlich an und gingen am Ende der Kultivierung wieder auf ca. 120 mg kg^{-1} Feuchtmasse zurück.

Die beiden untersuchten Stämme 389.89 und 530.90 zeigten im Vergleich zu Weserchamp sowohl in den absoluten Gehalten deutlich niedrigere Mengen an Lentinsäure als auch im gesamten Verlauf weniger ausgeprägte Schwankungen.

Bei Stamm 389.89 stieg der Lentinsäuregehalt erst zum 21. Kulturtag deutlich an und erreichte dort einen Wert von knapp über 100 mg kg^{-1} , während an den beiden anderen Kulturtagen der Gehalt nahezu stagnierte.

Stamm 530.90 zeigte über den gesamten Kulturverlauf konstante Lentinsäuregehalte, die im Bereich von 70 mg kg^{-1} lagen.

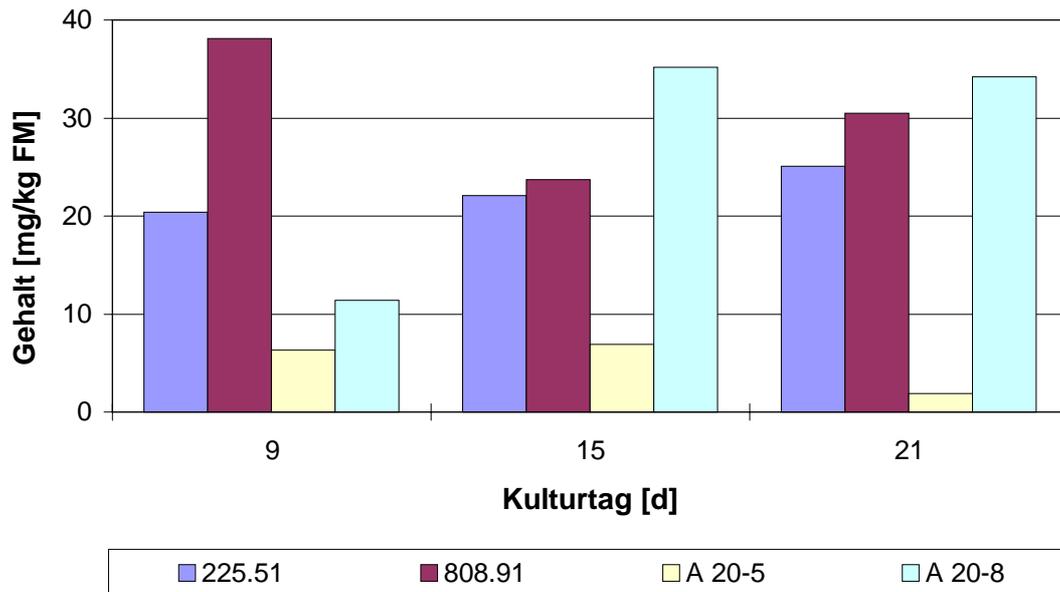


Abb 2-38 Lentinsäuregehalte von Submerskulturen der Stämme 225.51, 808.91, A 20-5 und A 20-8 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Stämmen lagen die absoluten Lentinsäuregehalte der untersuchten Stämme 225.51, 808.91, A 20-5 und A 20-8 auf deutlich niedrigerem Niveau.

So wurden die höchsten Gehalte bei Stamm 808.91 am 9. Kulturtag mit lediglich 38 mg kg^{-1} gemessen.

Bei Stamm A 20-5 lagen die gemessenen Werte unter 10 mg kg^{-1} und nahmen bis zum 21. Kulturtag noch weiter ab.

Einen zum Stamm Weserchamp vergleichbaren Verlauf der Lentinsäuregehaltentwicklung zeigte A 20-8, der zu Beginn der Kultivierung mit 12 mg kg^{-1} sehr niedrige Werte aufwies, die zum 15. Kulturtag deutlich zunahm (35 mg kg^{-1}) um dann wieder leicht abzufallen, wobei die absoluten Werte um eine Größenordnung unterhalb der Gehalte bei Weserchamp lagen.

2.4.4 Zusatz von L-Cystein

2.4.4.1 Bestimmung der Lentinsäuregehalte

Lentinsäure ist ein Derivat eines γ -Glutamyl-Peptids mit Cysteinsulfoxid als weiterer Aminosäureeinheit, an deren Ende über eine Sulfoxid-Brücke ein Rest aus methylenverbrückten Sulfoxideinheiten mit einer terminalen Methylsulfonyleinheit gebunden ist.

Aufgrund des hohen Schwefel-Anteils im Molekül und der Anwesenheit eines Cysteinyl-Restes, wurde die Aminosäure L-Cystein als möglicher Precursor für die Synthese von Lentinsäure ausgewählt, da sie der Zielverbindung Lentinsäure strukturell nahe steht.

L-Cystein wurde dabei in einer Menge von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Kulturmedium den submers kultivierten Stämmen von *Lentinus edodes* (siehe Tab 2-8) am 3. Kulturtag zugesetzt. Ein Zusatz zu Beginn der Kultivierung wurde vermieden, damit sich das Pilzmycel nach Inoculation zunächst an das Kulturmedium (LEATHAM-Medium) adaptieren konnte. Um eine Zugabe des L-Cysteins unter sterilen Bedingungen zu erzielen und um zu verhindern, daß es beim Autoklavieren in wäßriger Lösung zu einem thermischen Abbau kommt, wurde es als Feststoff autoklaviert. Der Feststoff wurde mittels Aminosäureanalytik (siehe 2.3.4.3) untersucht, wobei keine Veränderungen in Form zusätzlicher Peaks im Chromatogramm festgestellt werden konnten. Von einer Sterilisation des L-Cystein durch Lösen in Ethanol wurde Abstand genommen, da unklar war, wie sich die zugesetzten Mengen an Alkohol auf das Wachstumsverhalten auswirken.

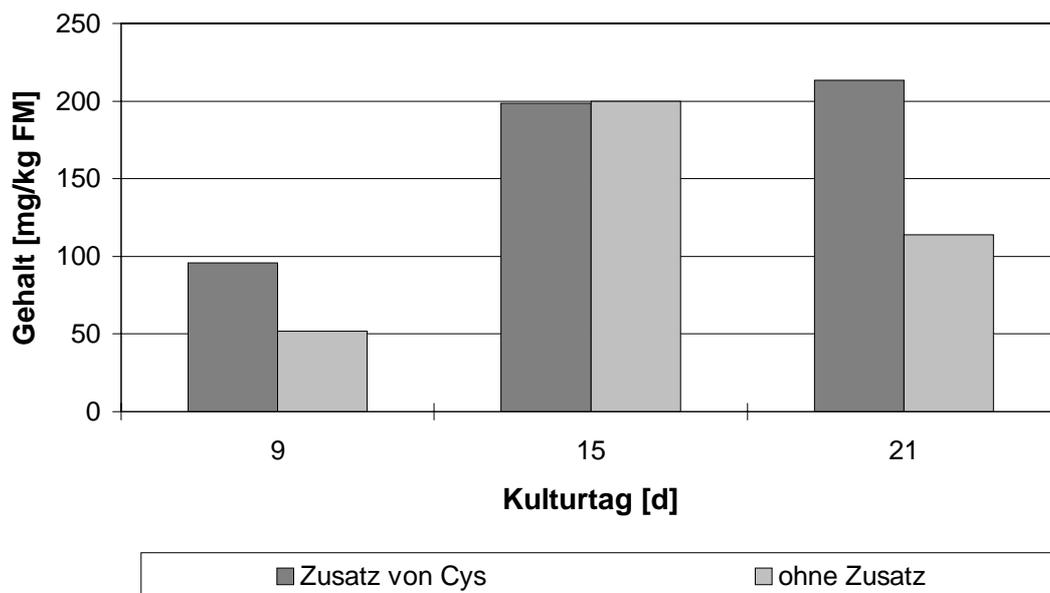


Abb 2-39 Lentinsäuregehalte von Weserchamp in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Die Lentinsäuregehalte bei Weserchamp nach Zusatz von L-Cystein zeigten ähnliche Werte wie bei den Submerskulturen ohne Zusatz. Die höchsten Gehalte wurden hier am 21. Kulturtag mit etwa 215 mg kg^{-1} Feuchtmasse erreicht. Da die Werte schon zu Beginn der Kultivierung deutlich höher lagen als bei den ungefütterten Kulturen und zum Ende des Kultivierungszyklus noch anstiegen anstatt wie bei Weserchamp abzunehmen, kann man einen positiven Effekt auf die Bildung der Lentinsäure feststellen.

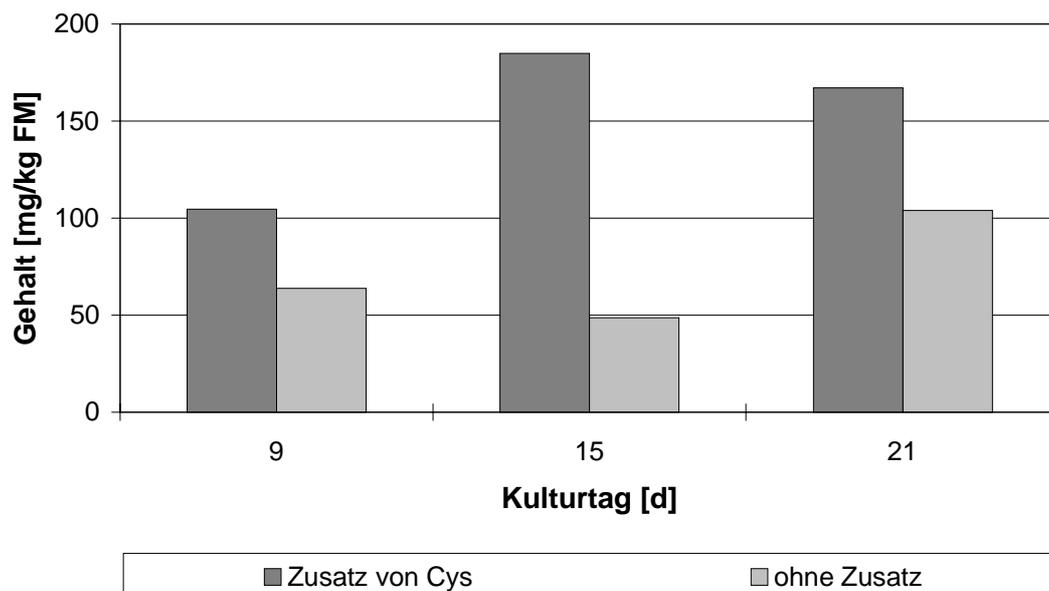


Abb 2-40 Lentinsäuregehalte von 389.89 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Der Zusatz von L-Cystein zeigte bei 389.89 (siehe Abb 2-40) einen deutlich positiven Einfluß auf die vermehrte Bildung von Lentinsäure. Ohne einen Precursorzusatz wurden maximal etwa 100 mg kg^{-1} Feuchtmasse an Lentinsäure gebildet, während durch einen Zusatz von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ L-Cystein der Lentinsäuregehalt mit annähernd 200 mg kg^{-1} am 15. Kulturtag verdoppelt werden konnte. Wie schon bei Weserchamp beobachtet wurde, blieben die erzielten Gehalte auch am 21. Kulturtag nahezu stabil.

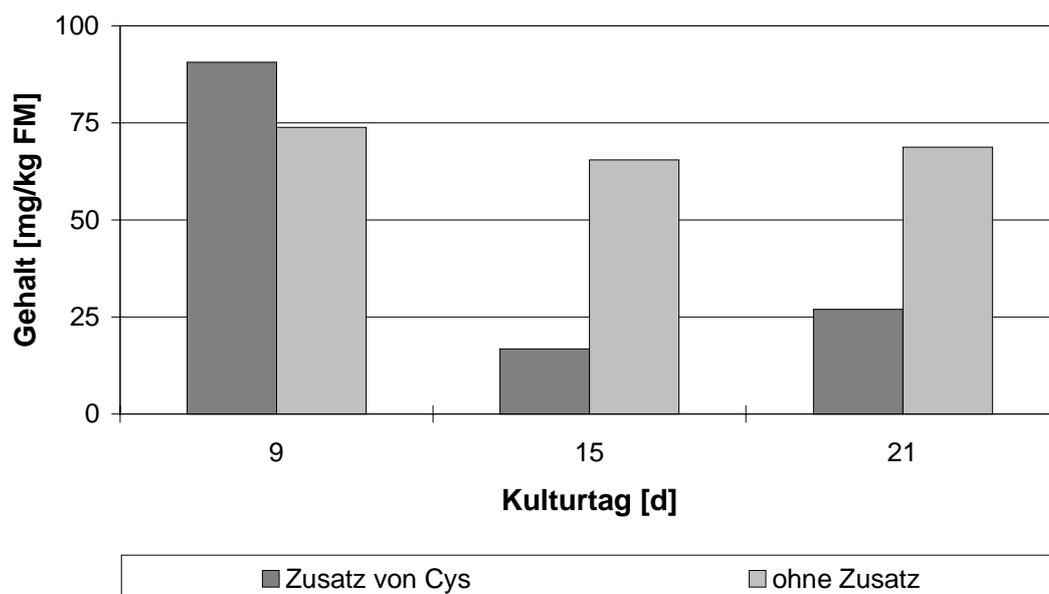


Abb 2-41 Lentinsäuregehalte von 530.90 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Im Gegensatz zu den beiden vorher beschriebenen Stämmen Weserchamp und 389.89 hat die Precursorgabe bei 530.90 einen deutlich negativen Effekt auf die Lentinsäurebildung, während sich beim Wachstum kein negativer Effekt bemerkbar machte. Obwohl am Anfang der Kultivierung noch Werte von 90 mg kg^{-1} (9. Kulturtag) gemessen wurden, fiel der Lentinsäuregehalt stark ab und erreichte am 15. Kulturtag nur noch ca. 15 mg kg^{-1} um bis zum 21. Kulturtag wieder leicht auf 27 mg kg^{-1} anzusteigen. Der Vergleich mit der Kultivierung ohne Zusatz von L-Cystein bestätigte den beobachteten negativen Effekt, da hier die Lentinsäuregehalte (etwa 70 mg kg^{-1}) über den gesamten Kulturverlauf nahezu konstant blieben.

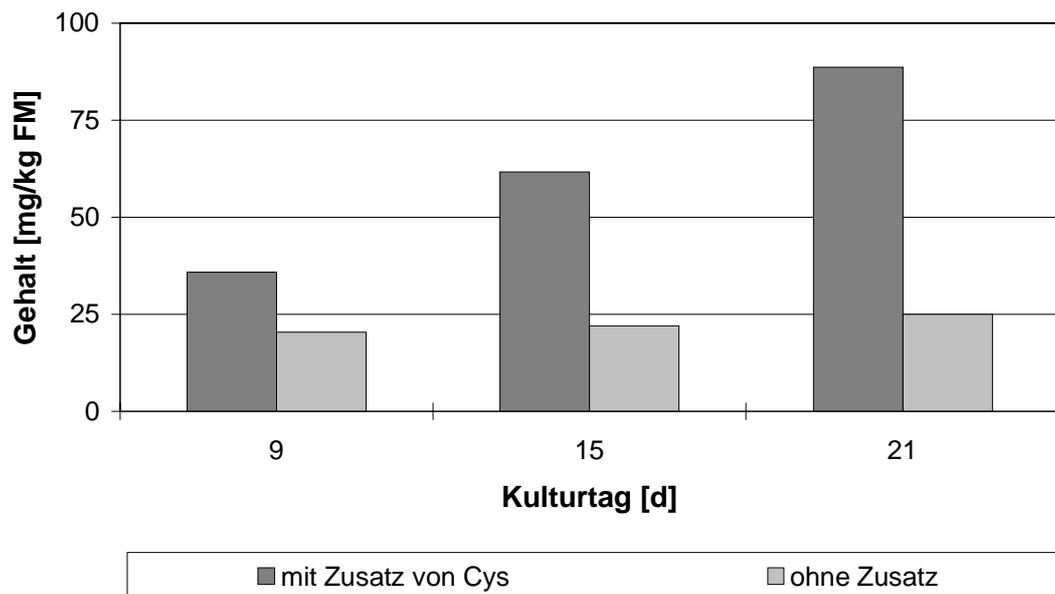


Abb 2-42 Lentinsäuregehalte von 225.51 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

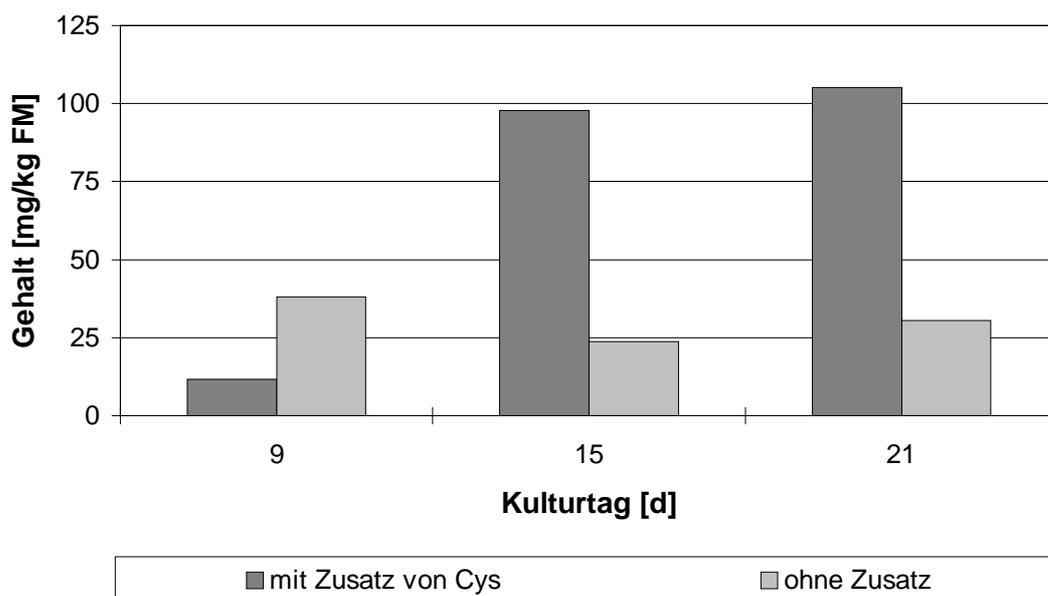


Abb 2-43 Lentinsäuregehalte von 808.91 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Bei den untersuchten Stämmen 225.51 und 808.91 (siehe Abb 2-42 und Abb 2-43) lagen die Lentinsäuregehalte nach Zusatz von L-Cystein deutlich über den ungefütterten Kulturen. Die Werte stiegen vom 9. bis zum 21. Kulturtag stark an und erreichten ihre Höchstwerte am 21. Kulturtag mit 90 mg kg^{-1} bei 225.51 und 105 mg kg^{-1} bei 808.91. Damit zeigte sich auch hier ein ausgeprägt positiver Effekt durch die Precursorgabe.

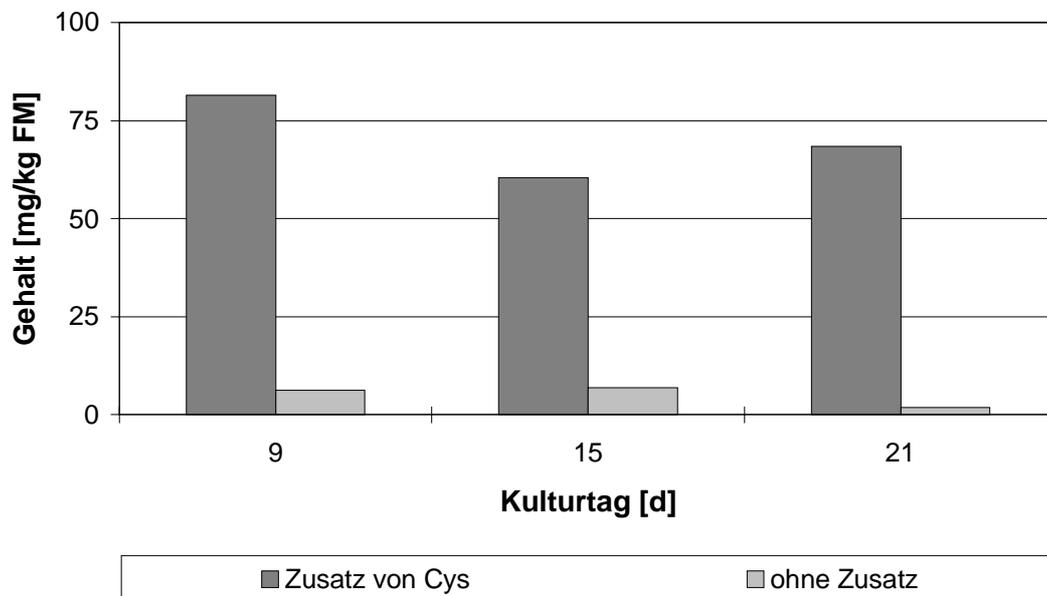


Abb 2-44 Lentinsäuregehalte von A 20-5 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Während in den Submerskulturen von A 20-5 (siehe Abb 2-44) ohne einen Precursorzusatz sehr geringe Mengen an Lentinsäure nachgewiesen wurden, konnten nach dem Zusatz von L-Cystein wesentlich höhere Gehalte ermittelt werden, die über den gesamten Kulturverlauf relativ konstant blieben und Werte zwischen 80 und 60 mg kg^{-1} Feuchtmasse erreichten. Auch hier konnte ein positiver Einfluß von L-Cystein auf die Bildung von Lentinsäure beobachtet werden.

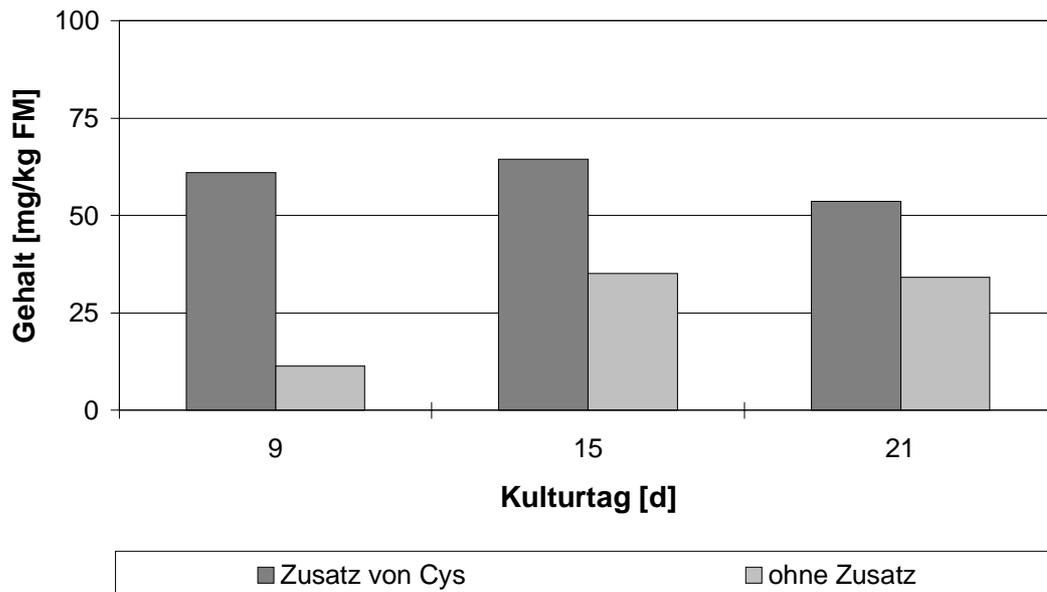


Abb 2-45 Lentinsäuregehalte von A 20-8 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Bei A 20-8 (siehe Abb 2-45) zeigten sich nach dem Precursorzusatz von L-Cystein - wie schon bei A 20-5 beobachtet - ebenfalls höhere Lentinsäuregehalte, die an den drei untersuchten Kulturtagen zwischen 50 und 60 mg kg^{-1} Feuchtmasse lagen. Der positive Effekt auf die Synthese von Lentinsäure war allerdings weniger stark ausgeprägt, da die ungefütterten Kulturen ab dem 15. Kulturtag mit etwa 35 mg kg^{-1} die Hälfte des Ergebnisses des Zufütterungsversuchs erreichten und damit die Steigerungsrate geringer ausfiel als bei A 20-5.

Der Zusatz von L-Cystein als Precursor zum Aufbau von Lentinsäure in Submerskulturen zeigte bei fast allen untersuchten Stämmen einen deutlich positiven Effekt. Dabei wurde ein relativ schwacher Effekt bei Weserchamp und A 20-8 beobachtet, wobei die absoluten Gehalte der untersuchten Kulturen bei Weserchamp am höchsten lagen. 530.90 zeigte als einziger Stamm einen negativen Effekt bei Fütterung mit L-Cystein, wobei die Lentinsäuregehalte deutlich unterhalb der Werte aus den Kulturen ohne Zusatz lagen.

2.4.4.2 Bestimmung der Cysteingehalte

Bei der Untersuchung der im Nährmedium verbliebenen Menge an Precursor am 9. Kulturtag konnte mit Ausnahme von Stamm 530.90 kein freies L-Cystein mehr nachgewiesen werden. Da L-Cystein mit der Thiolgruppe als funktioneller Einheit relativ oxidationsempfindlich ist und schon durch milde Oxidationsmittel zu Cystin oxidiert werden kann, ist eine Aussage über die tatsächliche Aufnahme der zugesetzten Menge nicht möglich. Die verbliebenen Mengen an L-Cystein im Medium bei 530.90 sind in Abb 2-46 dargestellt.

Die Abnahme der Cysteingehalte kann sowohl auf eine Metabolisierung als auch auf die oben erwähnte Oxidation zurückgeführt werden.

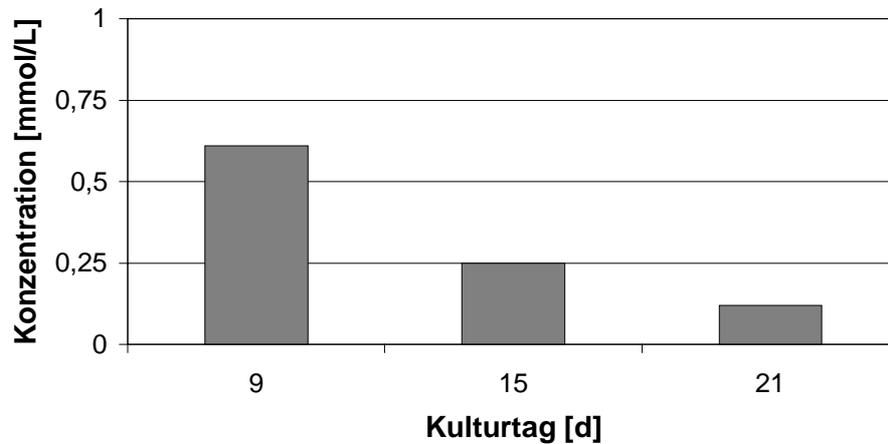


Abb 2-46 Im Medium verbliebenes L-Cystein in Submerskulturen von 530.90 nach Zusatz von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ L-Cystein

Darüber hinaus wurden zum Vergleich die Cysteingehalte der Kulturen mit und ohne Zusatz von L-Cystein ermittelt, um zu überprüfen, ob sich durch die Fütterung Effekte auf den Gehalt dieser Aminosäure im Pool an Aminosäuren im Zellinneren durch Aufnahme ohne Metabolisierung zeigten.

Bei den Stämmen 225.51, 389.89 und 808.91 wurden nur sehr geringe Unterschiede der Cysteingehalte bei den Kulturen mit und ohne Precursorzusatz gemessen. Etwas größere Unterschiede traten bei Weserchamp auf, dessen Werte bei den gefütterten etwas höher lagen als bei den ungefütterten Kulturen. Dagegen zeigten die Stämme 530.90, A 20-5 und A 20-8 signifikante Unterschiede zwischen den ermittelten Cysteingehalten in Kulturen mit oder ohne Precursorgabe. Während bei allen drei Stämmen in den Kulturen ohne Zusatz deutlich höhere Werte im Bereich von $30 \text{ bis } 40 \text{ mg kg}^{-1}$ Feuchtmasse gemessen wurden, konnte z.B. bei A 20-5 am 15. und 21. Kulturtag nahezu kein L-Cystein nachgewiesen werden.

Da aber bei fast allen Stämmen beobachtet werden konnte, daß entweder keine Unterschiede im Gehalt auftraten, oder in den Kulturen ohne Precursorzusatz höhere Cystein-Werte gemessen wurden, konnte ein Effekt der Zufütterung auf den Gehalt dieser Aminosäure ausgeschlossen werden.

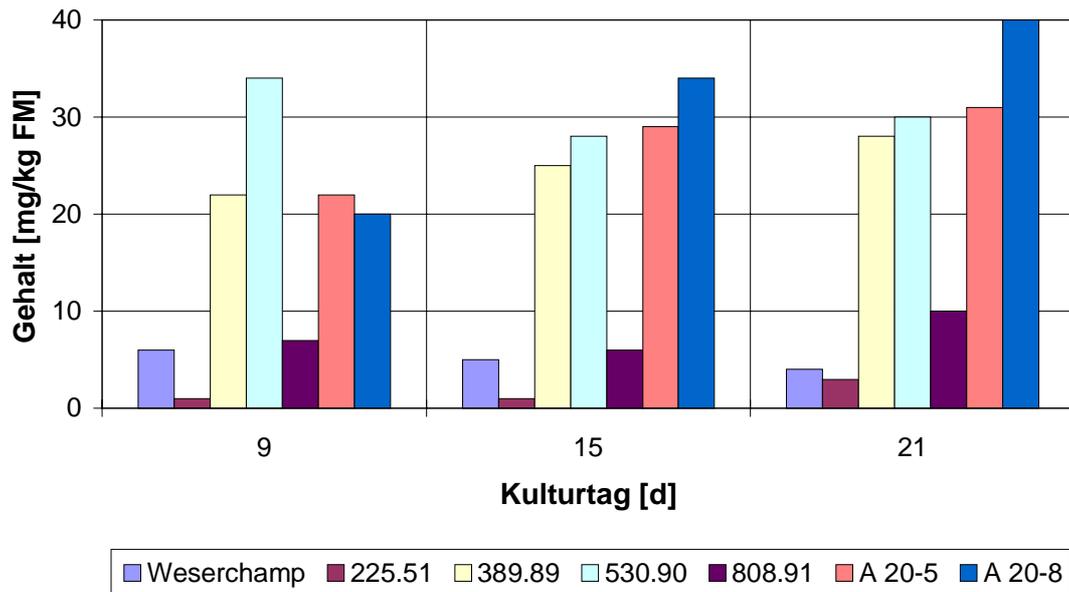
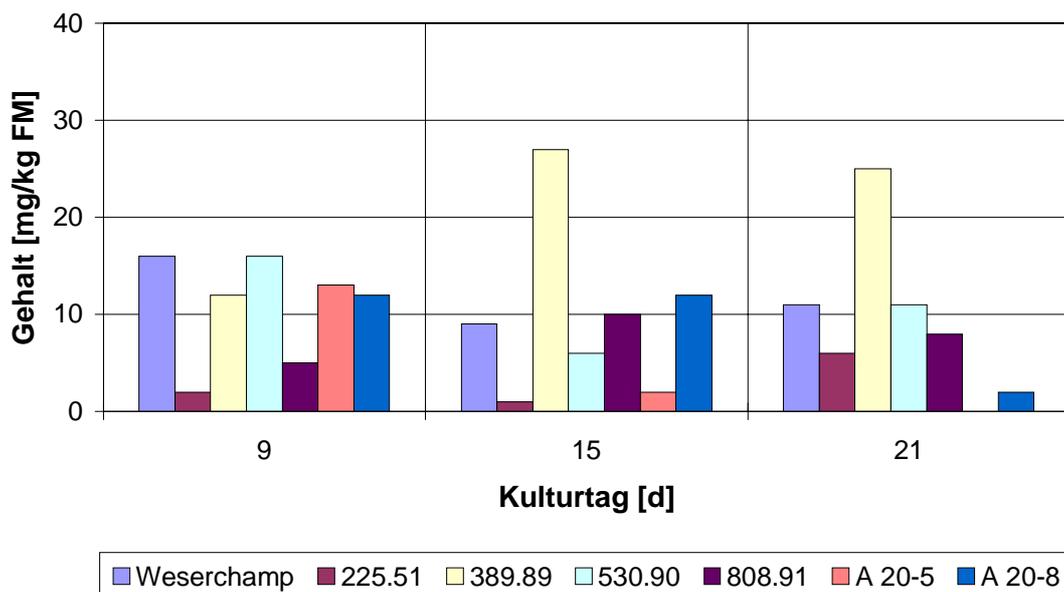


Abb 2-47 Cysteingehalte in Submerskulturen ohne Zusatz

Abb 2-48 Cysteingehalte in Submerskulturen nach Zusatz von L-Cystein ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$)

2.4.5 Zusatz von L-Methionin

Neben L-Cystein als schwefelhaltiger, proteinogener Aminosäure kommt als weiterer potentieller Precursor L-Methionin in Frage. Da hier im Gegensatz zum L-Cystein eine Methylthioethergruppe als funktionelle Einheit vorhanden ist, könnte diese als Methyl-

fungieren, da bei der Lentinsäure die an den Cysteinylrest gebundenen Sulfoxidreste über Methylenbrücken miteinander verknüpft sind. Um den Einfluß eines Precursorzusatzes von L-Methionin auf die vermehrte Bildung von Lentinsäure zu bestimmen, wurde analog zu 2.4.4 vorgegangen. L-Methionin wurde den Submerskulturen am 3. Kulturtag in einer Konzentration von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Kulturmedium als autoklavierter Feststoff zugesetzt und die Kulturen der verschiedenen Stämme von *Lentinus edodes* am 9., 15. und 21. Kulturtag auf ihren Lentinsäuregehalt untersucht.

Auffällig verhielt sich nach dieser Precursorgabe Stamm 808.91, der kein Wachstum mehr zeigte und dessen Pilzmycel sogar lysiert wurde. Die leichte Gelbfärbung des Kulturmediums nach dem Autoklavieren, die sich in allen anderen Versuchen über den Kulturverlauf kaum veränderte, nahm in diesem Fall eine tiefdunkelbraune bis fast schwarze Färbung an. Eine Bestimmung der Lentinsäuregehalte war daher bei 808.91 nicht möglich.

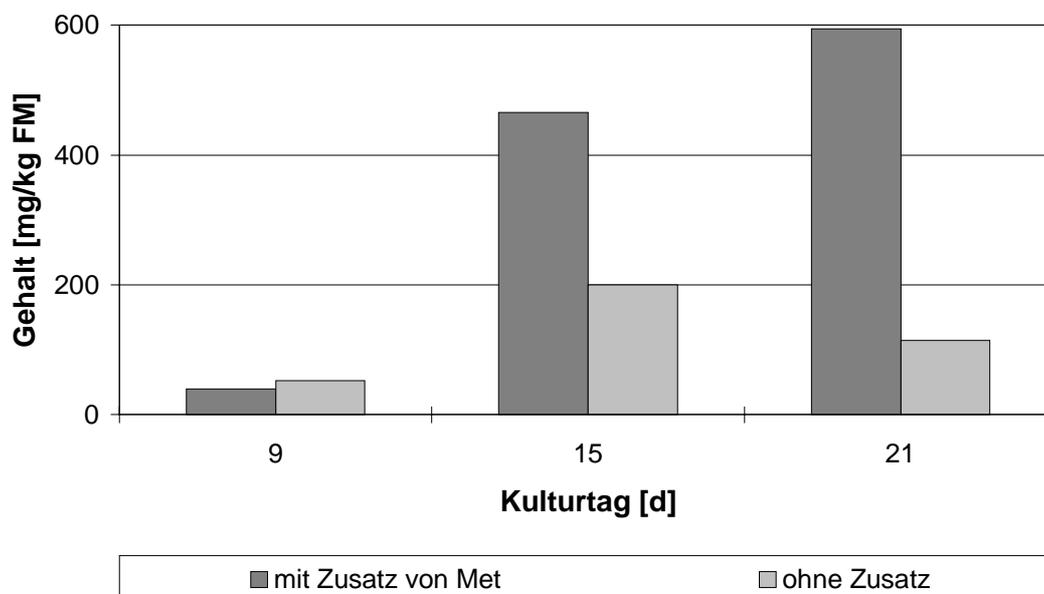


Abb 2-49 Lentinsäuregehalte von Weserchamp in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Wie in Abb 2-49 dargestellt ist, zeigten die Kulturen von Weserchamp zu Beginn der Kultivierung mit und ohne Precursorzusatz ähnliche Lentinsäuregehalte, die im Bereich von etwa 50 mg kg^{-1} lagen. Bereits am 15. Kulturtag waren dagegen deutliche Unterschiede zu erkennen. So wurde nach Zusatz von L-Methionin ein Gehalt von 465 mg kg^{-1} Feuchtmasse ermittelt, der damit nicht nur um mehr als 400 mg kg^{-1} innerhalb von 6 Kulturtagen gestiegen war, sondern auch mehr als eine Verdoppelung des Gehaltes im Vergleich zu der ungefütterten Kultur erreichte.

Die schon nach der Zugabe von L-Cystein beobachtete weitere Steigerung zum 21. Kulturtag ergab sich auch in diesem Experiment, wobei die Steigerungsrate mit 130 mg kg^{-1} hier noch deutlich höher ausfiel und die absoluten Gehalte nahezu 600 mg kg^{-1} betrug. L-Methionin zeigte bei Weserchamp als zugesetzter Precursor einen starken, positiven Effekt auf die Bildung von Lentinsäure.

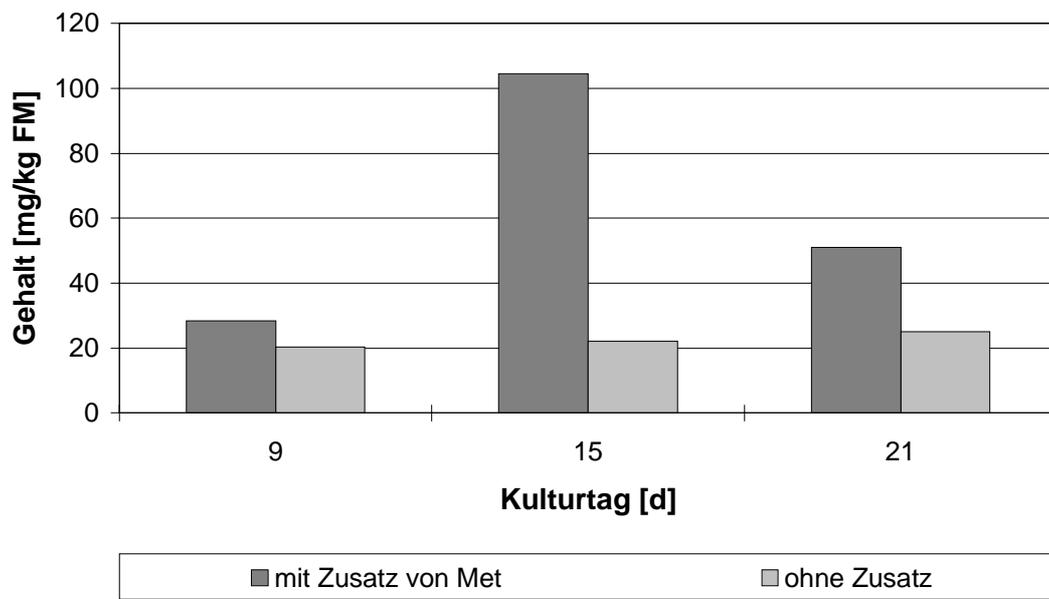


Abb 2-50 Lentinsäuregehalte von 225.51 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Nach Zusatz von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ L-Methionin zu den Submerskulturen von 225.51 (siehe Abb 2-50) wurden bei der Lentinsäurebestimmung am 9. Kulturtag nur geringfügig höhere Gehalte gemessen als in den Kulturen ohne Zusatz. Dagegen zeigte sich am 15. Kulturtag eine deutliche Steigerung, bei der Werte von über 100 mg kg^{-1} erzielt wurden, während in den ungefütterten Kulturen keine Zunahme im Lentinsäuregehalt zu beobachten war. Der deutlich positive Einfluß schwefelhaltiger Aminosäuren, der auch nach Zusatz von L-Cystein gemessen wurde, konnte hier bestätigt werden. Zum Ende der Kultivierung nahmen die Gehalte jedoch wieder um 50 % ab und konnten zu ca. 50 mg kg^{-1} Feuchtmasse bestimmt werden. Dieser Effekt konnte dagegen nach Zusatz von L-Cystein nicht beobachtet werden, da hier eine Steigerung um weitere 40 % vom 15. zum 21. Kulturtag zu verzeichnen war.

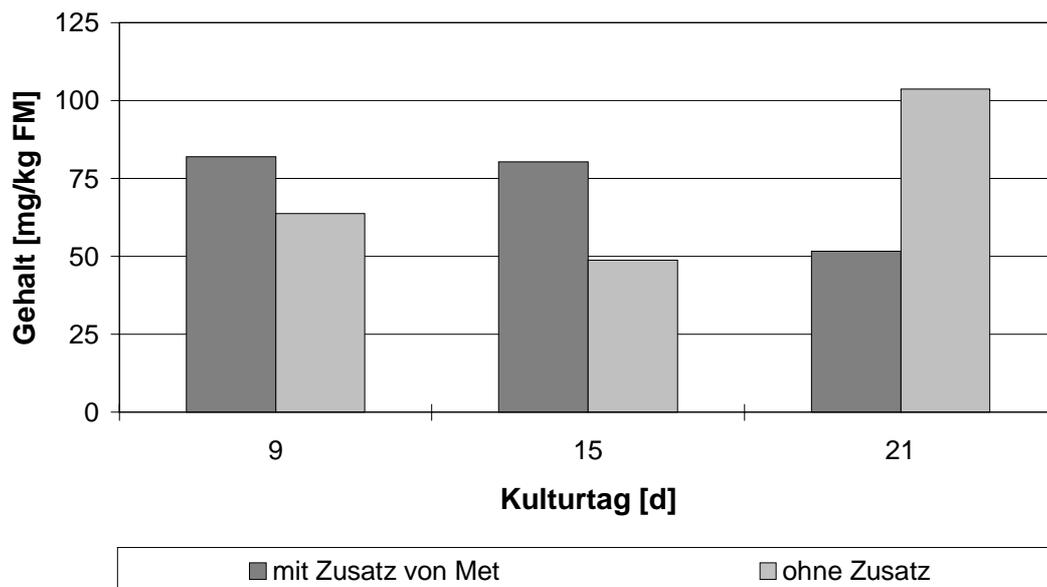


Abb 2-51 Lentin säuregehalte von 389.89 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Bei 389.89 wiesen die gemessenen Werte nur an den ersten beiden untersuchten Kulturtagen eine leichte Steigerung des Lentin säuregehaltes nach Precursorzusatz von L-Methionin gegenüber den ungefütterten Kulturen auf. Die Werte blieben vom 9. zum 15. Kulturtag nahezu konstant und lagen bei ca. 80 mg kg^{-1} Feuchtmasse. Am 21. Kulturtag wurde mit ca. 50 mg kg^{-1} deutlich weniger Lentin säure nachgewiesen und betrug damit nur noch die Hälfte des Gehaltes der ungefütterten Kulturen. Im Gegensatz dazu hatte die Precursorgabe von L-Cystein bei dem untersuchten Stamm 389.89 bis zum 21. Kulturtag einen deutlich positiveren Effekt gezeigt.

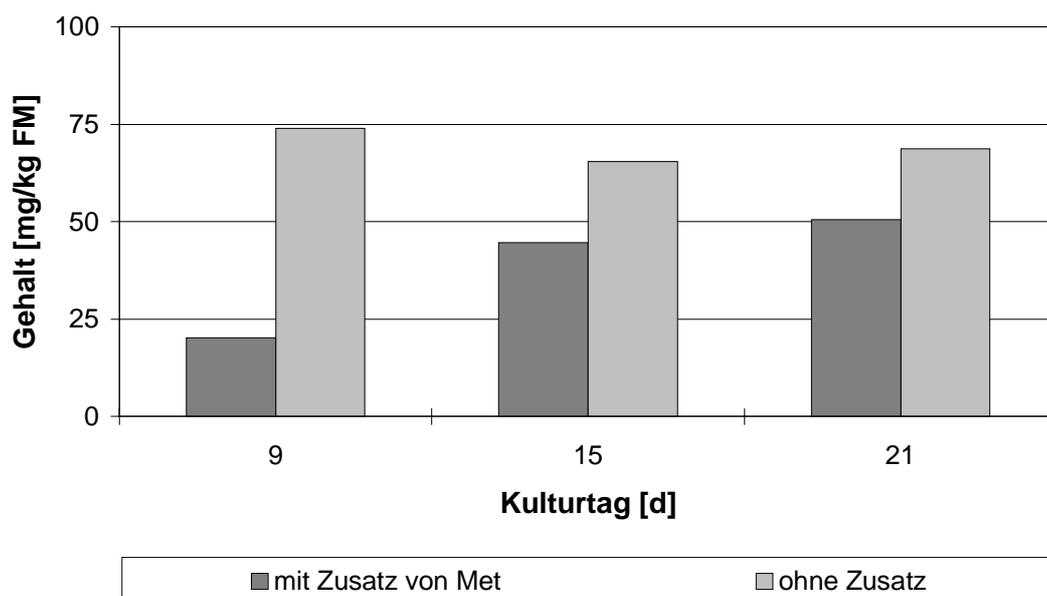


Abb 2-52 Lentin säuregehalte von 530.90 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Der bei Zusatz von L-Cystein bei 530.90 beschriebene negative Effekt auf die Lentinsäurebildung wurde nach Zugabe von L-Methionin bestätigt. Es konnte bei diesem Stamm nach Zusatz von L-Methionin dagegen keine negativen Auswirkungen auf die Biomassebildung verzeichnet werden. Zwar war eine Steigerung im Lentinsäuregehalt von 20 auf 50 mg kg⁻¹ innerhalb des Kultivierungszyklus zu beobachten, jedoch lagen sie zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung oberhalb der Gehalte der ungefütterten Kulturen. Bei diesem Stamm scheint eine gesteigerte Bildung von Lentinsäure durch einen Zusatz von L-Cystein bzw. L-Methionin nicht erreichbar zu sein.

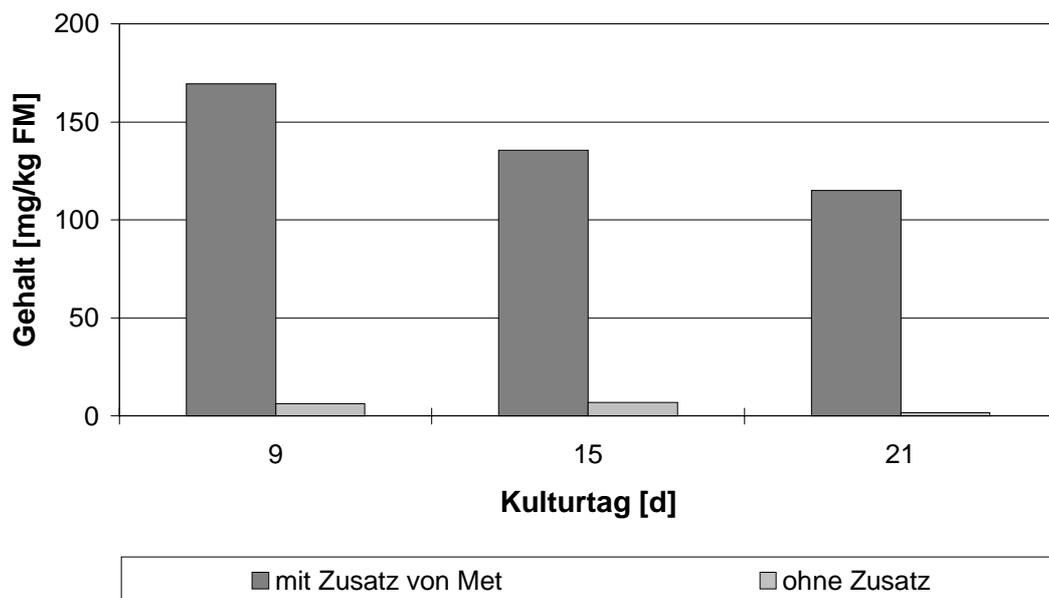


Abb 2-53 Lentinsäuregehalte von A 20-5 in mg kg⁻¹ Feuchtmasse (FM)

Prinzipiell wurden für die Stämme A 20-5 und A 20-8 (siehe Abb 2-53 und Abb 2-54) die gleichen Ergebnisse nach einem Precursorzusatz von L-Methionin erzielt. Bei diesen beiden Stämmen wurden die höchsten Lentinsäuregehalte am 9. Kulturtag mit 170 mg kg⁻¹ für A 20-5 und ca. 130 mg kg⁻¹ für A 20-8 ermittelt. Danach fielen die Werte vom 15. bis 21. Kulturtag jeweils etwa um etwa 20 bis 30 mg kg⁻¹ ab, wobei sie dennoch deutlich über den Gehalten der ungefütterten Kulturen lagen und damit auch die Werte aus der Fütterung mit L-Cystein übertrafen. Für beide untersuchten Stämme konnte ein positiver Effekt auf die Lentinsäurebildung nach Zusatz von L-Methionin als Precursor ermittelt werden.

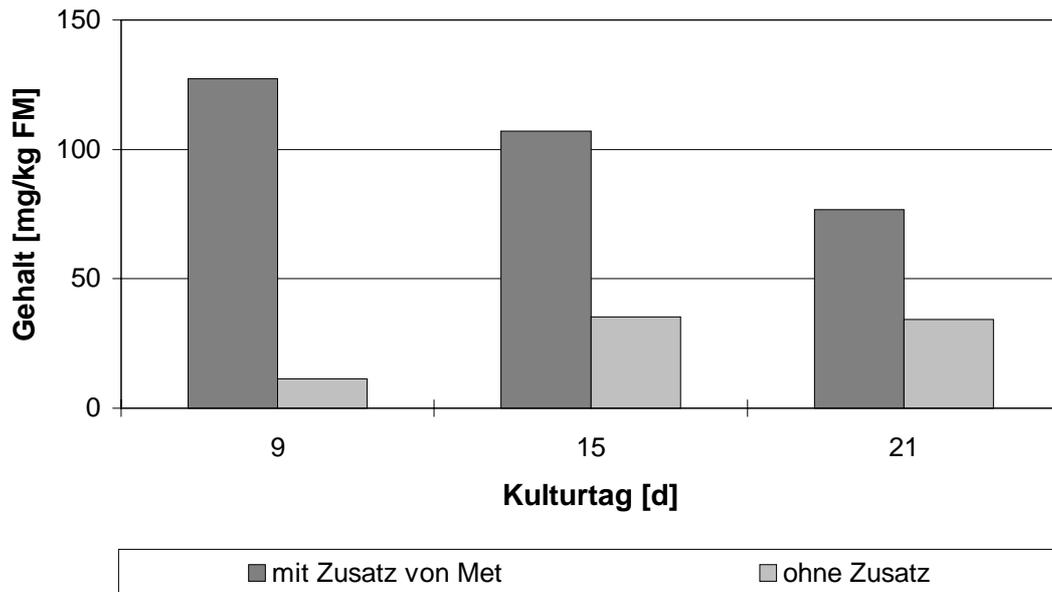


Abb 2-54 Lentinsäuregehalte von A 20-8 in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Die unter 2.4.4.2 durchgeführte Bestimmung der L-Cysteingehalte nach einer Precursorgabe wurde im Fall von L-Methionin nicht durchgeführt, da anhand von Stichproben untersuchte Gehalte sowohl in den ungefütterten als auch in den Kulturen nach Zusatz des Precursors sehr gering bzw. teilweise gar nicht nachweisbar waren. Bei der Bestimmung des Rest-Methionins im Kulturmedium konnte bei allen Stämmen am 9. Kulturtag kein Precursor mehr nachgewiesen werden, wobei auch bei Methionin ein chemischer Abbau im Kulturmedium nicht auszuschließen ist, so daß möglicherweise nicht die gesamte zugesetzte Menge aufgenommen wurde.

2.4.5.1 Einfluß der Konzentration von L-Methionin

Wie in 2.4.5 gezeigt werden konnte, beeinflusst der Zusatz von L-Methionin die Menge an gebildeter Lentinsäure erheblich. Aufgrund der Tatsache, daß von der zugesetzten Menge an L-Methionin von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ im Kulturmedium am 9. Kulturtag nichts mehr nachzuweisen war, wurde überprüft, ob durch Zusatz größerer Mengen an Precursor die Bildung von Lentinsäure weiter gesteigert werden kann. Da der größte Effekt bei *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp beobachtet werden konnte, wurde diesen Kulturen - wie schon zuvor beschrieben - einmalig am 3. Kulturtag der Precursor L-Methionin in einer deutlich größeren Menge von $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ als autoklavierter Feststoff zugesetzt. Parallel dazu wurden aus Vergleichsgründen Kulturen ohne bzw. mit den unter 2.4.5 eingesetzten Mengen von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ L-Methionin als Precursorzusatz auf ihren Lentinsäuregehalt hin untersucht.

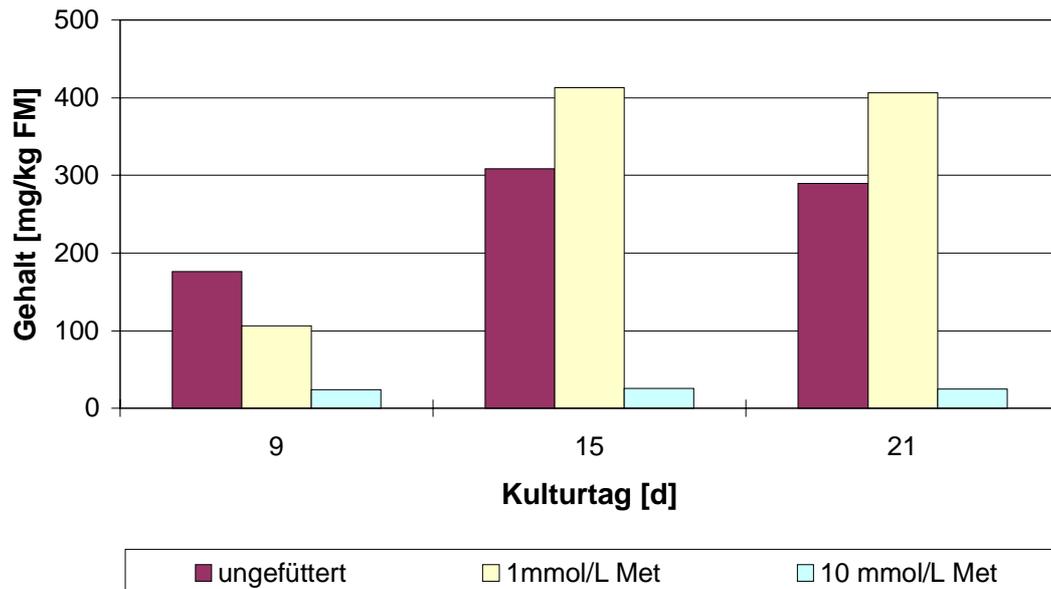


Abb 2-55 Lentinsäuregehalte von Weserchamp in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

In Abb 2-55 sind die ermittelten Lentinsäuregehalte von Weserchamp bei Zusatz verschiedener Konzentrationen an L-Methionin dargestellt.

Bei einer Precursorgabe von $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ kam die Synthese der Lentinsäure fast vollständig zum Erliegen. Es wurden über den gesamten Kulturverlauf Werte von 25 mg kg^{-1} gemessen, die deutlich geringer ausfielen, als die der ungefütterten Kulturen, obwohl keine negativen Effekte auf das Wachstum beobachtet wurden. Die nahezu unveränderten Werte an den drei untersuchten Kulturtagen deuten darauf hin, daß die gewählte Konzentration die Lentinsäurebildung negativ beeinflußt hat.

Dagegen lagen die Gehalte an Lentinsäure in den ungefütterten Kulturen ungewöhnlich hoch. Schon am 9. Kulturtag wurden Werte von 170 mg kg^{-1} gemessen, die sich zum 15. Kulturtag auf 300 mg kg^{-1} steigerten, womit sie um 100 mg kg^{-1} höher lagen gegenüber den zuvor ermittelten Gehalten ungefütterter Kulturen von Weserchamp.

Die Steigerungsrate durch den Zusatz von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ fiel bei diesem Wiederholungsexperiment deutlich geringer aus, wobei die Werte dennoch signifikant höher lagen als in den ungefütterten Kulturen. Es wurden Gehalte von ca. 410 mg kg^{-1} gemessen, die am 15. und 21. Kulturtag nahezu konstant blieben.

Die verzehnfachte Precursormenge von $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ L-Methionin hatte demnach einen kontraproduktiven Einfluß auf eine Steigerung der Bildung von Lentinsäure.

2.4.6 Lentinsäuregehalte in schwefelfreiem LEATHAM-Medium

Die Kultivierungen zur Bestimmung der Lentinsäuregehalte wurden im LEATHAM-Medium durchgeführt, das aufgrund von sulfathaltigen Salzen eine Schwefelquelle enthält, die vom Pilz zur Synthese der Lentinsäure genutzt werden kann. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Bildung von Lentinsäure durch das Fehlen von anorganischen Schwefelquellen im Medium unterdrückt wird. Die Kultivierungen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben in 500 mL Erlenmeyerkolben mit 250 mL Medium durchgeführt. Um den Eintrag von Restgehalten an Schwefel aus dem Inoculum der Vorkulturen zu vermeiden, wurde das Inoculum wie unter 4.3.5 beschrieben aufgearbeitet und den Kulturen in 0,9% NaCl-Lösung suspendiert zugesetzt.

Tab 2-9 Gegenüberstellung der schwefelhaltigen und schwefelfreien Medienbestandteile des LEATHAM-Mediums

| schwefelhaltiges LEATHAM-Medium | schwefelfreies LEATHAM-Medium |
|---|---|
| $\text{MgSO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ | $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ |
| $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | ZnCl_2 |
| $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2] \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ |
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ |

Die schwefelhaltigen Vitamine Biotin und Thiamin, die dem Medium nach dem Autoklavieren zugesetzt werden, konnten nicht ersetzt werden, wobei die Mengen an Thiamin ($3 \mu\text{mol L}^{-1}$) und Biotin ($0,12 \mu\text{mol L}^{-1}$) so gering waren, daß sie als potentielle Schwefelquellen kaum ins Gewicht fallen würden.

Während der Kultivierung war auffällig, daß die meisten der untersuchten Stämme ein deutlich schlechteres Wachstum zeigten, als im LEATHAM-Medium mit Sulfatsalzen als Schwefelquelle. Da auf eine Trockenmassebestimmung wie unter 2.4.1 beschrieben verzichtet wurde, konnte der Aufbau an Biomasse nur anhand der ermittelten Feuchtmassen bestimmt werden. Aufgrund eigener früherer Untersuchungen war bekannt, daß der Trocknungsverlust bei etwa 90% lag. Ein Vergleich der Stämme bezüglich der Bildung von Biomasse in schwefelfreiem LEATHAM-Medium ist in Abb 2-56 dargestellt.

Mit Weserchamp wurden die höchsten Biomassewerte erzielt, wobei sie jedoch mit etwa 6 g L^{-1} Trockenmasse unterhalb der Ergebnisse aus dem LEATHAM-Medium mit Sulfatsalzen als Schwefelquellen lagen (siehe Abb 2-57), bei dem in der Regel Trockenmassegehalte von 8 bis 10 g L^{-1} erreicht wurden. Relativ geringe Biomasseproduktion zeigten die Stämme 225.52, 389.89, 808.91 und A 20-8, mit denen nur Feuchtmassengehalte von 15 bis 20 g L^{-1} (entspricht etwa $1,5$ bis 2 g L^{-1} an Trockenmasse) erzielt wurden.

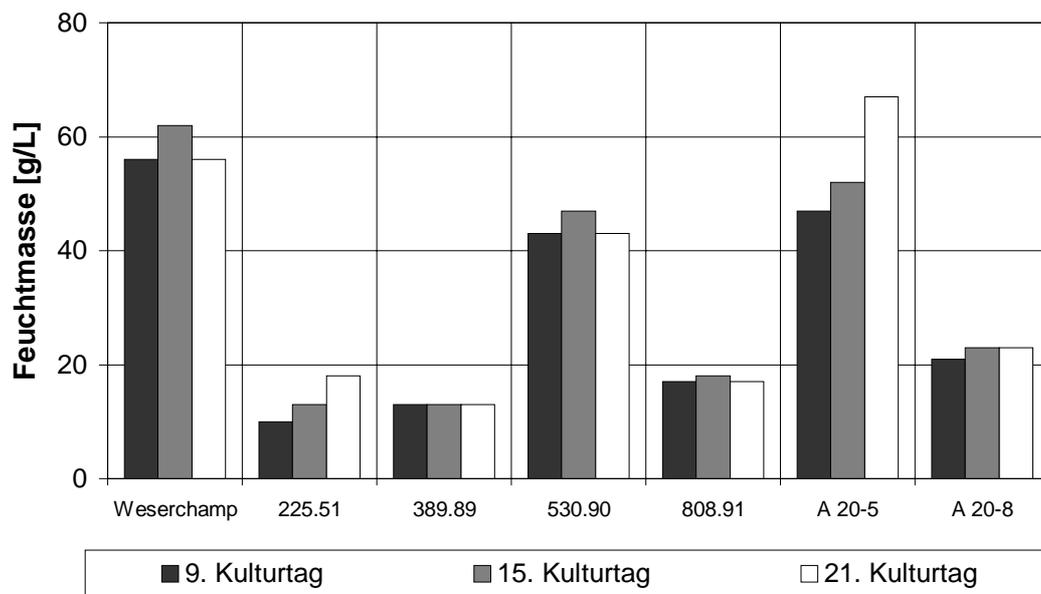


Abb 2-56 Feuchtmassen in g L^{-1} in schwefelfreiem LEATHAM-Medium

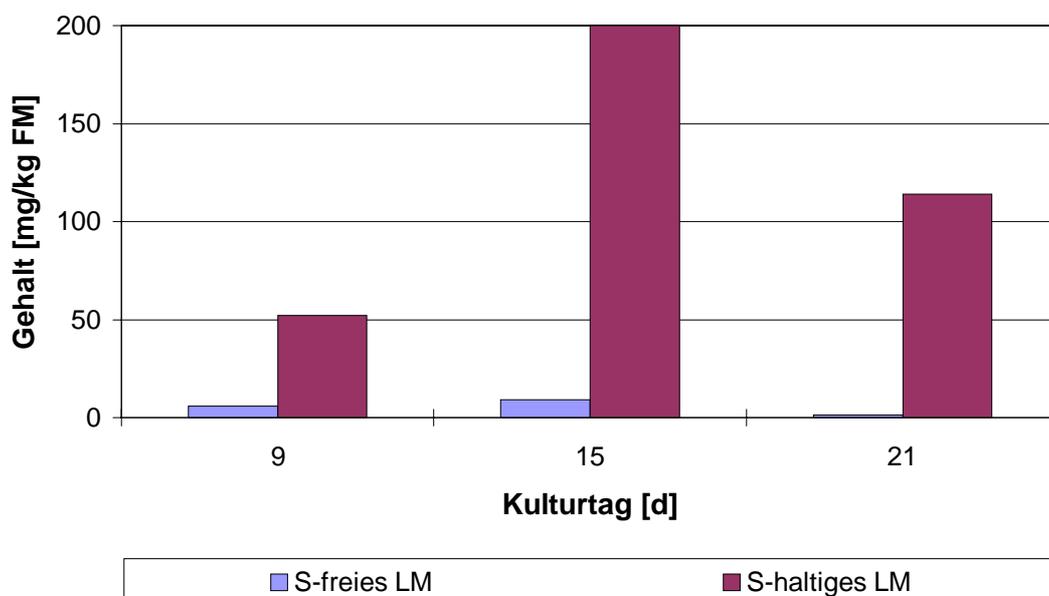


Abb 2-57 Lentin säuregehalte von Weserchamp in schwefelfreiem (S-freies) und schwefelhaltigem (S-haltiges) LEATHAM-Medium (LM) in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Der Unterschied der Lentinsäuregehalte der Kultivierungen von Weserchamp in schwefelfreiem und unverändertem LEATHAM-Medium sind in Abb 2-57 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß ein Fehlen der Schwefelquelle im Kulturmedium die Biosynthese der Lentinsäure fast vollständig zum Erliegen brachte. Die Werte lagen an den drei untersuchten Kulturtagen $< 10 \text{ mg kg}^{-1}$ Feuchtmasse, wobei am 21. Kulturtag nur noch $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ nachgewiesen wurden.

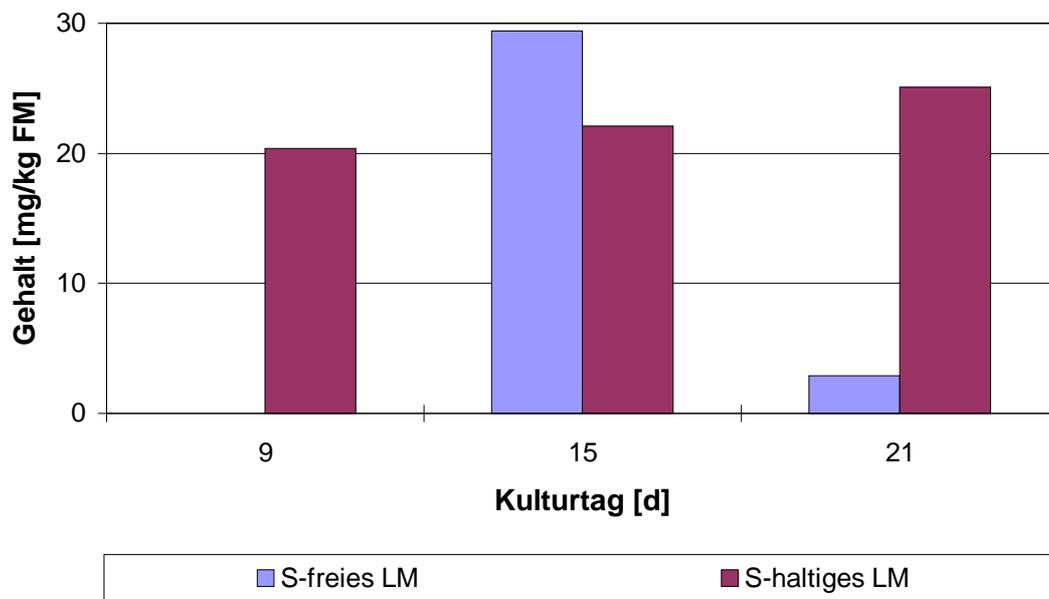


Abb 2-58 Lentinsäuregehalte von 225.51 in schwefelfreiem (S-freies) und schwefelhaltigem (S-haltiges) LEATHAM-Medium (LM) in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Weniger deutlich trat der Effekt auf die Lentinsäurebildung bei 225.51 in schwefelfreiem LEATHAM-Medium auf (siehe Abb 2-58). Obwohl am 9. Kulturtag keine Lentinsäure nachzuweisen war, lag der Gehalt am 15. Kulturtag etwas oberhalb der Werte aus S-haltigem LEATHAM-Medium. Zum 21. Kulturtag zeigte sich jedoch durch die Abnahme des Lentinsäuregehaltes auf 3 mg kg^{-1} ein deutlicher Effekt, so daß auch bei diesem untersuchten Stamm die Bildung der Lentinsäure durch das Fehlen einer Schwefelquelle unterdrückt wurde. Die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse vom 9. und 15. Kulturtag könnte damit zu erklären sein, daß aufgrund der geringen gebildeten Biomasse der absolute Fehlerbereich in der Größenordnung der gemessenen Werte lag. Bei diesem Experiment mußte auf eine Doppelbestimmung verzichtet werden, da die Feuchtmassengehalte zu gering waren.

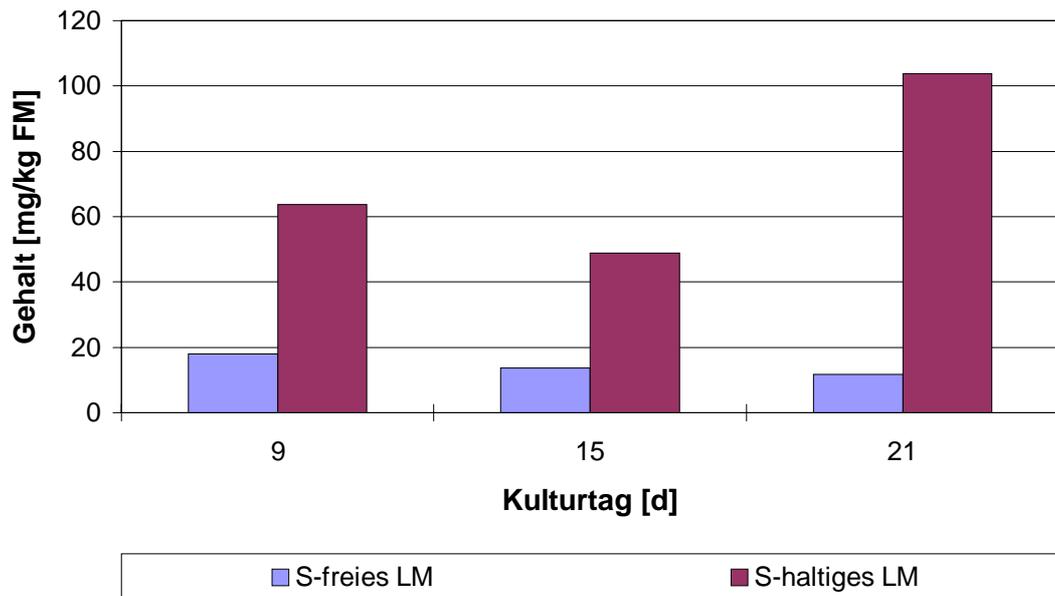


Abb 2-59 Lentinsäuregehalte von 389.89 in schwefelfreiem (S-freies) und schwefelhaltigem (S-haltiges) LEATHAM-Medium (LM) in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Bei der Bestimmung der Lentinsäuregehalte in Submerskulturen der Stämme 389.89 (siehe Abb 2-59) und 530.90 (siehe Abb 2-60) in S-freiem LEATHAM-Medium zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Weserchamp.

Die Werte lagen deutlich niedriger als in den Kultivierungen in S-haltigem Medium. Im Gegensatz zu den im Untersuchungszeitraum bestimmten Mengen von ca. 60 bis 100 mg kg^{-1} , wurden lediglich Gehalte zwischen 10 und 20 mg kg^{-1} ermittelt. Bei 530.90 konnte am 21. Kulturtag keine Lentinsäure mehr nachgewiesen werden.

Der beobachtete Rückgang der Lentinsäuregehalte vom 9. bis zum 21. Kulturtag weist darauf hin, daß zum weiteren Aufbau der Lentinsäure keine geeigneten Precursoren in Form einer Schwefelquelle zur Verfügung standen.

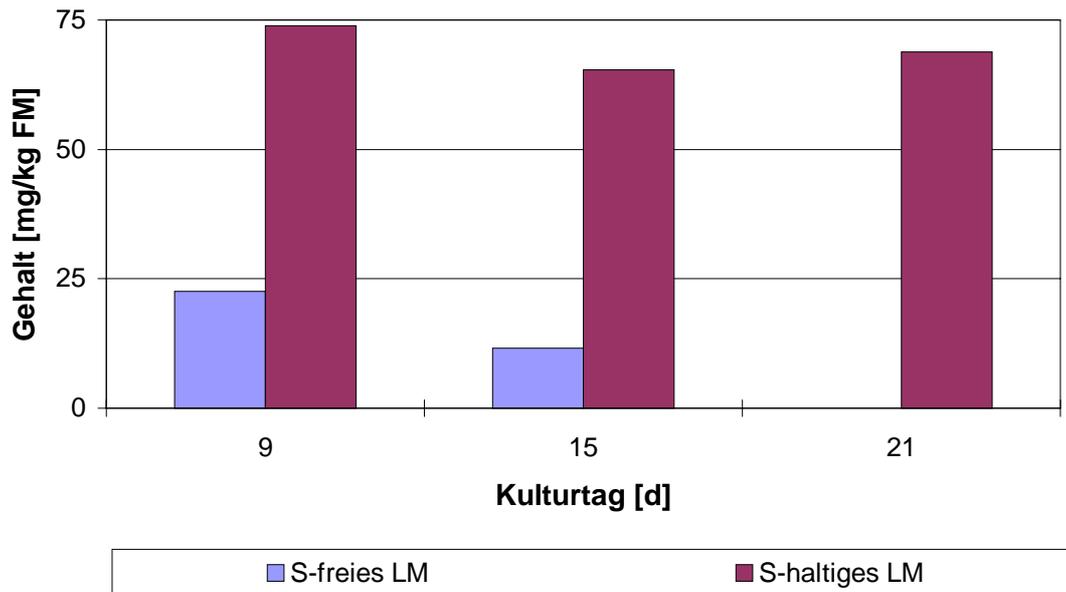


Abb 2-60 Lentinsäuregehalte von 530.90 in schwefelfreiem (S-freies) und schwefelhaltigem (S-haltiges) LEATHAM-Medium (LM) in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Bei Stamm 808.91 war der Effekt durch das Fehlen einer Schwefelquelle im Medium weniger stark ausgeprägt (siehe Abb 2-61). An den ersten beiden untersuchten Kulturtagen ergaben sich kaum Unterschiede zu den Kultivierungen in S-haltigem Medium. Erst zum 21. Kulturtag war nur noch die Hälfte der in schwefelhaltigem Medium ermittelten Menge an Lentinsäure nachzuweisen.

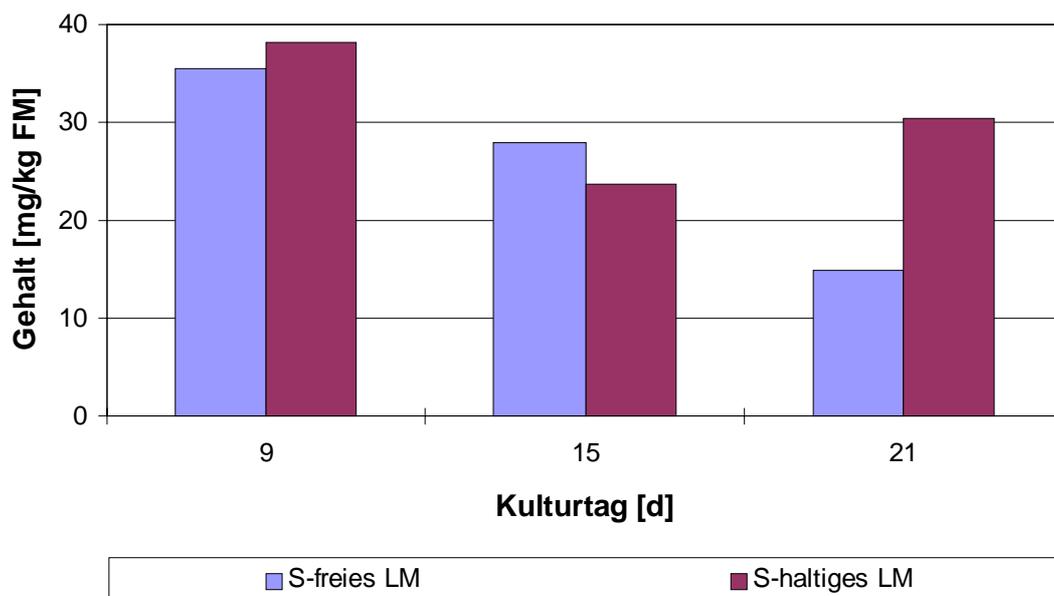


Abb 2-61 Lentinsäuregehalte von 808.91 in schwefelfreiem (S-freies) und schwefelhaltigem (S-haltiges) LEATHAM-Medium (LM) in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

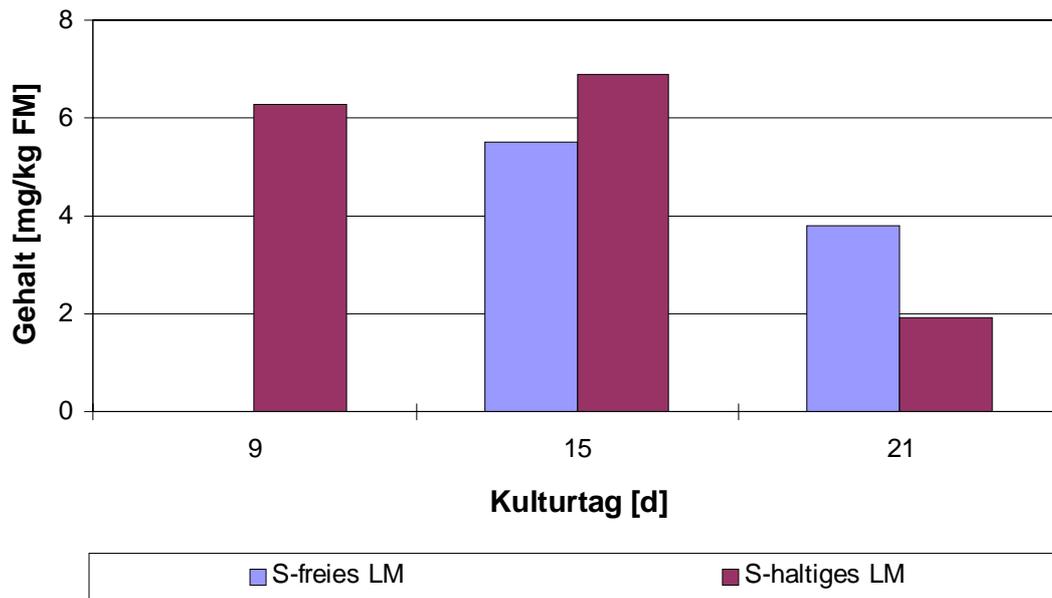


Abb 2-62 Lentinsäuregehalte von A 20-5 in schwefelfreiem (S-freies) und schwefelhaltigem (S-haltiges) LEATHAM-Medium (LM) in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Die Gehalte an Lentinsäure fielen bei A 20-5 in schwefelhaltigem LEATHAM-Medium von allen untersuchten Stämmen am niedrigsten aus. Daher ist ein Effekt durch das Fehlen der Schwefelquelle im Kulturmedium nur schwer zu ermitteln. Es ergaben sich bei der Bestimmung der Lentinsäuregehalte widersprüchliche Ergebnisse. Am 9. Kulturtag konnte keine Lentinsäure nachgewiesen werden, während am 15. Kulturtag ein Gehalt von $5,5 \text{ mg kg}^{-1}$ Feuchtmasse gemessen wurde, der dann am 21. Kulturtag auf knapp 2 mg kg^{-1} zurückging. Dieser letzte Wert lag damit oberhalb des ermittelten Gehaltes aus der Kultivierung in schwefelhaltigem LEATHAM-Medium.

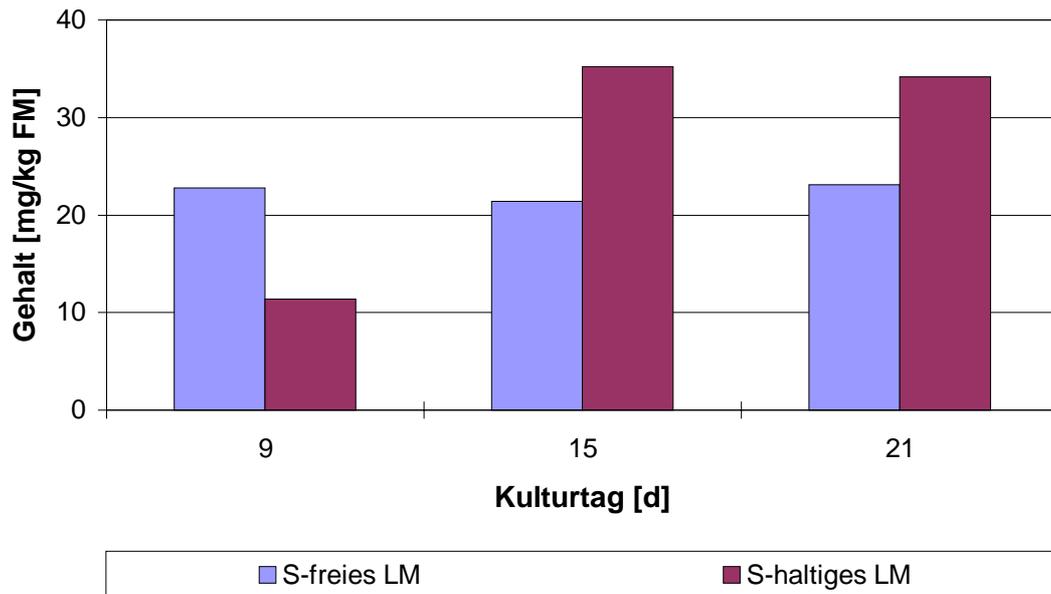


Abb 2-63 Lentinsäuregehalte von A 20-8 in schwefelfreiem (S-freies) und schwefelhaltigem (S-haltiges) LEATHAM-Medium (LM) in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Bei A 20-8 stagnierte die Produktion der Lentinsäure an den drei untersuchten Kulturtagen mit Gehalten im Bereich von 21 mg kg^{-1} Feuchtmasse. Obwohl die Werte am 9. Kulturtag deutlich höher ausfallen, als in den Kulturen mit schwefelhaltigem Medium, zeigte sich bei letzteren ein Anstieg im Lentinsäuregehalt bis zum 15. Kulturtag, während die Gehalte im S-freien Medium konstant blieben. Allerdings wurde kein Rückgang in den Gehalten festgestellt, der bei den anderen Stämmen beobachtet wurde.

2.4.7 Zusatz von anorganischen Precursoren

Die Applikation von Precursoren zu den Submerskulturen von *Lentinus edodes* zeigte deutlich positive Effekte auf eine vermehrte Bildung von Lentinsäure. Die eingesetzten organischen Verbindungen waren dabei schwefelhaltige Aminosäuren, die aufgrund ihrer Strukturverwandtschaft zur Lentinsäure als geeignete Precursoren erschienen. Als anorganische Schwefelquelle standen dem Pilz im Kulturmedium (LEATHAM-Medium) Sulfatsalze zur Verfügung, die vom Pilz jedoch erst durch Metabolisierung in eine verwertbare Form gebracht werden müssen. Es wurde der Einfluß alternativer anorganischer Schwefelquellen auf die Synthese der Lentinsäure bei Weserchamp untersucht, da mit diesem Stamm bei den vorangegangenen Experimenten die größten Effekte und die höchsten Gehalte von Lentinsäure erzielt wurden.

2.4.7.1 Natriumsulfid

Aufgrund der schlechten Ergebnisse, die aus einer überhöhten Precursorgabe von $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ an L-Methionin resultierten, wurde den Kulturen die alternative Schwefelquelle Natriumsulfid in einer moderaten Menge von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Kulturmedium zugesetzt. Da Na_2S chemisch reaktiv instabil (d.h. oxidationsempfindlich) ist, wurden wäßrige Lösungen hergestellt, die sterilfiltriert den Kulturen zupipettiert wurden, anstatt durch den Autoklavierprozeß hohen Temperaturen ausgesetzt zu werden. Da Na_2S -Lösungen stark alkalisch reagieren, wurde die Zugabemenge geteilt und jeweils $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ am 3. und 6. Kulturtag zugesetzt, um den pH-Wert des Kulturmediums nicht zu sehr anzuheben. Die Aufarbeitung erfolgte wie schon in den Versuchen zuvor am 9., 15. und 21. Kulturtag, deren Ergebnisse in Abb 2-64 dargestellt sind.

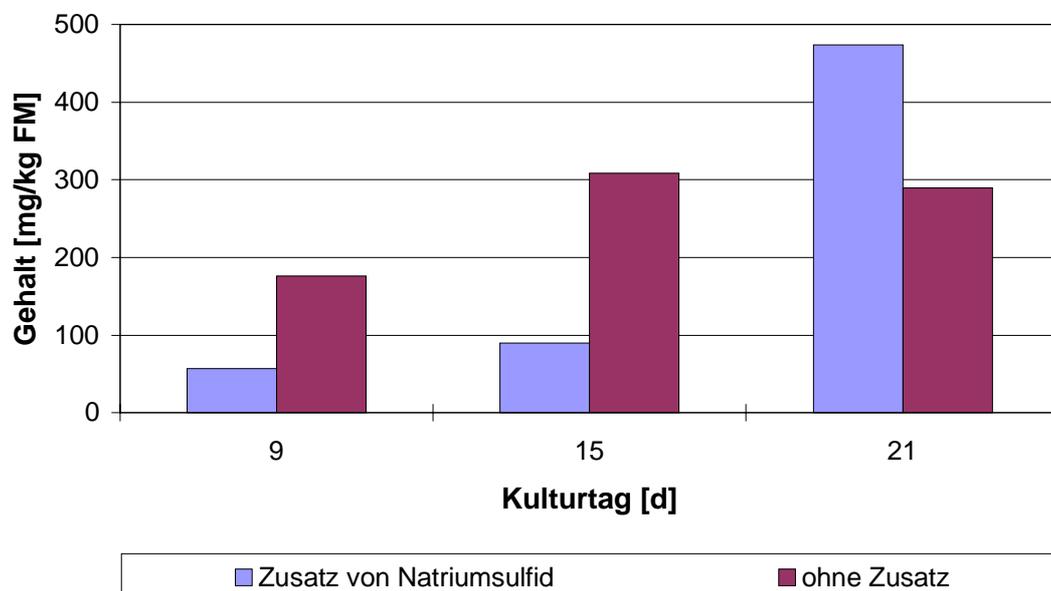


Abb 2-64 Lentinsäuregehalte von Weserchamp in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Die vergleichenden Lentinsäuregehalte der Kulturen von Weserchamp ohne Zusatz eines Precursors sind dem unter 2.4.5.1 beschriebenen Versuch entnommen, da sie zum selben Zeitpunkt durchgeführt wurden. An den beiden ersten untersuchten Kulturtagen lagen die Werte deutlich unterhalb des Niveaus der ungefütterten Kulturen, wobei sowohl mit als auch ohne Zusatz vom 9. zum 15. Kulturtag annähernd eine Verdoppelung der Gehalte erreicht wurde. Bei letztgenannten fielen die Werte zum 21. Kulturtag wieder leicht ab, während in den Kulturen mit einem Zusatz von $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Na_2S eine Steigerung des Lentinsäuregehaltes um 380 mg kg^{-1} Feuchtmasse erreicht wurde, die mehr als einer vierfachen Zunahme des Gehaltes gegenüber dem 15. Kulturtag entspricht.

Der erst gegen Ende des Kulturverlaufs einsetzende deutlich positive Effekt könnte auf die sukzessive Zugabe des Precursors am 3. und 6. Kulturtag zurückzuführen sein.

2.4.7.2 Natriumthiosulfat

Der Precursorzusatz von Natriumthiosulfat erfolgte wie unter 2.4.7.1 beschrieben als steril-filtrierte wässrige Lösung, wobei zur besseren Vergleichbarkeit der Effekte die Zugabe von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ jeweils am 3. und 6. Kulturtag erfolgte.

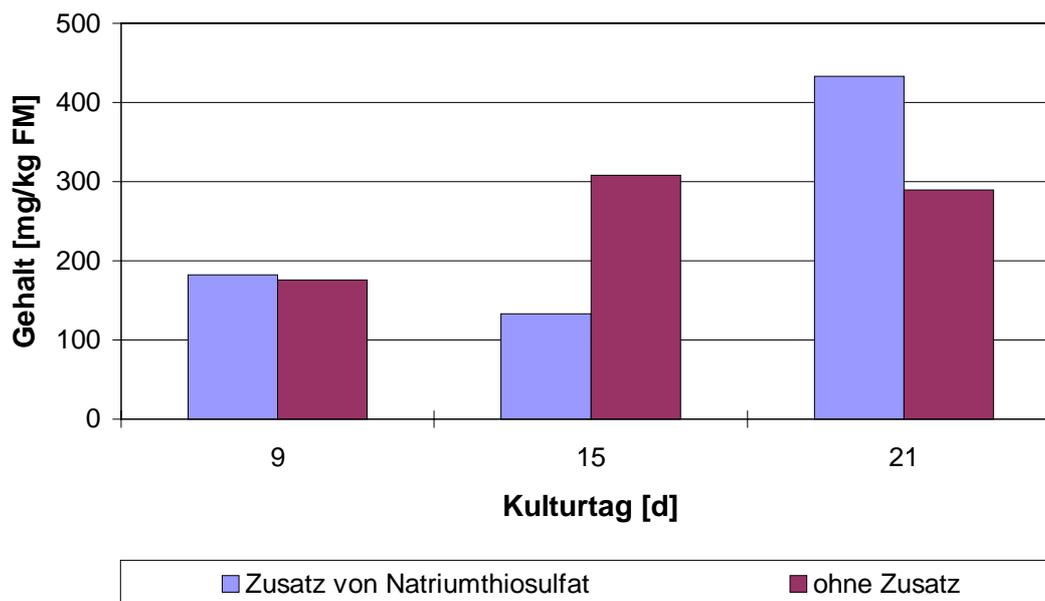


Abb 2-65 Lentinsäuregehalte von Weserchamp in mg kg^{-1} Feuchtmasse (FM)

Der Precursorzusatz von Natriumthiosulfat zeigte, wie in Abb 2-65 dargestellt, einen ähnlichen Effekt, wie die Zugabe von Natriumsulfid als Precursor zu Kulturen von Weserchamp, wobei die Quantität der Effekte weniger stark ausgeprägt war. Am 9. Kulturtag unterschied sich der Lentinsäuregehalt kaum von den ungefütterten Kulturen, nahm allerdings zum 15. Kulturtag leicht ab, während der Gehalt der ungefütterten parallel Kulturen zunahm. Am 21. Kulturtag zeigte sich insgesamt ein positiver Effekt des Zusatzes von Natriumthiosulfat auf die Bildung von Lentinsäure, da die Werte deutlich über denen der ungefütterten Kulturen lagen. Der Gehalt wurde um 250 mg kg^{-1} gesteigert, das einer Zunahme um ca. 250 % entsprach.

Positive Effekte konnten demnach für beide untersuchten anorganischen Precursoren festgestellt werden, wobei am 21. Kulturtag die Lentinsäuregehalte ähnliche Größenordnungen erreichten (474 mg kg^{-1} bei Na_2S und 433 mg kg^{-1} bei $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

2.5 Untersuchungen des Aromaprofils von *Lentinus edodes*

2.5.1 Gewinnung des Aromaextraktes aus frischen Shiitake

Die Aromastoffe des Shiitake werden nach Zerstörung der Zellkompartimentierung durch enzymatischen Abbau freigesetzt. Daher wurden die Fruchtkörper zur Gewinnung des Aromaextraktes enzymaktivierend mit Phosphat-Puffer homogenisiert. Um unter standardisierten Bedingungen zu arbeiten, wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Da nicht davon ausgegangen werden konnte, daß sich sämtliche flüchtigen Verbindungen in der wäßrigen Phase lösen und um ein möglichst vollständiges Aromaprofil zu erhalten, wurde auch der Zentrifugationsrückstand extrahiert.

Die detaillierte Durchführung ist unter 4.7.2 beschrieben, in Abb 2-66 ist der Ablauf schematisch dargestellt.

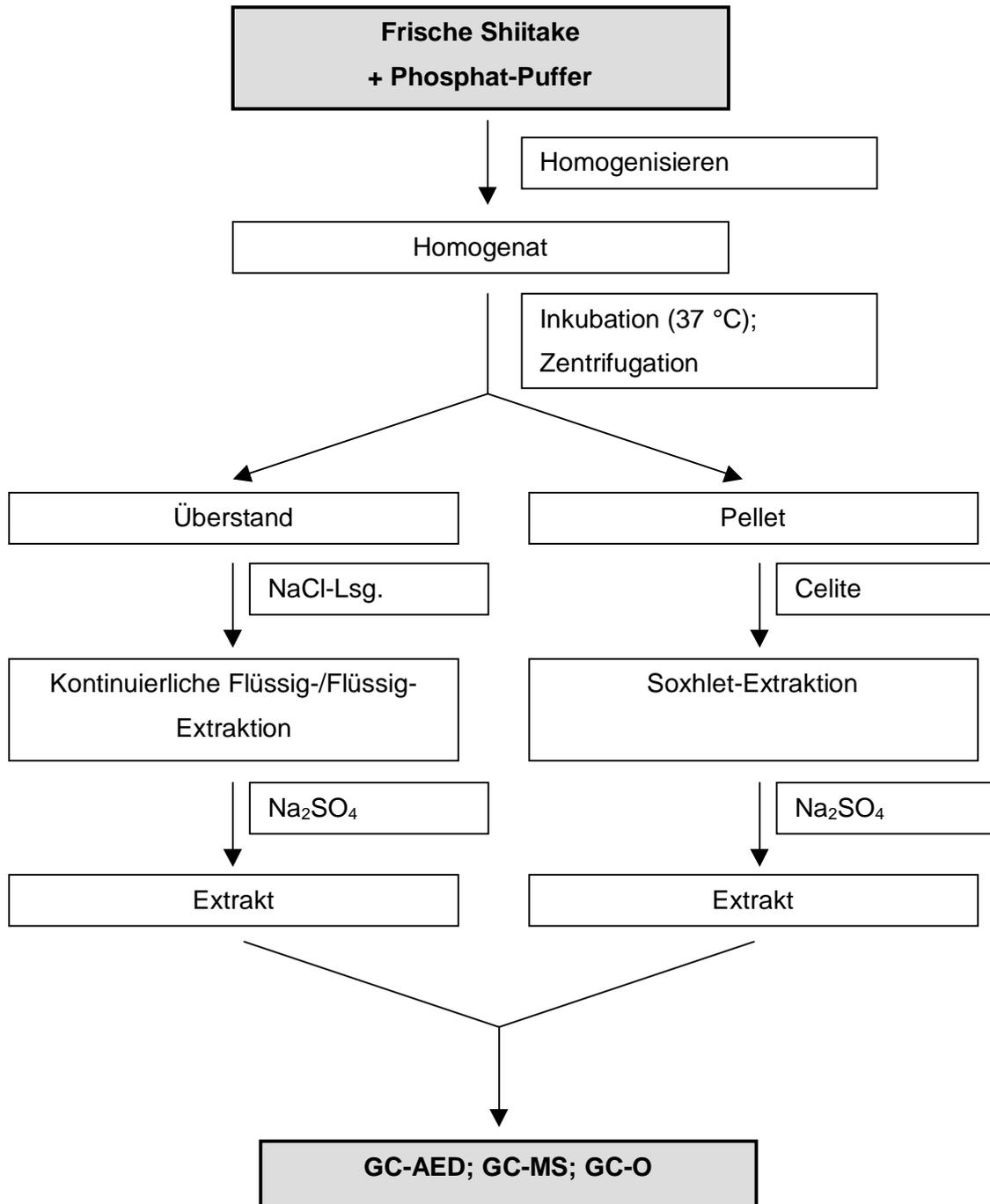


Abb 2-66 Fließschema zur Gewinnung der Aromaextrakte aus frischen Shiitake

2.5.2 Untersuchung des Aromaextrakte aus frischen Shiitake

2.5.2.1 GC-AED und GC-MS

Die Kopplung der Gaschromatographie mit der Atomemissionsspektroskopie ermöglicht die simultane, spezifische Detektion verschiedener Elemente. Im Atomemissionsdetektor (AED) wird zunächst eine Zersetzung des Analyten und die Anregung der dabei entstandenen Atome in einem mikrowelleninduzierten Heliumplasma erreicht.

Anschließend findet die Messung des emittierten Lichts im Spektrometer statt, indem es an einem beweglichen Gitter in seine Spektrallinien zerlegt und auf einen Photodiodenarray gelenkt wird [41]. Die Empfindlichkeit von Kohlenstoff und Schwefel sind dabei unterschiedlich und hängen unter anderem auch von der Anzahl der entsprechenden Atome im Molekül ab.

Im Aroma des Shiitake wurden zahlreiche schwefelhaltigen Substanzen nachgewiesen [42]. Daher war eine selektive Detektion der schwefelhaltigen Substanzen mittels GC-AED und anschließender Identifizierung mittels GC-MS eine geeignete Möglichkeit, aus den komplexen Chromatogrammen des Aromaextraktes, der neben den geruchsaktiven Komponenten auch andere flüchtige Verbindungen enthielt, eine relativ schnelle Selektion zu erreichen.

Die Analyse der Aromaextrakte aus der Flüssig/Flüssig-Extraktion und der Soxhlet-Extraktion ergab hauptsächlich quantitative Unterschiede. Neben den drei Hauptpeaks, die 1,2,4-Trithiolan, 1,2,4,5-Tetrathian und dem Lenthionin zugeordnet werden konnten, wurden zahlreiche kleinere Peaks detektiert (siehe Tab 2-10).

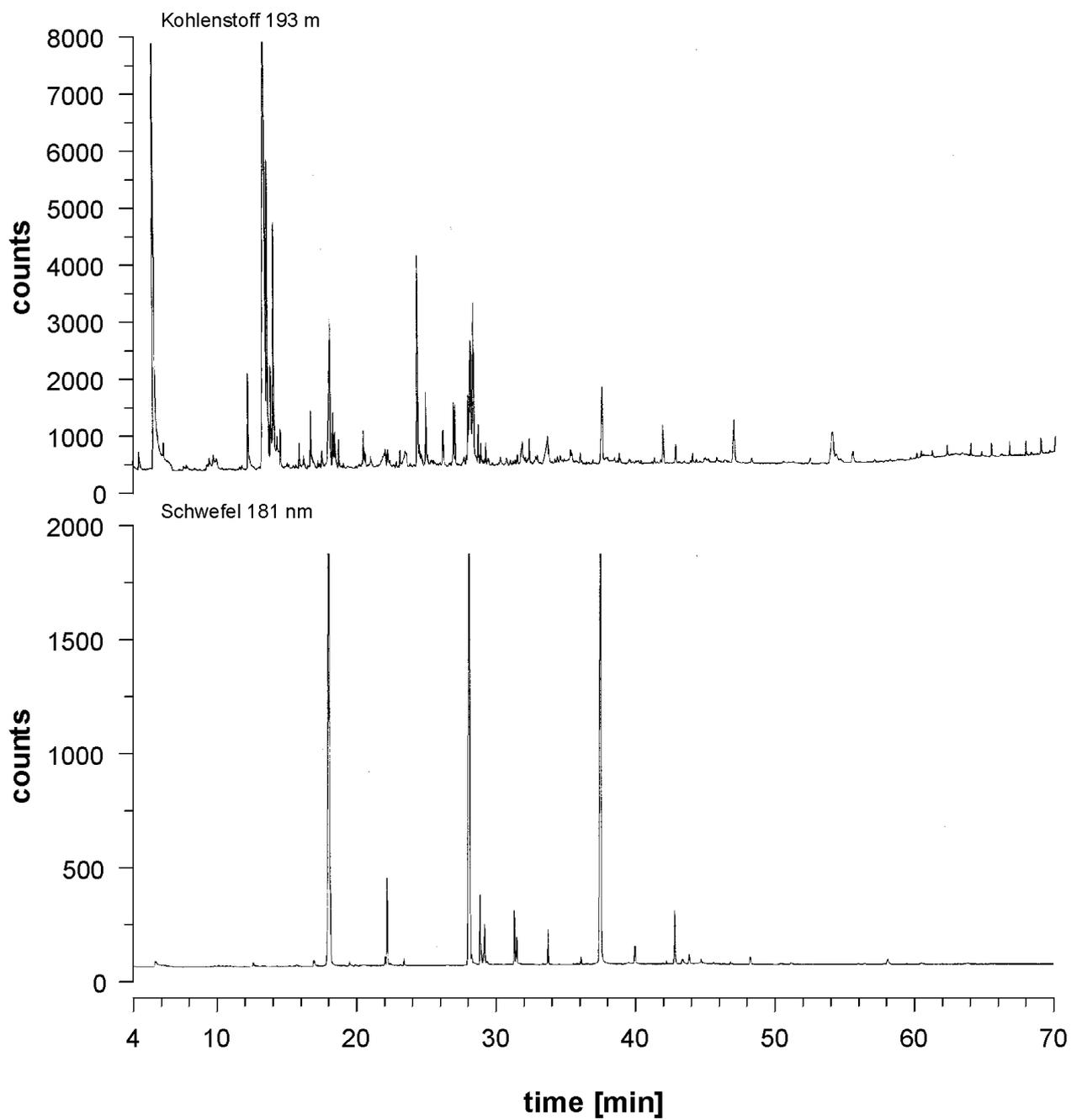


Abb 2-67 GC-AED-Chromatogramm des Aromaextraktes (Flüssig/Flüssig-Extraktion) aus frischen Shiitake

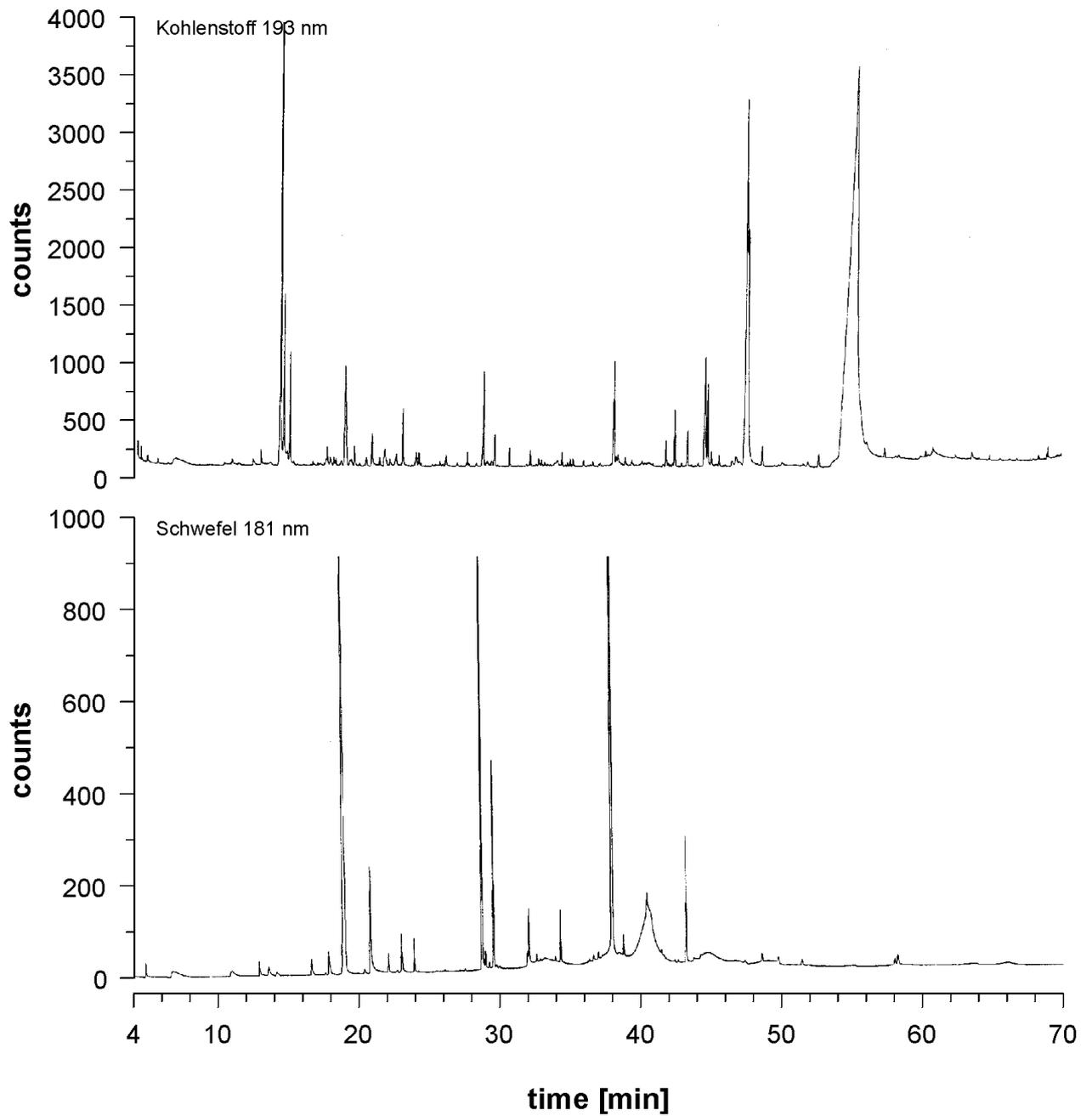
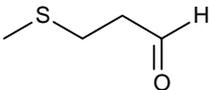
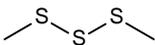
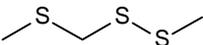
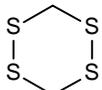
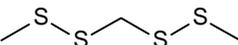
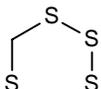
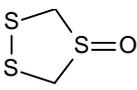
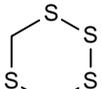
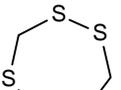
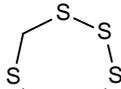
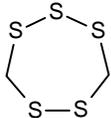
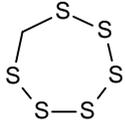
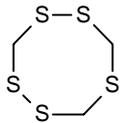
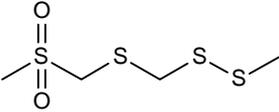
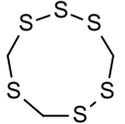
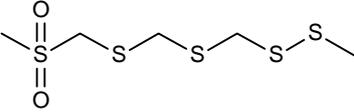


Abb 2-68 GC-AED-Chromatogramm des Aromaextraktes (Soxhlet-Extraktion) aus frischen Shiitake

Tab 2-10 Schwefelverbindungen aus dem Aromaextrakt frischer Shiitake-Fruchtkörper
 (Flüssig/Flüssig-Extraktion)

| Schwefel-Verbindung | | KI ^a (ex- perimentell) | KI (Litera- tur) | MS-Vergleich (Literatur) |
|---|---|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 3-Methylthiopropenal (1) |  | 924 | 911 ^a | [43] |
| Dimethyltrisulfid (2) |  | 970 | 950 | [42] |
| 1,2,4-Trithiolan (3) |  | 1101 | 1065 ^b [44] | [42] |
| Methyl(methylthio)- methylidisulfid (4) |  | 1142 | — | [45] |
| 1,2,3,4-Tetrathiolan* (5) |  | 1206 | — | — |
| 1,2,4,5-Tetrathian (6) |  | 1372 | 1310 ^b [44] | [42] |
| 2,3,5,6-Tetrathiaheptan (7) |  | 1379 | 1327 ^b [44] | [42] |
| 1,2,3,5-Tetrathian (8) |  | 1385 | 1338 ^b [44] | [42] |
| 4-Oxo-1,2,4-Trithiolan* (9) |  | 1396 | — | [46] |
| 1,2,3,4,5-Pentathian* (10) |  | 1460 | — | — |
| 1,2,4,6-Tetrathiepan (11) |  | 1534 | 1477 ^b [44] | [42] |
| 1,2,3,4,6-Pentathiepan* (12) |  | 1609 | — | — |

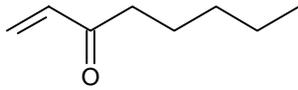
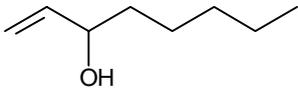
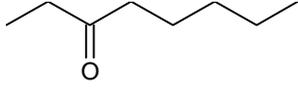
| Schwefel-Verbindung | | KI ^a (ex- perimentell) | KI (Litera- tur) | MS-Vergleich (Literatur) |
|--|---|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 1,2,3,5,6-Pentathiepan „Lenthionin“ (13) |  | 1653 | 1590 ^b [44] | {42} |
| 1,2,3,4,5,6-Hexathiepan (14) |  | 1740 | — | {47} |
| 1,2,4,5,7-Pentathiocan (15) |  | 1828 | 1749 ^b | {42} |
| 2,4,6,7-Tetrathiaoctan-2,2- dioxid* (16) |  | 1842 | — | — |
| 1,2,3,5,6,8- Hexathionan (17) |  | 2027 | 1901 ^b [44] | {42} |
| 2,3,5,7,9-Pentathiadecan- 9,9-dioxid (18) |  | 2237 | — | {50} |

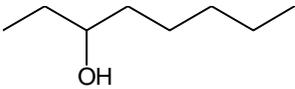
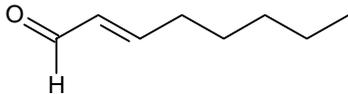
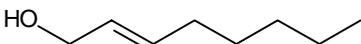
^a = Optima-5-MS

^b = OV-1

* = erstmals in Aromaextrakten von Shiitake-Fruchtkörpern identifiziert

Tab 2-11 Identifizierte C₈-Verbindungen aus dem Aromaextrakt frischer Shiitake - Fruchtkörper und Submerskultur (Flüssig/Flüssig-Extraktion) von *Lentinus edodes*

| C ₈ -Verbindung | | KI ^a (experimen- tell) | KI ^a (Litera- tur) | MS-Vergleich (Literatur) |
|----------------------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 1-Octen-3-on |  | 973 | 980 | {51} |
| 1-Octen-3-ol |  | 980 | 980 | {52} |
| 3-Octanon |  | 1002 | 989 | {52} |

| C_8 -Verbindung | | KI ^a (experimentell) | KI ^a (Literatur) | MS-Vergleich (Literatur) |
|-------------------|---|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Octan-3-ol |  | 1012 | — | {51} |
| 1-Octanol |  | 1019 | 1075 | {51} |
| 2-Octen-1-al |  | 1062 | 1060 | {51} |
| 2-Octen-1-ol |  | 1081 | 1071 | {51} |

^a = Optima-5-MS

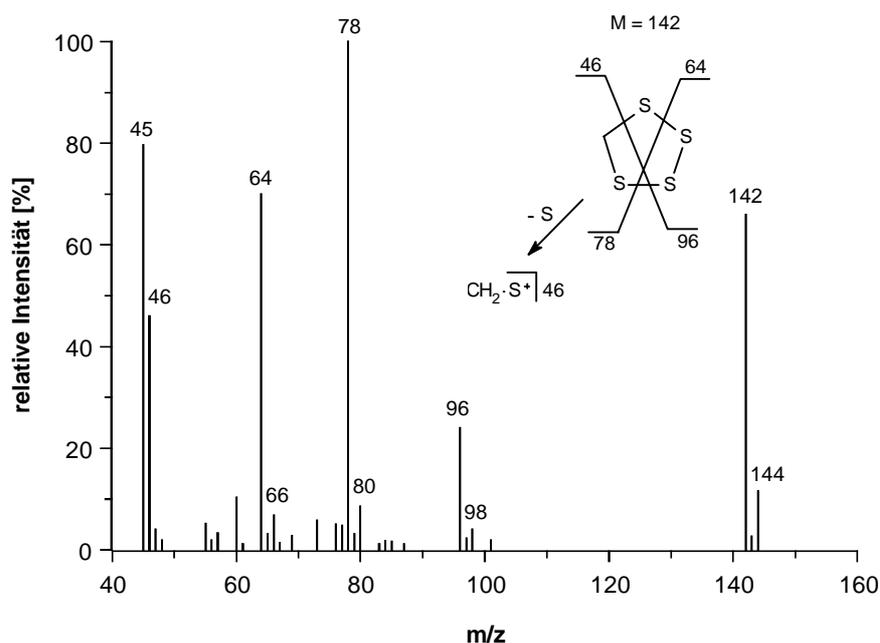


Abb 2-69 Massenspektrum von 1,2,3,4-Tetrathiolan (**5**)

Neben dem deutlichen Molekülion $m/z = 142$ ist bei den schwefelhaltigen Verbindungen das typische Isotopenmuster auffällig (Abb 2-69). Für das Molekülion konnte eine Intensitätsverteilung für $(A + 2) = 17,5\%$ ermittelt werden. Daraus ergeben sich unter Berücksichtigung einer Isotopenhäufigkeit des ³⁴S von 4,4% die Anwesenheit von 4 S-Atomen im Molekül.

Darüber hinaus konnten für $m/z = 96$ 13,9%, das entspricht S_3 und für $m/z = 78$ 8,6% (entspricht S_2) bestimmt werden. Die Isopenhäufigkeitsverteilung erklärt damit sehr gut die Fragmentierung des Moleküls.

Bei den Massenspektren von 1,2,3,4,5-Pentathian (**10**) und 1,2,3,4,6-Pentathiepan (**12**) wurden ebenfalls die Isotopenhäufigkeiten zur Interpretation herangezogen und die Fragmentierung entsprechend ausgewertet (siehe Anhang Abb 6-5 und Abb 6-6).

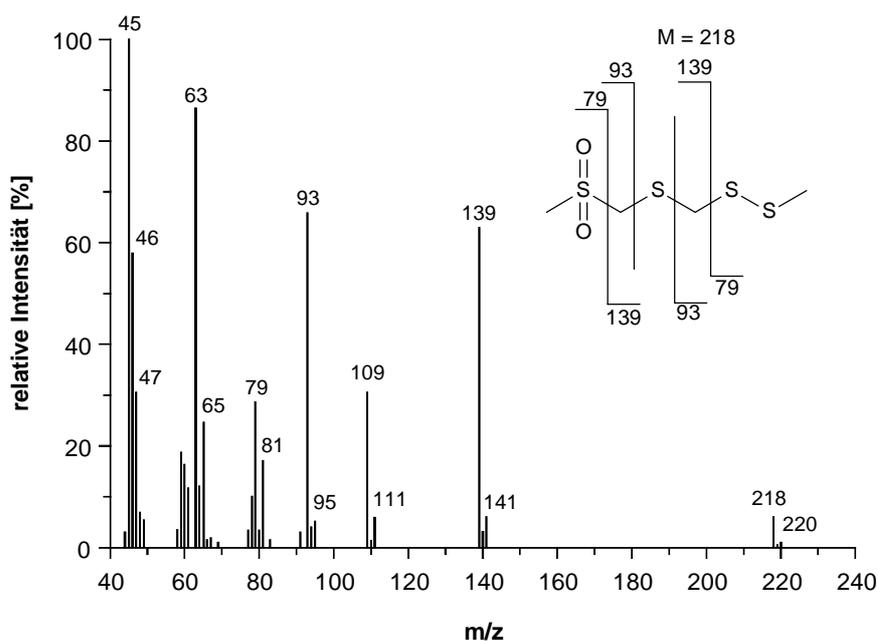


Abb 2-70 Massenspektrum von 2,4,6,7-Tetrathiaoctan-2,2-dioxid (**16**)

Die Massenspektren von (**18**) und (**16**) zeigen ähnliche Fragmentierungsmuster und unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht um $M = 46$. Dies kann einer CH_2S -Gruppe zugeordnet werden. Bei beiden Spektren zeigen sich wieder die typischen Isotopenmuster des Schwefels. Für das Molekülion $m/z = 218$ von (**16**) konnte eine Intensitätenverteilung für $(A + 2) = 18,5\%$ ermittelt werden. Daraus ergeben sich unter Berücksichtigung einer Isotopenhäufigkeit des ^{34}S von 4,4% und ^{18}O von 0,2% die Anwesenheit von 4 S-Atomen im Molekül. Entsprechendes konnte bei (**18**) für $m/z = 264$ ermittelt werden ($(A + 2) = 23,7\%$ entspricht S_5).

Die Intensitätenverteilung der S-Isotope in den Fragmentionen konnte dagegen zur Auswertung nicht mehr herangezogen werden, da sich keine einheitliche Verteilung ergab. So könnte $m/z = 139$ sowohl 3 S-Atome als auch 2 S und 2 O-Atome enthalten.

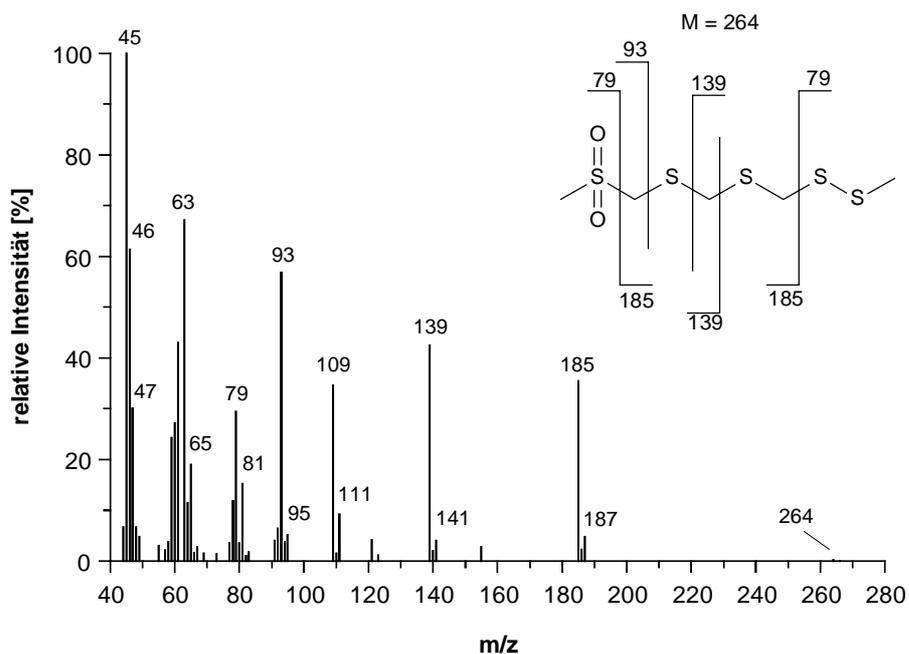


Abb 2-71 Massenspektrum von 2,3,5,7,9-Pentathiadecan-2,2-dioxid (**18**)

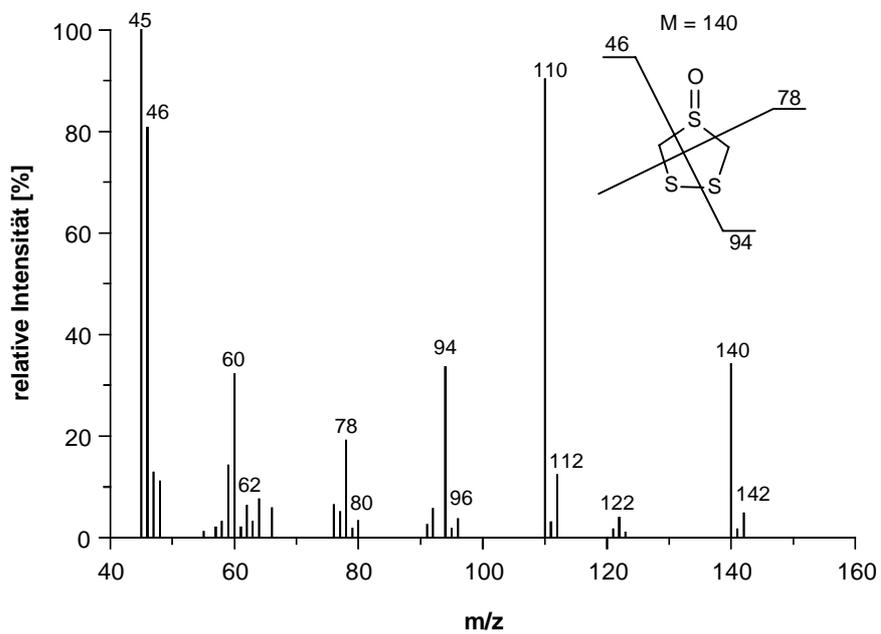


Abb 2-72 Massenspektrum von 4-Oxo-1,2,4-Trithiolan (**9**)

Zur Interpretation des Massenspektrums von **(9)** wurde aufgrund ungewöhnlicher Fragmentierungen die Isotopenhäufigkeit herangezogen.

Für das Verhältnis von Molekülion $m/z = 140$ zu $m/z = 142$ ergaben sich 3 S-Atome, die auch in Fragmention $m/z = 110$ noch vorhanden waren. Der Verlust von $m/z = 30$ kann daher nur durch das Fragment CH_2O zustande kommen.

Dies kann allerdings nur mit einer Sauerstoffwanderung zur Methylengruppe erklärt werden. Ähnliches gilt auch für $m/z = 122$, das durch den Verlust von Wasser entsteht.

2.5.3 Gewinnung des Aromaextraktes aus Submerskulturen von Weserchamp

Die Zerstörung der Zellkompartimentierung zur Freisetzung der Aromastoffe aus Submerskulturen erfolgte ähnlich wie bei der Isolierung der Lentinsäure, wobei ein enzymaktivierender Zellaufschluß vorgenommen wurde.

Aufgrund der großen Menge an aufzuschließender Biomasse wurde die eingesetzte Rührwerkskugelmühle kontinuierlich betrieben (siehe 4.7.4), wodurch gleichzeitig auch eine Separierung des Mahlhilfsmittels (Glasperlen) während des Mahlvorgangs möglich war.

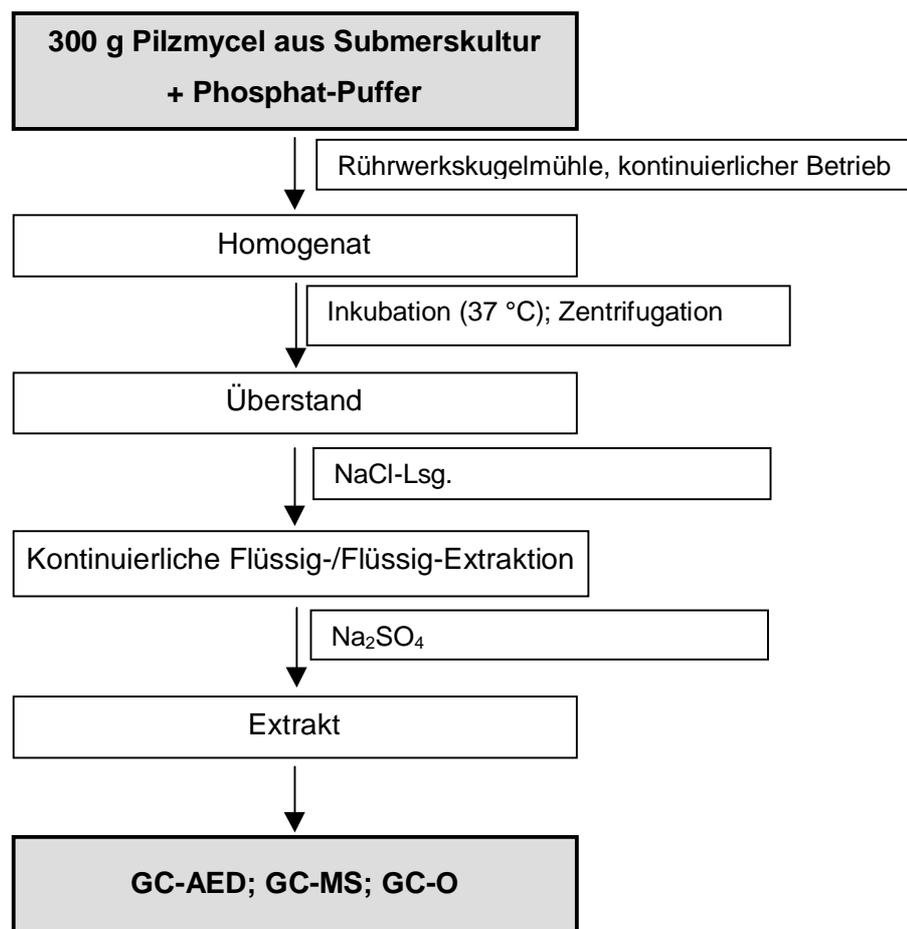


Abb 2-73 Fließschema zur Gewinnung der Aromaextrakte aus Submerskulturen von *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp

2.5.4 Untersuchung des Aromaextrakte aus Submerskulturen von Weserchamp

2.5.4.1 GC-AED und GC-MS

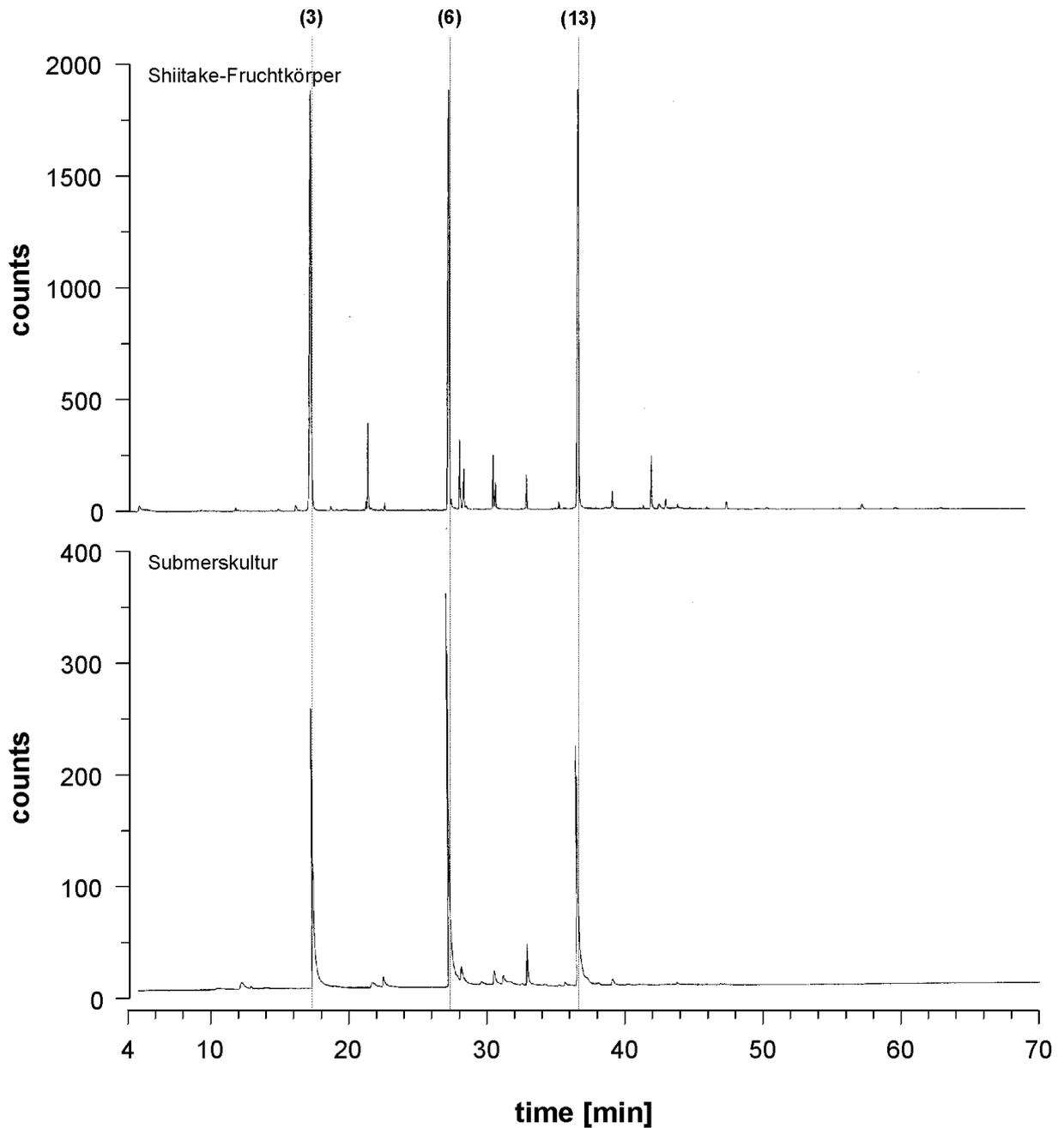


Abb 2-74 AED-Gaschromatogramm (Schwefel-Spur bei 181 nm) der Shiitake-Fruchtkörper (oben) und Submerskultur Weserchamp (unten) **(3)** = 1,2,4-Trithiolan, **(6)** = 1,2,4,5-Tetrathian, **(13)** = Lenthionin)

Der Vergleich der beiden Chromatogramme (Schwefel-Spuren) der Aromextrakte aus frischen Shiitake und der Submerskultur von Weserchamp zeigte eine gute Übereinstimmung der drei größten Peaks. Es wurden die drei Hauptkomponenten der schwefelhaltigen Aromastoffe 1,2,4-Trithiolan, 1,2,4,5-Tetrathian und Lenthionin in den aufgearbeiteten Submerskulturen von Weserchamp nachgewiesen. Obwohl keine Quantifizierung der Aromastoffe vorgenommen wurde, wurden bei etwa der gleichen Menge an aufgearbeiteter Biomasse im Aromaextrakt der Submerskultur deutlich geringere Gehalte an den schwefelhaltigen Substanzen erhalten.

2.5.4.2 Olfaktorische Eigenschaften des Aromaextraktes aus frischen Shiitake-Fruchtkörpern

Es wurden mittels GC-O die qualitativen Geruchseindrücke (durchgeführt von jeweils drei Testpersonen) des gesamten Aromaextraktes ermittelt. Die C₈-Verbindungen - und dabei insbesondere das 1-Octen-3-ol - rufen den typischen Pilz-Geruchseindruck hervor [53, 54, 55], wobei qualitative Unterschiede aufgrund der dicht aufeinanderfolgenden Substanzen und der Dominanz des 1-Octen-3-ol-Peaks nicht getroffen werden konnten. Für diesen Bereich konnte lediglich als Geruchseindruck typisch pilzig, frisch festgestellt werden, der für 1-Octen-3-ol und 3-Octanol beschrieben ist. Die olfaktorischen Eigenschaften der anderen identifizierten C₈-Verbindungen sind mit süßlich, fruchtig, phenolisch charakterisiert. 1-Octen-3-on, welches ebenfalls zum typischen Aroma frischer Pilze beiträgt, wurde in dem Aromaextrakt der Shiitake-Fruchtkörper nur in Spuren nachgewiesen.

Die Besonderheit des Aromas von *Lentinus edodes* bilden die schwefelhaltigen Aromastoffe, die in der nachfolgenden Tabelle mit ihren olfaktorischen Eindrücken aufgeführt sind.

Tab 2-12 Olfaktorische Eigenschaften der schwefelhaltigen Aromastoffe

| Substanz | KI ^a (experimentell) | Geruchsqualität |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 3-Methylthiopropenal | 924 | gekochte Kartoffeln |
| Dimethyltrisulfid | 970 | schwefelig, röstig |
| 1,2,4-Trithiolan | 1101 | metallisch-schweflig, zwiebelig |
| Methyl(methylthio)methylsulfid | 1142 | schweflig |
| 1,2,3,4-Tetrathiolan | 1206 | Shiitake, stechend |

| Substanz | KI^a (experimentell) | Geruchsqualität |
|-------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1,2,4,5-Tetrathian | 1372 | Shiitake, Rettich, nussig, schweflig |
| 2,3,5,6-Tetrathiepan | 1379 | frischer Knoblauch |
| 1,2,3,5-Tetrathian | 1385 | Shiitake, schweflig, beißend |
| 4-Oxo-1,2,4-Trithiolan | 1396 | Knoblauch |
| 1,2,3,4,5-Pentathian | 1460 | Knoblauch |
| 1,2,4,6-Tetrathiepan | 1534 | Shiitake |
| 1,2,3,4,6-Pentathiepan | 1609 | Shiitake, Knoblauch |
| Lenthionin | 1653 | Shiitake, Rettich, Knoblauch |
| 1,2,3,4,5,6-Hexathiepan | 1740 | Shiitake, schweflig |

^a = Optima-5-MS

Mit Ausnahme des 3-Methylthiopropans, das einen typischen Geruch nach gekochten Kartoffeln aufweist, wurden allen anderen schwefelhaltigen Substanzen Geruchseindrücke zugesprochen, die dem Aroma des Shiitake entsprachen. Die nicht-cyclischen Polysulfide zeigten dabei eher einen reinen schwefligen Geruch, während bei den cyclischen Polysulfiden die Aromanoten nach Knoblauch/Rettich überwogen und beim Absniffen der Aromaeextrakte als typisches Shiitake-Aroma beschrieben wurden. Neben dem Lenthionin, das als „character impact compound“ für das Aroma des Shiitake gilt, wurden auch zahlreiche andere Verbindungen detektiert, auf die das Attribut „typisches Shiitake-Aroma“ zutraf.

3 Diskussion

3.1 Biotechnologischer Einsatz von Basidiomyceten

Die Klasse der hoch entwickelten Pilze, zu denen auch der Basidiomycet *Lentinus edodes* gehört, umfaßt etwa 2000 eßbare Arten, von denen etwa 22 kommerziell kultiviert werden. In der Natur sind es entweder bodenbewohnende Pilze oder sie wachsen auf Holz und unterscheiden sich damit nicht nur in ihren Anforderungen an die Umwelt sondern auch bzgl. ihrer Nährstoffe. Neben den in Tab 3-1 aufgeführten Arten gibt es andere beliebte Speisepilze, die sich einer Pilzkultur bis heute entziehen, da es sich um obligate Mykorrhizapilze handelt. Dazu gehören *Boletus edulis* (Steinpilz), *Cantharellus cibarius* (Pfifferling) und die zu den Ascomyceten zählenden Trüffel-Arten (*Tuber melanosporum*, *Cheiromyces maeandriiformis*).

Tab 3-1 Produktion kommerziell kultivierter Speisepilze [56]

| Organismus | Trivialname | Jahres- produktion* | Anteil an der Welt- produktion [%] |
|--------------------------------|------------------|------------------------|---------------------------------------|
| <i>Agaricus bisporus</i> | Champignon | 1.590 | 37,2 |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Austernseitling | 917 | 21,5 |
| <i>Lentinus edodes</i> | Shii-Take | 526 | 12,3 |
| <i>Vovariella volvacea</i> | Reisstrohpilz | 253 | 5,9 |
| <i>Kuehneromyces mutabilis</i> | Stockschwämmchen | k. A. | k. A. |

* Frischgewicht in 1000 t

k.A. = keine Angaben

Der Shiitake wird nach dem Champignon und dem Austernseitling am häufigsten angebaut und hat damit eine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung. Obwohl ein Anbau in Japan und China schon seit mehr als 300 Jahren erfolgt, wurden die ersten Kultivierungsversuche in Deutschland erst Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt, und eine industrielle Nutzung findet erst seit etwa 30 Jahren statt.

In den westlichen Ländern erfolgt der Anbau meistens auf Schüttsubstraten statt einer traditionellen Kultivierung auf Holzstämmen. Der gravierendste Unterschied in dieser Form des Anbaus liegt in einem verkürzten Anbauzyklus, der nach 6-8 Monaten - statt 15-18 Monate wie beim traditionellen Anbau - beendet ist und eine größere Ertragsausbeute infolge gezielterer Nährstoffzufuhr erreicht [12].

3.2 Optimierung physikalischer Parameter und der Nährmedienzusammensetzung

Die Stoffwechselregulation erfordert eine Abstimmung des anabolen und katabolen Metabolismus im Bereich des Primär- und Sekundärstoffwechsels. Es ergeben sich komplexe Vernetzungen an den Schnittstellen zwischen den meist universalen Primärmetabolismustwegen, die den Bau- und Energiestoffwechsel umfassen sowie den Syntheseleistungen des Sekundärstoffwechsels, die in Folge von Differenzierungs- oder Deregulierungsprozessen ablaufen.

Die Komplexität dieses Regulationsapparates gestaltet die Optimierung von biologischen Systemen schwierig und bedingt häufig eine empirischen Vorgehensweise, da Kenntnisse der genauen Einflußgrößen nicht vorhanden sind.

Wichtige Kulturparameter, die bei biotechnischen Prozessen optimiert werden können, sind physikalische Größen (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffversorgung, Energieeintrag durch Agitation), Art und Konzentration der Nährmedienbestandteile (C-Quelle, N-Quelle, Mineralstoffe und Spurenelemente) sowie spezifischere Parameter wie Vitamin- und Effektorzusätze.

Für die in dieser Arbeit untersuchten Stämme von *Lentinus edodes* sollte zunächst eine Untersuchung bzgl. der Umgebungs- und Nährstoffansprüche erfolgen, die zum Ziel hatte, für weitere Untersuchungen ausreichend Biomasse produzieren zu können. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Einflußgrößen, die sich auf die Bildung von Biomasse und die Wachstumsgeschwindigkeit auswirken, wurde zunächst empirisch vorgegangen.

Wie BÖKER zeigen konnte, ist der Einfluß der Agitation auf die Trockenmassegehalte nur gering, so daß dieser Parameter bei den Untersuchungen unberücksichtigt blieb [57]. Der Einfluß des pH-Wertes des Nährmediums wurde ebenfalls nicht weiter untersucht, da nach TOKIMOTO *Lentinus edodes* im Bereich von pH 3 bis 6 keine Unterschiede im Wachstum zeigt [58]. Die pH-Werte der eingesetzten Medien lagen alle in diesem Bereich. Darüber hinaus wurde der pH-Wert des Mediums durch die Produktion von organischen Säuren durch den Pilz innerhalb von wenigen Tagen abgesenkt.

3.2.1 Temperatur

Pilze zeigen sehr unterschiedliche Temperaturoptima des Wachstums, die durch die Anpassungen an die entsprechenden Temperaturbereiche ihres Lebensraumes festgelegt sind. Die Thermostabilität und Temperaturoptima von Enzymen spielt dabei eine entscheidende Rolle, da Stoffwechselprozesse auch durch den Temperaturbereich beeinflusst werden. Bei niedrigen Temperaturen findet eine zunehmende Verlangsamung von Transportmechanismen und chemischen Reaktionen statt, während es bei zu hohen Temperaturen zur De-naturierung von Proteinen kommt. Ähnlich wie bei den Bakterien, bei denen eine Einteilung der Organismen nach ihren Temperaturoptima des Wachstums in psychrophil, mesophil, thermotolerant, thermophil und extrem thermophil erfolgt, lassen sich auch die Pilze in ein solches Schema einordnen [59].

Die Heimat von *Lentinus edodes* erstreckt sich über ganz Ostasien, vornehmlich Japan und China. Man findet ihn aber auch in den Bergregionen Indonesiens, auf den Philippinen, Taiwan, Nepal, Korea, Burma, Nordborneo, Pakistan und Papua-Neuguinea. Er wächst in den aufgeführten Ländern in höheren Lagen, deren Klima als subtropisch bis gemäßigt beschrieben wird. Dagegen wirken sich kalte oder tropische Regionen Ostasiens klimatisch ungünstig aus [12]. Die Pilze der Subtropen und der gemäßigten Breiten erreichen ihr Wachstumsoptimum in der Regel zwischen 20 und 40 °C und werden daher als mesophil bezeichnet.

Für *Lentinus edodes* liegt das Temperaturoptimum für das Wachstum des Pilzmycels bei etwa 25 °C. Unterhalb von 5 °C und oberhalb von 35 °C kommt das Mycelwachstum zum Erliegen [58]. Es wurde festgestellt, daß ein Überleben des Pilzmycels noch bei – 30 °C möglich ist, wenn es in einem geeigneten Substrat eingebettet ist, während beim Überschreiten von Temperaturen von 45 °C das Mycel abgetötet wird [60].

Für die Untersuchungen über die Bildung von Biomasse wurden Temperaturen gewählt, die sowohl im Bereich des Temperaturoptimums als auch in einem Bereich lagen, der häufig für die Kultivierung von Basidiomyceten gewählt wird.

Beide Stämme zeigten bei 24 °C ein besseres Wachstum als bei 27 °C, das sich bei Weserchamp über den gesamten Kulturverlauf erstreckte, während sich die Ergebnisse bei A 20-5 uneinheitlicher gestalteten. Das könnte auf die sehr unterschiedlichen Anfangs-trockenmassegehalte zurückgeführt werden. Damit konnte zumindest für Weserchamp das Wachstumsoptimum auf 24 °C festgelegt werden. Es stimmt darin gut mit dem von TOKIMOTO beschriebenen Temperaturoptimum überein [58].

3.2.2 Sauerstoffversorgung

Eine unmittelbare Messung des Sauerstoffeintrags in das Medium bei der Kultivierung in Erlenmeyerkolben wurde nicht durchgeführt. Da die meisten Pilze obligate Aerobier sind, kann dieser Parameter entscheidenden Einfluß auf das Wachstum ausüben. So wurde beobachtet, daß für das Wachstum ein höherer Sauerstoffbedarf erforderlich war als für die Sporulation [61]. Dennoch sind die Möglichkeiten, eine bessere Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, bei einer Kultivierung im Erlenmeyerkolben gering. Die Einführung von Schikanen im Kulturgefäß sollte durch die stärkere Agitation des Mediums den Sauerstoffeintrag verbessern. Bei dieser Kultivierungsmethode konnte bei den untersuchten Stämmen Weserchamp und A 20-5 keine Steigerung des Wachstums erreicht werden. Dies läßt zwei Schlußfolgerungen zu:

Zum einen bewirken die Schikanen keine signifikante Steigerung des Sauerstofflevels im Nährmedium und zum anderen könnte die Sauerstoffversorgung in den Erlenmeyerkolben ohne Schikanen ausreichend sein und damit die evtl. zusätzliche Versorgung vom Pilz nicht genutzt werden.

Da ein Teil der Biomasse als Luftmycel an den Wandungen des Kulturgefäßes festwuchs, fand außerdem keine „reine Submerskultivierung“ mehr statt.

3.2.3 Medienzubereitung

Die durch die Anwesenheit von reduzierendem Zucker und verschiedenen Aminverbindungen beim Autoklavieren ablaufende Maillard-Reaktion und die daraus resultierenden Produkte, können einen Einfluß auf das Wachstum von Mikroorganismen ausüben. So wurde neben nicht erkennbaren Effekten sowohl eine Stimulation als auch eine Inhibierung auf das Wachstum bei Pilzen beobachtet. Für *Lentinus edodes* konnten bei der Untersuchung verschiedener Stämme keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden. Bei einem Teil der eingesetzten Stämme wurde eine Wachstumsverbesserung beobachtet, während die anderen Stämme keinen Effekt durch Maillard-Produkte zeigten [62].

Eine Unterdrückung der Maillard-Reaktion kann bei der Nährmedienzubereitung durch ein getrenntes Autoklavieren von C- und N-Quelle oder durch eine Sterilfiltration des kompletten Mediums erreicht werden.

Bei den untersuchten Stämmen Weserchamp und A 20-5 zeigte sich ein leicht positiver Effekt auf das Wachstum, wenn das Medium komplett sterilfiltriert wurde, aber ein leicht negativer Effekt bei Anwesenheit von Maillard-Produkten. Hier scheint das Fehlen von Maillard-Produkten das Wachstum zu begünstigen, so daß bei der Maillard-Reaktion offensichtlich nicht nur stimulierende Substanzen, sondern auch Verbindungen entstehen, die für die Pilze zelltoxisch sein können.

3.2.4 C-Quelle

3.2.4.1 Heterotrophe Ernährung bei Pilzen

Pilze gehören zu der Gruppe von heterotrophen Organismen, die darauf angewiesen sind, organische Substanzen als Energie- und Baustoffquelle zu nutzen. Dabei haben sie ganz unterschiedliche Lebensweisen entwickelt bzw. Lebensräume besiedelt, in denen sie sich die Quellen organischen Materials erschließen können. Bei den Saprobionten, zu denen auch *Lentinus edodes* gehört, ernährt sich der Pilz durch Zersetzung von toter organischer Materie. Im Gegensatz dazu ernähren sich Parasiten und Symbionten von organischen Substanzen lebender Organismen. Bei Parasiten kommt es dabei zu einer Schädigung des Wirtes, dagegen lebt der Symbiont in wechselseitigem Nutzen mit seinem Wirt [63].

Bei der Verwendung von Nährmedien für Laborversuche dominieren diejenigen, die auf Glucose als Kohlenstoffquelle basieren. Damit wird der heterotrophen Lebensweise der Pilze entsprochen und der Tatsache, daß fast alle Pilze in der Lage sind, Glucose abzubauen, da nahezu allen die Glycolyse als Einstieg in den katabolen Energiestoffwechsel gemeinsam ist. Neben dieser geradezu universellen Einsatzmöglichkeit der Glucose sind die Pilze aufgrund ihrer unterschiedlichen Lebensweisen und –räume in der Lage, auch andere Kohlenhydrate zu nutzen, die von Einfachzuckern über Zuckersäuren und –alkoholen bis hin zu Di-, Oligo- aber auch Polysacchariden reichen. Ob eine Metabolisierung möglich ist, hängt von verschiedenen physiologischen Faktoren ab:

1. Effektivität und Selektivität eines Carriersystems zum Transport über die Plasmamembran
2. Enzymausstattung zur Spaltung von Polysacchariden in kleinere membrangängige Einheiten und zur Verstoffwechslung der daraus gebildeten Kohlenhydrate

3.2.4.2 Variation der C-Quelle

Das Wachstum hängt, wie oben schon erwähnt, nicht nur generell von der Anwesenheit einer Kohlenstoffquelle im Medium ab, sondern auch von der Spezialisierung des Pilzes, andere Kohlenhydrate als Glucose oder auch nicht-kohlenhydrathaltige Kohlenstoffquellen besser nutzen zu können.

Die Bildung von Biomasse in Submerskulturen der Stämme Weserchamp und A 20-5 von *Lentinus edodes* wurde mit zwei weiteren Kohlenhydraten (Maltose und Stärke) und Ethanol als nicht-kohlenhydrathaltiger Kohlenstoffquelle untersucht. Nach TOKIMOTO soll *Lentinus edodes* neben Glucose bei zufriedenstellendem Wachstum auch Oligo- und Polysaccharide als Kohlenstoffquelle nutzen können [58]. Ähnliche Untersuchungen von SUGIMORI ergaben in Übereinstimmung mit TOKIMOTO für *Lentinus edodes* die Fähigkeit, nicht-kohlenhydrathaltige Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Glycerol zu nutzen und dabei ein gutes Wachstum zu zeigen [17].

Für Maltose und auch Stärke ist zunächst eine hydrolytische Spaltung nötig, um in den Metabolismus eingeschleust zu werden. Die Hydrolyse kann für Maltose mit einer α -Glucosidase und für Stärke mit einer Amylase erreicht werden. Das schlechte Wachstum von Weserchamp und A 20-5 in Nährmedien mit Maltose bzw. Stärke läßt vermuten, daß diese Enzyme vom Pilz nur unzureichend oder gar nicht gebildet werden. Da *Lentinus edodes* nicht auf das Wachstum auf stärkereichen Substraten wie z.B. Getreidesamen spezialisiert ist, ist er auf die entsprechenden Enzymaktivitäten nicht angewiesen. Trotzdem fand ein leichtes Wachstum der Stämme vor allem im Medium mit Stärke statt. Dies könnte an einer teilweisen Hydrolyse während des Autoklavierens liegen, bzw. an Rest-Glucosegehalten, die beim Inoculieren ins Medium eingetragen wurden.

Wenn nicht-kohlenhydrathaltige Substanzen als alleinige Kohlenstoffquellen dienen, müssen sie durch die Gluconeogenese in Glucose umgewandelt werden können, da Glucose unter anderem zum Aufbau von Zellwänden und Glykoproteinen verwendet wird. Die Fähigkeit zu Gluconeogenese wurde bei einigen Pilzen nachgewiesen, die in der Lage sind, nicht-kohlenhydrathaltige Substanzen als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen und die notwendigen Polysaccharide zum Zellwandaufbau zu synthetisieren.

Die beiden untersuchten Stämme waren nicht in der Lage, Ethanol als einzige Kohlenstoffquelle des Mediums zu nutzen, so daß kein Wachstum zu beobachten war. SUGIMORI et. al. [64] haben bei Untersuchungen gezeigt, daß *Lentinus edodes* in der Lage ist, bei einer Konzentration von 2 Vol% Ethanol im Medium Trockenmassegehalte von $10,5 \text{ g L}^{-1}$ zu erreichen. Die Diskrepanz in den Ergebnissen könnte mit der unterschiedlichen Zusammensetzung des restlichen Mediums zusammenhängen.

Bei SUGIMORI wurde als Stickstoffquelle Hefeextrakt eingesetzt, der aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung auch Kohlenhydrate beinhaltet, die neben Ethanol als C-Quelle verwertet werden könnten. Dagegen wurde im hier untersuchten Medium lediglich Glutamin als Stickstoffquelle zur Verfügung gestellt.

3.2.5 N-Quelle

Zum Aufbau wichtiger zellulärer Bausteine wie Aminosäuren und Proteine, Purine, Pyrimidine und Nukleinsäuren sowie Glucosamine, Chitin und verschiedene Vitamine, ist eine Stickstoffquelle für Pilze unentbehrlich. Daher ist für das Wachstum der Pilze die Anwesenheit einer N-Quelle im Nährmedium in gelöster Form essentiell, da Pilze nicht in der Lage sind, den Luftstickstoff zu assimilieren. Im Gegensatz zu dem fast universellen Einsatz von Glucose als C-Quelle, wird eine große Bandbreite an Stickstoffverbindungen als N-Quelle verwendet. Dies ist auf die Fähigkeit der Pilze zurückzuführen, in gleichem Maße sowohl einfache anorganische als auch organische Stickstoffverbindungen nutzen zu können. Von Nitraten und Nitriten über Ammoniumsalze zu einzelnen Aminosäuren bis hin zu komplexen Stickstoffquellen wie Peptonen werden alle Formen der Stickstoffversorgung genutzt. Gutes Wachstum wurde bei *Lentinus edodes* in Medien mit Peptonen, bestimmten Aminosäuren und verschiedenen Ammoniumsalzen erzielt, wobei sich Nitrat und Nitrit als ungeeignet erwiesen [58, 65].

Ebenfalls häufig eingesetzte Stickstoffquellen waren Hefeextrakt und Asparagin, die auch in den eigenen Untersuchungen zunächst als Stickstoffquellen in den Standardmedien (siehe 4.4.2.1 und 4.4.2.2) eingesetzt wurden. Darüber hinaus wurde der Einfluß verschiedener anderer Stickstoffquellen auf die Bildung von Biomasse untersucht. Mit Ausnahme von Nitrat und Nitrit wurde versucht, die gesamte Bandbreite an möglichen N-Quellen abzudecken.

1. Ammoniumsulfat als anorganische Stickstoffquelle
2. Glutamin, Asparagin jeweils als einzelne Aminosäuren
3. Universalpepton, Sojapepton, Hefeextrakt und Malzextrakt als komplexe N-Quellen

Eine Vielzahl von Pilzen kann Ammoniumsalze als einzige Stickstoffquelle nutzen, wobei das Ammonium-Ion neben dem Effekt auf das Wachstum auch als Regulator für verschiedene Entwicklungs- sowie Transportsysteme für Aminosäuren von Bedeutung ist.

Ammoniumsulfat erwies sich als einzige Stickstoffquelle im Medium als völlig ungeeignet, da beide untersuchten Stämme von *Lentinus edodes* kein Wachstum zeigten.

Über die Ursachen können nur Spekulationen angestellt werden, da es schon bei der Aufnahme von Ammonium ins Innere der Zelle keine eindeutigen Ergebnisse gibt [66]. Bei den meisten Pilzen wird für die Aufnahme von Ammonium ein aktiver Transportmechanismus vermutet. Darüber hinaus gehört *Lentinus edodes* als Weißfäulepilz zu einer Gruppe von hochentwickelten Pilzen, die sich aufgrund ihres Lebensraumes auf die Nutzung sehr komplexer Substrate spezialisiert haben, so daß evtl. die Fähigkeit zur Nutzung einfacher anorganischer N-Quellen nicht mehr vorhanden ist, oder sich in der Kürze der Kultivierungsdauer nicht adaptieren konnte.

Die meisten Pilze sind in der Lage, alle benötigten Aminosäuren selbst zu synthetisieren, so daß eine Supplementierung mit speziellen Aminosäuren nicht nötig wäre. Sie können aber als N-Quelle genutzt werden, wobei sie unterschiedlich gut verwertet werden. Auch hier spielen Transportmechanismen eine entscheidende Rolle für die Aufnahme und Metabolisierung der Aminosäuren, wobei praktisch nur ein einseitig gerichteter Substratfluß ins Innere der Zelle existiert.

In eukaryotischen Mikroorganismen bestehen in der Regel zwei verschiedene Transportmechanismen für Aminosäuren [67]:

1. Transportsystem spezifisch für eine bzw. eine Gruppe strukturell verwandter Aminosäuren
2. generelles Transportsystem, das von einer großen Anzahl von Aminosäuren genutzt werden kann

In den Medien, in denen Glutamin als Aminosäure zugesetzt war, zeigte sich bei beiden untersuchten Stämmen ein besseres Wachstum als bei einem Zusatz von Asparagin, wobei die erzielten Trockenmassen bei Anwesenheit einer komplexen Stickstoffquelle deutlich höher lagen. Offensichtlich kann Glutamin besser aufgenommen und verwertet werden als Asparagin, was für unterschiedliche Transportmechanismen spricht, die mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten oder Effektivitäten arbeiten. Dennoch konnte bei Anwesenheit nur einer Aminosäure im Nährmedium ausnahmslos ein Wachstum beobachtet werden, was die Fähigkeit zur Synthese aller anderen Aminosäuren voraussetzt.

Die Wirkung der komplexen N-Quellen, die insgesamt bei Anwesenheit im Nährmedium zu einem verbesserten Wachstum führten, kann nur schwer beurteilt werden.

Eine Beschränkung der Substratfunktion auf die Wirkung als N-Quelle ist kaum möglich, da sie neben den stickstoffhaltigen Substanzen (Peptide, Aminosäuren) auch Kohlenhydrate, Vitamine und Spurenelemente enthalten, die alle Einfluß auf die Wachstumseigenschaften nehmen können. Warum trotz der Anwesenheit der komplexen N-Quellen die Bildung von Biomasse bei den beiden untersuchten Stämmen *Weserchamp* und *A 20-5* kaum mehr als 3 g L^{-1} an Trockenmasse betrug, bleibt dabei unklar.

3.2.6 Definiertes Nährmedium nach LEATHAM

Offensichtlich konnten die Nährstoffansprüche der beiden untersuchten Stämme *Weserchamp* und *A 20-5* von *Lentinus edodes* durch Änderung physikalischer Parameter und Variation von C- und N-Quelle der Standardnährmedien (SNL-H und SNL-B₁) nicht zufriedenstellend ermittelt werden, so daß bei der Submerskultivierung kein gutes Wachstum mit entsprechend hoher Biomassebildung erzielt werden konnte.

Bei der empirischen Vorgehensweise zur Ermittlung von Nährstoffansprüchen und damit gezielten Wachstumsoptimierung, wurde ein in der Literatur [20] beschriebenes definiertes Nährmedium untersucht. Da hier mit beiden Stämmen vor allem aber mit *Weserchamp* das bisher beste Wachstum erzielt werden konnte, soll auf einzelne Medienbestandteile, die auch die Grundlage weiterer Optimierungsversuche mit Hilfe statistischer Versuchspläne bildeten, eingegangen werden (siehe 2.2).

3.2.6.1 Glucuronsäure, Gluconsäure, Galakturonsäure, Pektin

Die Zellwand von Pilzen als Abgrenzung zur Umwelt hat eine Reihe von Funktionen, die sie zum wichtigen Bestandteil der Zelle macht. Sie agiert als strukturgebende Barriere und bewahrt damit die zelluläre Form. Weiterhin schützt sie den Protoplasten vor unkontrolliertem Wassereintritt aus der meistens hypotonischen Umgebung. Die Zellwand enthält eine Reihe von Enzymen, die sowohl am Zellwandaufbau beteiligt sind als auch den Aufschluß komplexer Nährstoffe ermöglichen. Verschiedene Zellwandbestandteile dienen als Speicherstoffe, die angereichert und durch entsprechende Enzyme abgebaut und damit wieder verfügbar gemacht werden.

Die chemische Zusammensetzung der Zellwand variiert bei den einzelnen Pilzgruppen. Sie besteht zu 80-90% aus Polysacchariden, die das Gerüstmaterial liefern. Darin eingebettet sind ebenfalls Polysaccharide, Proteine sowie Lipide, die nur einen geringen Anteil von 10-20% ausmachen.

Die Gerüstsubstanz, die in Form von mikrokristallinen Fibrillen vorliegt, besteht bei den Basidiomyceten aus β -verknüpften Polysacchariden, von denen das Chitin (N-Acetylglucosamin) und β -Glucane den Hauptanteil ausmachen. Daneben finden sich auch saure Polysaccharide, die hauptsächlich aus Glucuronsäureeinheiten und anderen Zuckermolekülen aufgebaut sind. Sie wurden als Hauptkomponenten der Zygomyceten, als exozelluläre Absonderungen und in Fruchtkörpern von Basidiomyceten nachgewiesen [68]. Das ebenfalls in den Zellwänden vorhandene Chitosan, das durch Desacetylierung von Chitin entsteht, kann als Kation an das Glucuronat-Anion des Polysaccharids binden. Das daraus entstehende Salz steuert einen wichtigen Beitrag zu Wechselwirkungen zwischen den Zellwandbestandteilen bei.

In *Lentinus edodes* wurden neben den strukturgebenden Polysacchariden Chitin, Chitosan und β -Glucane mit heterogener Struktur, Pektin sowie saure Polysaccharide und sog. Polyuronide nachgewiesen [9, 69].

Die Biosynthese von Polysacchariden erfordert zunächst eine Aktivierung des Monomers in Form von Zuckernucleotiden (siehe Abb 3-1). Die Galakturonsäure kann ebenfalls als UDP-Galakturonsäure aktiviert werden oder durch 4'-Epimerisierung aus UDP-Glucuronat entstehen. Die aktivierten Produkte können anschließend zu Polysacchariden polymerisieren, wobei durch Reaktionen mit Aglykonen auch Polyuronide entstehen können [70].

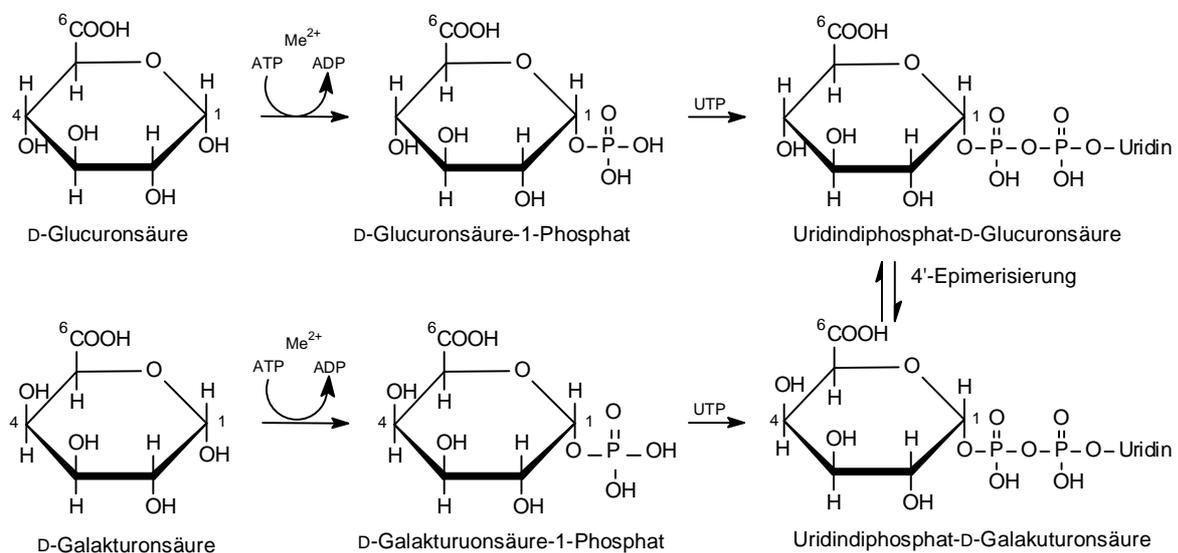


Abb 3-1 Aktivierung von D-Glucuronsäure und D-Galakturonsäure [71]

Der positive Effekt, den die Uronsäuren auf das Wachstum der beiden untersuchten Stämme Weserchamp und A 20-5 von *Lentinus edodes* ausübten, könnte mit ihrer Funktion als Baustein von Polysacchariden und damit auch für den Zellwandaufbau zusammenhängen. Der Aufbau der Zellwandpolymere, die Uronsäureeinheiten tragen, kann auch von Glucose ausgehen, wobei zunächst eine Umwandlung in die entsprechenden Säuren erfolgen muß. In eigenen Untersuchungen wurde ebenfalls gezeigt, daß ein geringeres Wachstum bei alleiniger Anwesenheit von Glucose im Nährmedium erzielt werden konnte, das für eine Bevorzugung der Uronsäuren spricht.

Pektin, das allein und vor allem in Kombination mit monomerer Galakturonsäure ebenfalls für einen positiven Effekt auf das Wachstum sorgte, muß zunächst abgebaut werden, um als Uronsäurequelle verwertet werden zu können. Dazu sind für die Spaltung der glykosidischen Bindungen Polygalakturonasen erforderlich, die in *Lentinus edodes* nachgewiesen wurden [5].

Über die Bedeutung der Gluconsäure, die ebenfalls einen positiven Einfluß auf das Wachstum von *Lentinus edodes* bewirkte, kann nur spekuliert werden. Gluconsäure, die zu der Gruppe der Aldonsäuren gehört, kann in aktivierter Form als Gluconsäure-6-Phosphat eine wichtige Funktion im Primärstoffwechsel einnehmen. Ein direkter Zusammenhang bei der Synthese von Zellwandpolymeren besteht hier nur insofern, als daß Gluconsäure-6-Phosphat zum Aufbau von Glycoproteinen verwendet wird, die in der Zellwand eingelagert sind und dort verschiedene Aufgaben erfüllen [70].

3.2.7 Anorganische Substanzen mit Ausnahme von Schwefel

Aufgrund der für ein spezifisches anorganisches Element benötigten Menge, die für eine optimale Stoffwechselaktivität sorgt, wird eine Einteilung in Makro- und Mikroelemente vorgenommen.

Tab 3-2 Essentielle Mineralstoffe und Spurenelemente [72]

| Funktion | |
|-----------------------------|--|
| <u>Makroelemente</u> | |
| Magnesium | Enzymaktivierung, ATP-Metabolismus |
| Phosphor | Nukleinsäuren, Membranlipide, intermediärer Stoffwechsel |

| | Funktion |
|-----------------------------|---|
| Kalium | Ionengleichgewicht, Kohlenhydratstoffwechsel, Enzymaktivierung |
| Schwefel | Aminosäuren, Proteine, Vitamine |
| <u>Mikroelemente</u> | |
| Calcium | Cofaktor von Enzymen, Membranstruktur |
| Kupfer | Enzymaktivität, Laccase |
| Eisen | Cytochrome, andere häm-haltige Enzyme |
| Mangan | Mn-abhängige Peroxidasen, Cofaktor verschiedener Enzyme, Citratzyklus, Nukleinsäuresynthese |
| Zink | Enzymaktivität, Stoffwechsel von organischen Säuren |
| Molybdän | Nitratmetabolismus, Enzymaktivität |
| Kobalt | Vitamin B ₁₂ |
| Nickel | Harnstoffmetabolismus |

3.2.7.1 Mangan

Aufgrund der ähnlichen Funktionen, die Magnesium und Mangan im Stoffwechsel übernehmen, ist ein spezifischer Nachweis für Mangan als Nährstoff schwierig. Mn^{2+} bindet an ATP und kann als Kation am Transfer von Phosphatgruppen beteiligt sein. Darüber hinaus werden verschiedene andere Enzyme durch Mn^{2+} aktiviert.

Bei den Weißfäulepilzen, zu denen auch *Lentinus edodes* gehört, findet sich eine manganabhängige Peroxidase (MnP), die im Ligninabbau eine bedeutende Rolle spielt. MnP oxidieren Mn^{2+} zu Mn^{3+} , wobei das Redoxpotential von Mn^{3+} hoch genug ist, um Ligninase-ähnliche Reaktionen unter physiologischen Bedingungen ablaufen zu lassen. Diese oxidierten Mn-Ionen könnten beim Abbau des Lignin-Komplexes gegenüber den Enzymen aufgrund ihrer Größe vorteilhafter sein. In *Lentinus edodes* wurde nur die Aktivität der MnP, nicht aber einer Ligninperoxidase nachgewiesen [73, 74, 75].

Die Menge an benötigtem Mangan für das Wachstum ist bei den Pilzen sehr unterschiedlich. Bei zahlreichen Arten führte eine Limitierung des Mangans zu einem reduziertem Wachstum [76].

Diese Beobachtungen konnten mit eigenen Experimenten bestätigt werden. Bei der Ermittlung von Effekten auf das Wachstum mittels statistischer Versuchspläne zeigte das höhere Konzentrationsniveau an Mangan einen positiven Einfluß. In nachfolgenden Versuchen zur Ermittlung einer optimalen Konzentration von Mangan im Nährmedium konnte beim untersuchten Stamm *Weserchamp* im Nährmedium ohne Mangan das geringste Wachstum beobachtet werden. Das dennoch beobachtete Wachstum könnte verschiedene Ursachen haben:

1. minimaler Resteintrag von Mangan bei der Inoculation (Inoculumbereitung siehe 4.3.5)
2. Speicherung von Mangan im Pilzmycel durch vorangegangene Kultivierung in manganhaltigem Medium
3. Fehlendes Mangan könnte durch Magnesium kompensiert werden, da sie im Stoffwechsel ähnliche Funktionen ausüben [72]

Mit zunehmender Konzentration verbesserte sich jedoch die Ausbeute an Biomasse. Allerdings waren dort die Unterschiede nur gering und hatten hauptsächlich einen Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Hinsichtlich dieses Parameters konnte das beste Wachstum mit einer Konzentration an Mangan im Medium von $0,5-1 \text{ mmol L}^{-1}$ ermittelt werden. Ein direkter Zusammenhang zur Aktivität der MnP konnte nicht erbracht werden, da im Medium keine Enzymaktivität meßbar war. Allerdings waren dem Nährmedium keine komplexen Substrate zugefügt, die ein MnP-Aktivität erforderten.

3.2.7.2 Calcium

Die Essentialität von Calcium für Pilze ist nicht eindeutig geklärt. Es konnte jedoch eine allgemeine Bedeutung für die Enzymaktivierung und Membranstruktur nachgewiesen werden. Außerdem können Ca^{2+} -Ionen als Signalstoff bei der Signalverarbeitung dienen, wobei die Sekundärprozesse durch Calmodulin - einem calciumbindenden Protein - vermittelt werden. Dieses System wurde auch in Pilzen nachgewiesen [77].

Der Zusatz von Calciumionen ($0,9 \text{ mmol L}^{-1}$) führte zu einem verbesserten Wachstum des untersuchten Stammes *Weserchamp*, das in der Auswertung des statistischen Versuchsplans als leicht positiver Effekt beobachtet werden konnte. Dies deutet darauf hin, daß für *Lentinus edodes* Calcium essentiell für das Wachstum ist.

3.2.7.3 Vitamine und Wachstumsfaktoren

Die meisten Pilze sind zur Biosynthese der benötigten Vitamine befähigt und damit prototroph. Es gibt jedoch Ausnahmen, die eine Vitaminabhängigkeit zeigen und damit auxotroph sind. Diese Auxotrophie bezieht sich jedoch immer nur auf einzelne Vitamine. Dies wurde bei einigen Basidiomyceten in besonderem Maße für Thiamin beobachtet. Dieses Vitamin wird daher den meisten Nährmedien prophylaktisch zugesetzt. Seltener treten Abhängigkeiten von Biotin, Pantothensäure, Riboflavin, Niacin, Folsäure und Pyridoxin auf. Bei *Lentinus edodes* wurde eine Thiamin-Abhängigkeit beobachtet, während andere Vitamine für das Wachstum nicht nötig waren [58].

Im definierten Nährmedium waren neben Thiamin, das als einzelne Variable untersucht wurde, eine Reihe weiterer Vitamine und darüber hinaus auch Wuchsstoffe wie p-Aminobenzoesäure und myo-Inositol vorhanden, die als Summenvariable untersucht wurde. Es konnte für das Thiamin bei einer Konzentration von 2 mg L^{-1} ($6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) ein positiver Effekt auf das Wachstum gegenüber der niedrigeren Konzentration ($3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) beobachtet werden. Für die Zusätze der übrigen Vitamine und Wuchsstoffe konnten keine einheitlichen Ergebnisse erzielt werden, so daß hier eine Abhängigkeit nicht festzustellen war.

Tab 3-3 Bedeutung von Vitaminen im Pilzmetabolismus [78]

| Vitamin | wirksame Form | physiologische Funktion |
|---|---------------------------------------|----------------------------------|
| Thiamin (Vitamin B ₁) | Thiamindiphosphat | Coenzym der Pyruvatdecarboxylase |
| Biotin | über Carboxylgruppe am Enzym gebunden | Coenzym für Carboxylierungen |
| Nicotinsäure (Niacin), Nicotinsäureamid | NAD, NADP | Coenzym für Dehydrogenasen |
| Pantothensäure | Coenzym A | Coenzym für 2-C-Transfers |
| Riboflavin (Vitamin B ₂) | FMN, FAD | Coenzym für Dehydrogenasen |
| Pyridoxin, Pyridoxal (Vitamin B ₆) | Pyridoxalphosphat | Coenzym für Transaminasen |
| Folsäure | Tetrahydrofolsäure | Coenzym für C-1-Transfers |
| Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂) | Cobalaminderivate | Coenzym für Methyltransfers |

3.2.7.4 Bioreaktorversuche zur Prozeßvergrößerung

Die ausreichende Produktion von Pilzmycel ist für die industrielle Produktion von *Lentinus edodes* von großem Interesse, da es als Inoculum für die Kultivierung von Fruchtkörpern verwendet werden kann. Üblicherweise wird das Pilzmycel durch Kultivierung auf festen Nährsubstraten, die aus Getreide, Sägespänen oder Holz bestehen, gewonnen. Bei einer Gewinnung von Pilzmycel aus flüssigem Nährmedium, wie es bei der Submerskultivierung bzw. der Kultivierung im Bioreaktor erfolgt, ergeben sich vor allem zwei Vorteile:

1. Eine Homogenisation vor der Beimpfung schafft kleine Mycelbruchstücke, so daß eine Vielzahl neuer Wachstumspunkte entstehen.
2. Das Beimpfen von Substratblöcken mit Mycelsuspensionen bewirkt, daß eine große Zahl von Mycelfragmenten in das Substrat gelangt und bei gleichmäßiger Verteilung zu einer schnellen Besiedlung führt

FUKUSHIMA konnte eine kontinuierliche Kultivierung im Bioreaktor in flüssigem Nährmedium für *Lentinus edodes* etablieren, wobei über einen Zeitraum von 70 Tagen ohne Kontamination kultiviert werden konnte. Der Einsatz dieser Biomasse ergab neben einer höheren Ausbeute an Biomasse auch eine schnellere Besiedlungsphase. Die Fruchtkörpererzeugung konnte damit durch Inoculation mit Pilzmycelsuspensionen deutlich verkürzt werden [79, 80]. Neben einer Produktion von Pilzmycel für die Fruchtkörpererzeugung können mycelbildende Pilze auch für andere biotechnische Verfahren genutzt werden. Hierbei handelt es sich allerdings meistens um „Schimmelpilze“, die zu einer uneinheitlichen Gruppe von Pilzen gehören, die ohne Bildung von Fruchtkörpern das Substrat besiedeln.

Tab 3-4 Wirtschaftlich wichtige biotechnologische Produkte und die beteiligten Organismen [81]

| Produkt | Organismus | Organisationsform |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------|
| Nahrungsmittel | | |
| Bier/ Wein/ Sekt | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Hefe |
| Shoyusauce/ Misopaste | <i>Aspergillus oryzae</i> | Schimmelpilz |
| Blauschimmelkäse | <i>Penicillium roquefortii</i> | Schimmelpilz |

| Produkt | Organismus | Organisationsform |
|-------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Chemische Grundstoffe | | |
| Industrie-Ethanol aus Glucose | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Hefe |
| Enzyme | | |
| Amylasen | <i>Aspergillus oryzae</i> | Schimmelpilz |
| | <i>Aspergillus niger</i> | Schimmelpilz |
| Labferment | <i>Endothia parasitica</i> | Schimmelpilz |
| Medikamente | | |
| Penicilline | <i>Penicillium chrysogenum</i> | Schimmelpilz |
| | <i>Penicillium notatum</i> | |
| Cephalosporine | <i>Cephalosporium acremonium</i> | Schimmelpilz |
| Geschmackstoffe | | |
| Citronensäure | <i>Aspergillus niger</i> | Schimmelpilz |

Bei den hoch entwickelten Pilzen hat hauptsächlich die Erzeugung von Fruchtkörpern eine wirtschaftliche Bedeutung. Das Pilzmycel von *Lentinus edodes* wird allerdings biotechnologisch zur Gewinnung von Extrakten produziert, die physiologisch aktive Substanzen enthalten. Es werden eine wasserlösliche (LEM) und zwei ethanol-unlösliche Fraktionen (LAP und LAP1) gewonnen, die eine anticancerogene und anti-Tumor-Wirkung aufweisen [9, 7, 82].

Eine Prozeßvergrößerung der Schüttelkolbenkultivierung ist vor allem durch die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff limitiert. Daher bietet sich die Kultivierung im Bioreaktor für ein „upscaling“ an. Der Vorteil gegenüber einer Schüttelkultur liegt in einer besseren Prozeßkontrolle und -steuerung. Der Wechsel ist jedoch nicht immer ohne Probleme möglich und kann sich unter Umständen negativ auf das Wachstum auswirken. Der Versuch im Bioreaktormaßstab warf auch bei der Kultivierung des untersuchten Stammes *Weserchamp* von *Lentinus edodes* Probleme auf (siehe 2.1.7).

Das Hauptproblem lag dabei vor allem im starken Schäumen und dem damit verbundenen Biomasseaustrag aus dem Kulturmedium. Hier könnte der Einsatz von Antischaummitteln oder mechanischen Schaumzerstörern Abhilfe schaffen. Dabei muß aber der Einsatz von Antischaummitteln kritisch betrachtet werden, da sie als grenzflächenaktive Substanzen auch biologische Membranen beeinflussen und sich damit negativ auf das Wachstum auswirken können.

Eine semi-kontinuierliche Kulturführung, bei der die Verluste an Biomasse durch Zusatz an frischem Inoculum bzw. Nährmedium ausgeglichen werden, würde zwar nicht das Schäumen verhindern, zumindest ist aber eine Fortführung der Kultivierung möglich, wobei das Risiko einer Kontamination relativ gering gehalten werden kann. Dies wird durch die erzielten Trockenmassegehalte bestätigt, die mit denen aus der Submerskultur vergleichbar waren, so daß eine Beeinflussung des Wachstums nur gering ist.

Ein wichtiger Parameter bei der Bioreaktorkultivierung ist im Vergleich zu Schüttelkulturen die verbesserte Versorgung der Kulturen mit Sauerstoff durch die aktive Belüftung. Auch wenn die Messung des gelösten Sauerstoffs durch das Zuwachsen der pO_2 -Elektrode problematisch und schließlich nicht mehr möglich war, kann von einer besseren Sauerstoffversorgung im Bioreaktor ausgegangen werden. Wie sich auch schon bei der Kultivierung in Schikanekolben gezeigt hat, wird das Wachstum durch eine verbesserte Sauerstoffversorgung kaum beeinflusst. Diese Beobachtung konnte bei der Kultivierung im Bioreaktor bestätigt werden. Auch die im weiteren Kulturverlauf durch das teilweise Zuwachsen des Belüftungsrohres verschlechterte Sauerstoffversorgung führte zu keiner signifikanten Verschlechterung des Wachstums.

Das Zuwachsen von Wandungen und Armaturen im Bioreaktor stellte ein weiteres Problem dar. Dies könnte durch eine verstärkte Agitation evtl. teilweise verhindert werden. So konnte bei einer Kultivierung von *Lentinus edodes* in einem 200 L Bioreaktor gezeigt werden, daß mit Anhebung der Rührergeschwindigkeit, die im Kulturverlauf von 250 rpm auf 600 rpm gesteigert wurde, das Wachstum sogar noch stimuliert werden konnte [79].

3.2.7.5 Fruchtkörpererzeugung mit optimiertem LEATHAM-Medium

Die Ergebnisse zur Optimierung des Nährstoffansprüche beruhte zunächst auf einer empirischen Vorgehensweise, bei der mit dem LEATHAM-Medium das beste Wachstum erzielt werden konnte. Die einzelnen Medienbestandteile wurden mit Hilfe statistischer Versuchspläne auf ihre Effekte bzgl. des Wachstums untersucht, wodurch es möglich war, mehrere Variablen gleichzeitig zu verändern und damit auch evtl. Synergien mitzuerfassen.

Daran anschließende weitere Optimierungsversuche, bei denen auch wirtschaftliche Gesichtspunkte berücksichtigt wurden, führten zu dem optimierten LEATHAM-Medium mit folgender Zusammensetzung:

- Glucose 25 g L⁻¹
- Glutaminsäure 2,5 g L⁻¹
- Galakturonsäure 3 g L⁻¹
- Pektin 1 g L⁻¹
- KH₂PO₄ 2 g L⁻¹
- MgSO₄ 2 g L⁻¹
- MnSO₄ 60 mg L⁻¹
- Mineralien (ohne Mn) 10 mL L⁻¹
- Spuren (ohne Mo, Ni) 1 mL L⁻¹
- Vitamine 1 mL L⁻¹

Das von LEATHAM entwickelte definierte Nährmedium wurde in Versuchen zur Fruchtkörpererzeugung eingesetzt. Dabei ergaben Untersuchungen, daß es nur in Anwesenheit von Glucuronsäure in millimolaren, Salicylsäure in mikromolaren und Nickel oder Zinn in nanomolaren Mengen gelang, Fruchtkörper zu erzeugen. Das Fehlen einer oder mehrerer dieser Nährmedienbestandteile führte zu einer verminderten Ausbeute an Fruchtkörpern [20, 83].

In eigenen Untersuchungen zur Fruchtkörpererzeugung konnten diese Beobachtungen nicht bestätigt werden. Es kam nahezu bei allen Versuchsanordnungen (siehe 4.3.8) zur Ausbildung von Fruchtkörpern, obwohl im definierten Nährmedium alle drei oben genannten Bestandteile verändert bzw. nicht zugesetzt wurden. Die Glucuronsäure wurde durch Galakturonsäure und Pektin ersetzt und Salicylsäure sowie das Spurenelement Nickel dem Medium nicht zugesetzt.

Nach einer Besiedlungsphase des festen Substrates durch das Pilzmycel konnte die Fruktifikationsperiode in zwei Phasen unterteilt werden:

1. Primordienbildung. Das sind winzig kleine, erst nur stecknadelkopfgroße Fruchtkörperanlagen, die aber schon die spätere Differenzierung erkennen lassen.
2. Fruchtkörperentwicklung aus den sich vergrößernden Primordien durch Streckungsphase im Bereich des Stieles und in der Ausbreitung des Hutes.

Wie LEATHAM in Experimenten zeigen konnte, wurden Bestandteile, die sich stimulierend auf die Fruchtkörperausbildung auswirkten, in Hafermehl und Eichenrinde ermittelt. Diese stellen natürliche Substrate für *Lentinus edodes* dar. Hierbei wurde die Glucuronsäure als ein Bestandteil identifiziert [20]. Wie schon unter 3.2.6.1 diskutiert, stellen Glucuronsäure und andere Zuckersäuren Bausteine von Polysacchariden dar, die Bestandteile der Zellwand sind. Durch die eigenen Experimente konnte gezeigt werden, daß nicht allein die Glucuronsäure einen stimulierenden Effekt auf die Fruchtkörperbildung ausübt, sondern auch Galakturonsäure und Pektin dazu in der Lage sind. Darüber hinaus zeigten sie auch einen positiven Effekt auf das Wachstum des vegetativen Pilzmycels, wobei durch die Optimierung noch eine Steigerung von 25% erzielt werden konnte.

3.3 Der Aromaprecursor Lentinsäure

3.3.1 Vorkommen, Struktur und Isolierung

In der Literatur über Pilze werden bei deren Beschreibung häufig Gerüche zur näheren Charakterisierung oder Unterscheidung von nahestehenden Arten herangezogen. Dies spiegelt sich in der Namensgebung wider, die auf die typischen Geruchs- und Geschmacksnoten hindeuten [84]. Besonders deutlich wird dies bei einer Gruppe von Pilzen aus der Familie der Tricholomataceae mit den Gattungen *Marasmius*, *Micromphale* und *Collybia*, die sich durch lauch- und knoblauchartige Gerüche auszeichnen.

- *Marasmius alliaceus* (langstieliger Knoblauch-Schwindling)
- *Marasmius scorodonius* (Knoblauch-Schwindling)
- *Micromphale foetidum* (Stink-Schwindling)

Diese Arten zeigen bei der Verarbeitung einen intensiven Geruch nach Knoblauch und Lauch. Ähnliche Geruchseindrücke finden sich auch beim Shiitake (*Lentinus edodes*), dessen Geruchseindrücke mit knoblauch- und rettichartig beschrieben werden.

Es konnten aus allen Arten Alkyl-Derivate von L-Cystein oder L-Cysteinsulfoxid in Form der freien Aminosäure oder als γ -Glutamylpeptid isoliert werden. Diese Aromaprecursoren liefern die durch enzymatischen Abbau entstehenden charakteristischen schwefelhaltigen Geruchsstoffe.

Das Vorkommen dieser Verbindungen beschränkt sich nicht nur auf Pilze, auch im Pflanzenreich finden sich zahlreiche Beispiele, vor allem bei den *Allium*-Arten, wie in Tab 3-5 dargestellt ist.

Tab 3-5 Natürliches Vorkommen von γ -Glutamyl-L-Cysteinsulfoxid-Derivaten

| Name | Struktur | Spezies | Lit. |
|--|----------|---|--------------|
| γ -Glutamyl-S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid | | <i>Allium sativum</i> (Zwiebel) | [85] |
| γ -Glutamyl-S-Allyl-L-Cysteinsulfoxid | | <i>Allium sativum</i> (Knoblauch) | [86] |
| γ -Glutamyl-S-(Propen-1-yl)-L-Cysteinsulfoxid | | <i>Allium cepa</i> (Schnittlauch) | [87] |
| γ -Glutamyl-L-Djenkolsäuresulfoxid | | <i>Acacia georginae</i> | [88] |
| γ -Glutamyl-Marasmin | | <i>Marasmius alliaceus</i> <i>Marasmius prasioides</i> <i>Marasmius scorodonius</i> | [27] |
| Lentinsäure | | <i>Lentinus edodes</i> <i>Collybia hariolorum</i> <i>Micromphale perforans</i> | [24] [25] |

Die Lentinsäure konnte erstmals von YASUMOTO aus frischen Shiitake-Fruchtkörpern isoliert werden. Untersuchungen zur Strukturaufklärung ergaben einen Dipeptidaufbau aus Glutaminsäure und Cystein [24]. Die Substitution des Cysteins konnte nur z.T. aufgeklärt werden und wurde von GMELIN und HÖFLE vervollständigt. Demnach handelt es sich um ein γ -Glutamyl-L-Cysteinsulfoxidpeptid, das am Cysteinsulfoxidrest über Methylenbrücken mit zwei weiteren Sulfoxid- und einer Sulfoneinheiten substituiert ist [29].

Eine Substanz mit gleicher Struktur aber unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften (optischer Drehwert, Schmelzpunkt) konnte aus einigen *Micromphale*- und *Collybia*-Arten isoliert werden und wurde als Epilentinsäure bezeichnet. Mit drei chiralen Sulfoxidgruppen in der Seitenkette sind entsprechend acht stereoisomere Formen mit L-Konfiguration im Peptidrest möglich. Es wurde in Experimenten festgestellt, daß sowohl in *Lentinus edodes* als auch *Collybia acervata* reine Lentinsäure vorlag, während sie den anderen untersuchten Pilzen mit wechselnden Anteilen an Epilentinsäure vergesellschaftet ist [25].

Neben der Lentinsäure wurden aus *Lentinus edodes* andere schwefelhaltige Peptide und Aminosäuren z.T. auch nicht-proteinogener Natur isoliert, die in der nachfolgenden Tab 3-6 aufgeführt sind.

Tab 3-6 γ -Glutamylpeptide und schwefelhaltige Aminosäuren in *Lentinus edodes*

| Name | Struktur | Lit. |
|--|----------|----------|
| N,N'-bis- γ -glutamylcystin | | [89] |
| γ -Glutamylcystin | | [90] |
| N,N'-bis- γ -glutamylcystinylglycin | | [90] |
| γ -Glutamylglutaminsäure | | [91] |
| γ -Glutamylnicotianin | | [91] |
| Cystathionin | | [92, 93] |

3.3.2 Isolierung der Lentinsäure

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der aus intakten Zellen des submers kultivierten Pilzes *Lentinus edodes* der Aromaprecursor Lentinsäure quantitativ bestimmt werden konnte. Ein effektiver Zellaufschluß wurde durch Naßvermahlung in einer Rührwerkskugelmühle erreicht. Der anschließende chromatographische Nachweis erfolgte mittels HPLC, wobei aufgrund fehlender UV-aktiver bzw. chromophorer Eigenschaften eine Vorsäulenderivatisierung nötig war. Hierbei wurde auf Verfahren, die für die Analyse von Aminosäuren bereits etabliert wurde, zurückgegriffen.

Es zeigte sich dabei, daß alle diese Verfahren ihre Vor- und Nachteile haben. So konnte mit der Derivatisierungsmethode mit o-Phthaldialdehyd/Thiol keine Derivatisierung erzielt werden. Für eine Umsetzung mit den Reagenzien sind primäre Aminogruppen nötig, die im Glutamylrest der Lentinsäure vorliegen.

Mit einer Derivatisierung mit FMOC/ADAM, bei der eine Reaktion sowohl mit primären als auch sekundären Aminen erfolgt, konnte auch die Lentinsäure erfaßt werden. Diese Bestimmung ermöglichte auch aus relativ kleinen Mengen an Biomasse quantitative Ergebnisse zu erhalten, bei der auf eine Isolierung der Reinsubstanz verzichtet werden konnte.

Der Vergleich zwischen Lentinsäuregehalten in Shiitake-Fruchtkörpern und des vegetativen Pilzmycels (siehe Tab 3-7) ergaben deutlich niedrigere Gehalte im Pilzmycel. Da davon ausgegangen werden kann, daß der Zellaufschluß quantitativ erfolgte, können die Unterschiede nicht mit analytischen Fehlern erklärt werden. Vielmehr wurden zwei verschiedene Wachstumsstadien untersucht, wobei während der Fruktifikationsperiode die Stoffwechselaktivität stark beschleunigt ist. Der Nährstofftransport wird dabei kanalisiert und zur Ausbildung der Fruchtkörper verwendet. Die ermittelten Gehalte aus getrockneten Fruchtkörpern, die unter Berücksichtigung eines Wassergehaltes von 90% nur etwa 15% des Gehaltes in frischen Fruchtkörpern ausmachten, lassen auf einen partiellen Abbau der Lentinsäure während der Trocknung schließen, da es hier durch eine teilweise Zerstörung der Zellkompartimentierung zu enzymatischen Reaktionen zwischen Enzym und Substrat kommen kann. Die in der Literatur beschriebenen Lentinsäuregehalten, die deutlich von den eigenen Untersuchungen abweichen, könnten mit Verlusten bei der sehr aufwendigen Isolierungsmethode erklärt werden.

Tab 3-7 Lentinsäuregehalte

| | Gehalt |
|---|---|
| Submerskultur | 200-300 mg kg ⁻¹ Feuchtmasse |
| Fruchtkörper (frisch) [eigene Ergebnisse] | 600-670 mg kg ⁻¹ Frischgewicht |
| Fruchtkörper (getrocknet) [eigene Ergebnisse] | 1000 mg kg ⁻¹ Trockengewicht |
| Fruchtkörper (frisch) nach YASUMOTO [24] | 150 mg kg ⁻¹ Frischgewicht |

3.3.3 Biosynthese von γ -Glytamylpeptiden

γ -Glutamylpeptide finden sich - wie auch Tab 3-5 und Tab 3-6 verdeutlichen - in der Natur hauptsächlich in den Familien der Alliaceae und Leguminosae und darüber hinaus in Pilzen (*Lentinus edodes*, *Marasmius*- und *Collybia*-Arten, *Boletus edulis*, *Agaricus*-Arten). Dies scheint demnach sowohl für die Allium- und Leguminosen-Arten als auch für Pilze charakteristisch zu sein. Das Auftreten der γ -Glutamylpeptide erscheint daher nicht zufällig, so daß für ihre Biosynthese und Transformation eine enzymatische Kontrolle vermutet wird. Aufgrund ihrer großen Zahl und ihrem breitgestreuten Vorkommen müssen generelle biosynthetische Systeme vorliegen, bei denen man einen Zusammenhang mit der Biosynthese von Glutathion und Glutamin erwägen könnte. Dabei spielen die Transpeptidasen sowohl in der Biosynthese als auch im Abbau der γ -Glutamylpeptide eine wichtige Rolle.

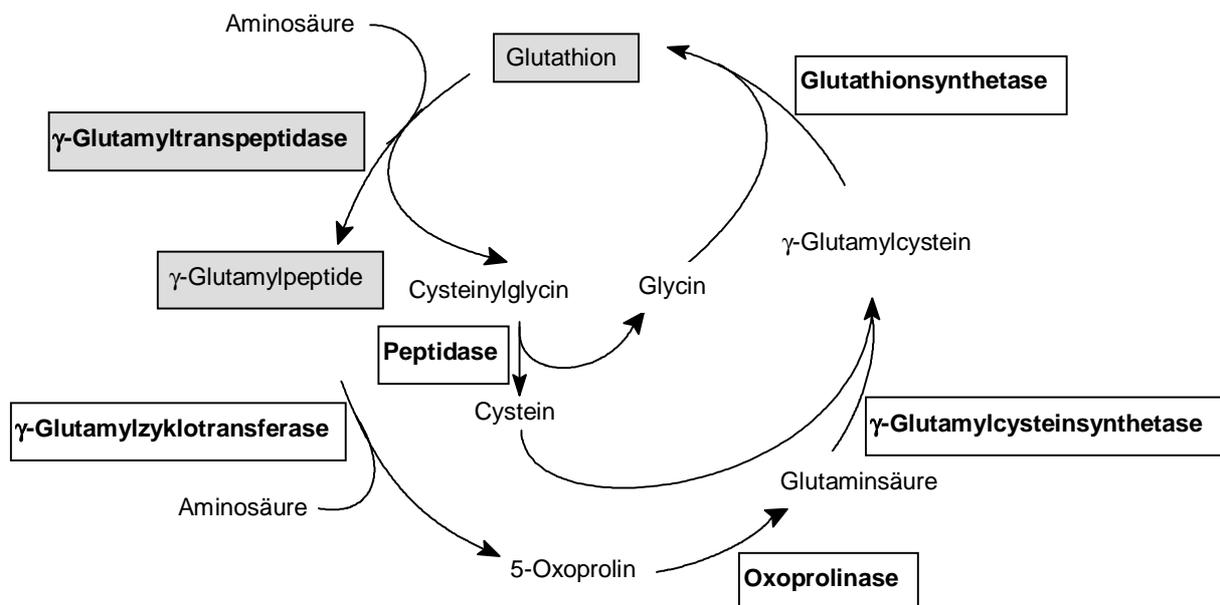


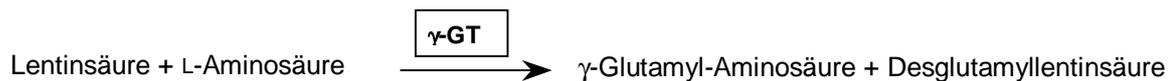
Abb 3-2 Bildungswege für γ -Glutamylpeptide im γ -Glutamylzyklus [71]

Das Schlüsselenzym des γ -Glutamylzyklus - die γ -Glutamyltranspeptidase (oder -transferase EC 2.3.2.2) - überträgt von einem γ -Glutamylderivat z.B. Glutathion den Glutamylrest auf einen geeigneten Akzeptor (Aminosäure, Peptid) [94].

Die Funktion der γ -Glutamylpeptide im Organismus wird kontrovers diskutiert. Im tierischen Gewebe sind sie Intermediärprodukte des γ -Glutamylzyklus und übernehmen dabei eine wichtige Aufgabe im Aminosäuretransport durch Zellmembranen. Dies gründet auf der Beobachtung, daß die γ -Glutamyltranspeptidasen dort immer membrangebunden auftreten [94, 95, 96].

Bei höheren Pflanzen spielen die Glutamylderivate möglicherweise eine andere Rolle, da hier das Enzym nicht mit der Zellmembran assoziiert zu sein scheint [97]. Bei Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) konnte das Vorkommen aller Enzyme des γ -Glutamylzyklus nicht nachgewiesen werden. Der Abbau von Glutathion scheint hier nur durch die γ -Glutamyltranspeptidase und die Peptidase (siehe Abb 3-2 und Abb 3-2) vermittelt zu werden, wobei die Transpeptidase typischerweise sowohl hydrolytische als auch transferierende Aktivitäten aufweist. Weiterhin konnte ein direkter Zusammenhang zur Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden nicht gefunden werden [98, 99, 100].

Aus *Lentinus edodes* wurde eine γ -Glutamyltranspeptidase isoliert und aufgereinigt, wobei sich zeigte, daß auch hier das Enzym sowohl eine hydrolytische als auch transferierende Aktivität besitzt. Es spielt bei der Freisetzung der schwefelhaltigen Aromastoffe eine wichtige Rolle, indem es die erste Reaktion im Abbau der Lentinsäure katalysiert. So wurde folgende Reaktion mit dem Aromaprecursor Lentinsäure durch die γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) beobachtet:



Dabei fungiert die Lentinsäure als γ -Glutamyl-Donor, wobei festgestellt wurde, daß sie im Vergleich zu Glutathion der effizientere Donor war. Bei Untersuchungen zur Spezifität des Akzeptors wurde zahlreiche Aminosäuren ermittelt, darunter auch Cystein, Alkylcysteine, Cysteinsulfoxide, Methionin. Dies impliziert ferner, daß das Enzym möglicherweise eine Rolle bei der Biosynthese der Lentinsäure spielt. Das Enzym wurde ähnlich wie im tierischen Gewebe als membrangebunden lokalisiert [101, 102, 103].

3.3.4 Schwefelmetabolismus

Die Aufklärung der Biosynthese von Lentinsäure in Kulturen von *Lentinus edodes* war nicht Ziel der vorliegenden Arbeit. Bei der Optimierung der Bildung dieser Zielkomponente wurde jedoch versucht, auch diesen Aspekt zu berücksichtigen, um dadurch eine größere Möglichkeit der Einflußnahme auf eine Produktivitätssteigerung zu haben. Dabei war vor allem die Verwendung geeigneter Precursoren von großer Bedeutung. Aufgrund der ungewöhnlichen Seitenkette im Lentinsäuremolekül scheint für die Biosynthese der Schwefel eine zentrale Rolle zu spielen. Bei der Submerskultivierung von *Lentinus edodes* sind im Nährmedium anorganische Sulfate als Schwefelquellen vorhanden, die vom Pilz offensichtlich genutzt wurden, um unter anderem daraus Lentinsäure zu synthetisieren.

Eine andere Schwefelquelle konnte ausgeschlossen werden, da das Medium eine definierte Zusammensetzung aufweist. Daher werden im folgenden einige Aspekte zur Assimilation von Schwefel bei Pilzen besprochen.

3.3.4.1 Schwefelassimilation

Schwefel wird von Pilzen als Makroelement benötigt, und ist damit für den Organismus essentiell. Zu den wichtigsten Schwefelverbindungen im Primärstoffwechsel gehören die Aminosäuren Cystein, Cystin, Homocystein und Methionin, die frei oder eingebaut in Peptide und Proteine vorliegen. Schwefel findet sich auch in einigen Wirkgruppen von Enzymen z.B. Thiamin und Biotin und in Eisen-Schwefel-Proteinen. Als Thiolgruppierung stellt er die eigentliche reaktive Gruppe von Verbindungen wie Thioredoxine oder Coenzym A [104].

Die Biosynthese dieser Verbindungen ist auf reduzierten Schwefel angewiesen. Die von den meisten Pilzen genutzte Schwefelquelle stellt das Sulfat dar, das in der höchsten Oxidationsstufe (+6) vorliegt. Dieses muß zunächst reduziert werden, um in organische Moleküle eingebaut werden zu können.

Die Aufnahme des Sulfats in die Zelle erfolgt über ein aktives Transportsystem mit Hilfe einer Sulfat-Permease, die in zahlreichen Pilzen und Hefen nachgewiesen werden konnte [105].

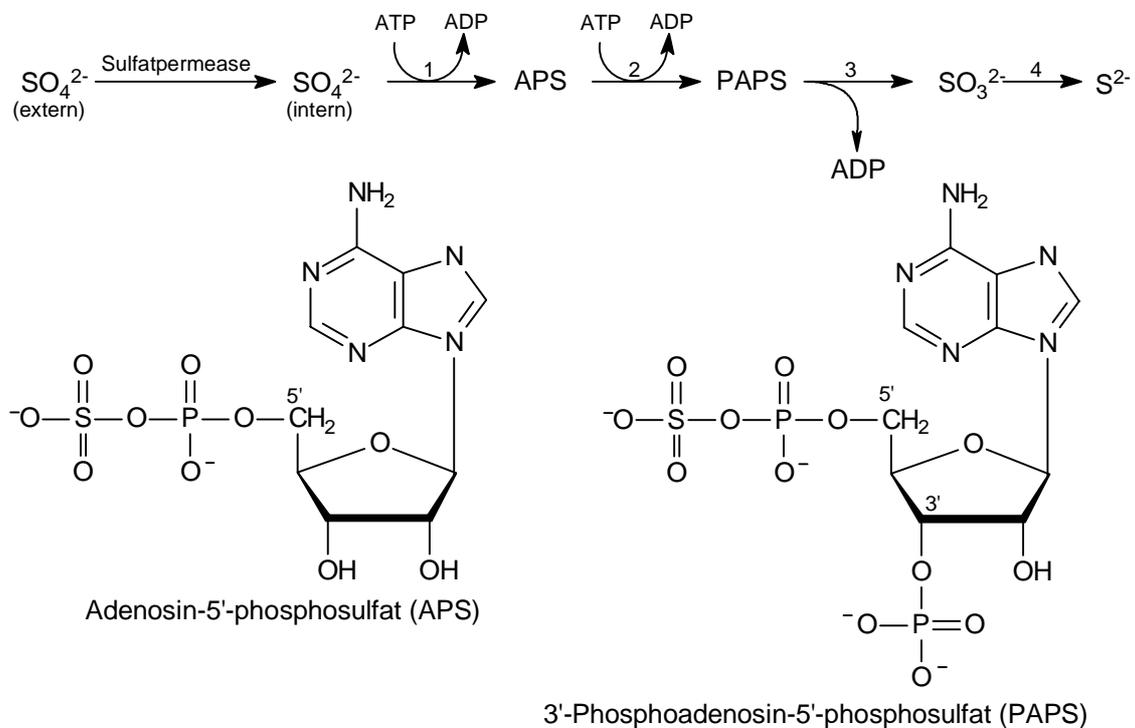


Abb 3-3 Assimilatorische Sulfatreduktion (Beteiligte Enzyme: 1 = ATP-Sulfat-Adenylyltransferase; 2 = Adenylylsulfat-Kinase; 3 = Sulfotransferase; 4 = Sulfitreduktase) [106]

Für eine Reduktion muß das Sulfat, das aufgrund der hohen Oxidationsstufe sehr reaktions-träge ist, zunächst durch Reaktion mit ATP aktiviert werden. Auf das entstandene APS wird anschließend von einem weiteren ATP ein Phosphorsäure-Rest auf die 3'-OH-Gruppe der Ribose übertragen, wodurch PAPS entsteht. Dieses fungiert als Donor für die Sulfat-Gruppe und stellt damit „aktives Sulfat“ dar, wobei sich der Schwefel formal immer noch in der Oxidationsstufe +6 befindet. Die daran anschließende Sulfatreduktion gliedert sich in zwei Reaktionsschritte, wobei nicht alle der zwischengeschalteten Umsetzungen aufgeklärt sind. Im ersten Schritt wird durch eine 2-Elektronenübertragung die Stufe des Sulfits (SO_3^{2-}) und im zweiten wird durch den Transfer von insgesamt 6 Elektronen die Stufe des Sulfids (S^{2-}) erreicht [104].

3.3.4.2 Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren und Peptide

Das aus der Schwefelassimilation durch Reduktion entstandene Sulfid wird in organische Moleküle eingebaut und ergibt unter anderem die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Auch hier stellt die γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT) wieder das Schlüsselenzym in der Biosynthese von γ -Glutamylpeptiden dar und ist damit auch in die Regulation des Schwefelmetabolismus involviert. Wie Untersuchungen bei *S. cerevisiae* ergaben, wird in Anwesenheit von Sulfat als Nährstoff nahezu der gesamte Überschuß an Schwefel in Glutathion eingebaut. Bei einer fehlenden Schwefelquelle wird das Glutathion wiederum als Schwefelquelle genutzt, wobei nur 90% mobilisiert werden [107].

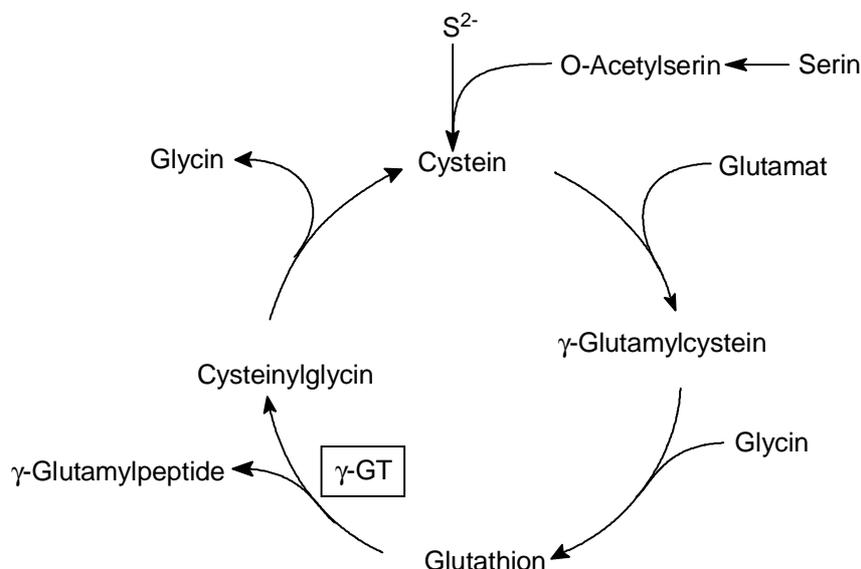


Abb 3-4 Modell der möglichen Schwefelmetabolismuswege [105]

3.3.4.3 Möglicher Bildungsweg für Cysteinsulfoxidderivate

Versuche von LANCASTER mit radioaktiv markiertem Schwefel (^{35}S) konnten den oben (siehe Abb 3-4) dargestellten Assimilationsweg des Schwefels ausgehend vom Sulfat bis hin zum Einbau des Sulfids in O-Acetylserin und dem daraus entstehenden Cystein in *Allium*-Arten bestätigen. Die Übertragung des Labels konnte in γ -Glutamylcystein und Glutathion nachgewiesen werden, die die Ausgangsverbindungen für die Synthese der Sulfoxide darstellen. Durch Methylierung von Glutathion entsteht anschließend Methylglutathion, das durch Abspaltung des Glycinyrestes zu γ -Glutamylmethylcystein führt. Ein alternativer Syntheseweg könnte über eine direkte Methylierung von γ -Glutamylcystein eingeschlagen werden. Eine anschließende Oxidation der Thioetherbrücke resultiert im Zielmolekül γ -Glutamylmethylcysteinsulfoxid. Die Enzyme, die am Metabolismus der Sulfoxide beteiligt sind, sind weitgehend unklar. Auch der genaue Ablauf der Methylierung ist bis heute nicht erschöpfend aufgeklärt [108].

3.3.5 Precursorstudien bei *Lentinus edodes*

Vor dem Hintergrund der zuvor dargestellten Überlegungen bzgl. der Biosynthese von γ -Glutamylpeptiden und den metabolischen Wegen des Schwefels sollen die eigenen Untersuchungen bei *Lentinus edodes* diskutiert werden.

3.3.5.1 Lentinsäuregehalte in Nährmedium mit sulfathaltiger S-Quelle

Über die Rolle von schwefelhaltigen γ -Glutamylpeptiden im Stoffwechsel von Pilzen und Pflanzen ist wenig bekannt. Es wird vermutet, daß sie als Speicherstoffe für Stickstoff oder Schwefel dienen, da man in auskeimenden *Allium*-Arten einen drastischen Rückgang im Gehalt an γ -Glutamylpeptiden festgestellt hat [86].

Andererseits könnte die Lentinsäure als stabile Reserveform für die Aromastoffe dienen, die in intakten Zellen nicht hydrolysiert wird, da sie von den entsprechenden Enzymen getrennt ist. Erst bei Zerstörung der Zellkompartimentierung entstehen die schwefelhaltigen Aromastoffe aus dem Aromaprecursor. Diesen wird eine antimikrobielle Wirkung zugesprochen.

Aufgrund der Fähigkeit fast aller Pilze zur Sulfatreduktion und der ermittelten Gehalte an Lentinsäure in Fruchtkörpern war zu erwarten, daß sich auch in den Submerskulturen ein Grundlevel an Lentinsäure findet.

Es zeigten sich bei den Untersuchungen deutliche Unterschiede bei den verschiedenen Stämmen, aber auch innerhalb des Kultivierungszyklus einzelner Stämme. Die mit Abstand höchsten Gehalte wurden in dem Stamm Weserchamp ermittelt, wobei auch die größten Schwankungen innerhalb der Kultivierung auftraten.

Über die Ursachen der unterschiedlichen Gehalte zwischen den einzelnen Stämmen kann nur spekuliert werden. Es könnte sich hier um spezifische Unterschiede handeln, die aufgrund unterschiedlicher Enzymausstattungen insbesondere der γ -Glutamyltranspeptidase-Aktivität zu den Differenzen im Lentinsäuregehalt führen können. Darüber hinaus wäre auch denkbar, daß der aufgenommene Schwefel nicht nur in der Lentinsäure gespeichert wird, sondern auch in anderen schwefelhaltigen γ -Glutamylpeptiden, von denen in *Lentinus edodes* ebenfalls eine Reihe nachgewiesen wurden (siehe Tab 3-6).

Ähnliche Verläufe innerhalb des Kultivierungszyklus zeigten Weserchamp und A 20-8, bei denen eine deutliche Steigerung im Lentinsäuregehalt vom 9. bis zum 15. Kulturtag beobachtet wurde. Dieses Verhalten korreliert mit der Bildung von Biomasse, so daß in der exponentiellen Wachstumsphase die Lentinsäurebildung besonders hoch ist.

Bei den untersuchten Stämmen 225.51 und 530.90 wurden nahezu konstante Lentinsäuregehalte über den gesamten Kulturverlauf ermittelt. Ursachen hierfür könnten in einer vom Wachstum und anderen Faktoren unabhängigen Schwefelassimilation liegen oder darin, daß das Sulfat nicht die bevorzugte S-Quelle darstellt.

Abnahmen im Lentinsäuregehalt konnten bei den Stämmen A 20-5 und 808.91 festgestellt werden. Da es sich hierbei nur um geringfügige Abnahmen handelt und die Gehalte nur an drei Kulturtagen innerhalb des Kultivierungszyklus bestimmt wurden, kann es sich hierbei um biologische Schwankungen handeln.

3.3.5.2 Lentinsäuregehalte in Nährmedium ohne Schwefel-Quelle

Im Medium mit Sulfaten als S-Quelle wird ein bestimmtes Grundlevel an Lentinsäure erreicht, das z.T. auch von Stoffwechselaktivität und Wachstum abhängt. Da eine Versorgung mit dem Makroelement Schwefel für die Pilze essentiell ist, sollte dies beim Fehlen desselben auch einen Einfluß auf die Bildung der Lentinsäure haben.

Der Entzug der Schwefel-Quelle im Nährmedium (S-freies LM) zeigte dabei bei den verschiedenen Stämmen unterschiedliche Effekte, die sich in zwei Gruppen zusammenfassen lassen.

Die Stämme Weserchamp, 389.89 und 530.90 haben im sulfathaltigen LEATHAM-Medium im Vergleich zu den übrigen vier Stämmen die höchsten Lentinsäuregehalte. Das Fehlen einer Schwefel-Quelle bewirkte bei diesen drei Stämmen einen drastischen Rückgang, wobei dies bei Weserchamp am deutlichsten ausfällt. Hier werden über den gesamten Kulturverlauf Gehalte $< 10 \text{ mg kg}^{-1}$ erreicht. Bezogen auf die maximalen Lentinsäuregehalte im S-haltigen Medium sind dies nur noch 5%. Ähnliche Werte ergeben sich auch für 389.89 mit 18% und für 530.90 mit ca. 30%. Überraschenderweise lagen die Konzentrationen schon am ersten Untersuchungszeitpunkt (9. Kulturtag) auf einem deutlich niedrigeren Level als im unveränderten LEATHAM-Medium.

Diese Ergebnisse sprechen für eine Metabolisierung der Lentinsäure, die aufgrund ihrer schwefelreichen Seitenkette als potentielle Reserve- oder Depotschwefelquelle dienen könnte. Die Annahme, daß die schwefelhaltigen γ -Glutamylpeptide als Speicherstoffe für Schwefel oder Stickstoff genutzt werden könnten, wird durch dieses Experiment untermauert. Dies steht auch nicht im Widerspruch zu der Funktion der Lentinsäure, als stabile Aromavorstufe zu fungieren, da das Fehlen einer Schwefelquelle in der Natur eine extreme Ausnahmesituation darstellen würde.

LANCASTER konnte in Versuchen mit verschiedenen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, daß die Gehalte an Glutathion beim Fehlen einer S-Quelle drastisch zurückgehen. In weiteren Experimenten wurde darüber hinaus festgestellt, daß maximal 90% des Glutathions verstoffwechselt wurden um den Organismus mit Schwefel zu versorgen [108]. Es wurde vermutet, daß die restlichen 10% zur Aufrechterhaltung anderer Stoffwechselvorgänge und damit auch zum Überleben der Zelle dienen.

Bei den restlichen vier untersuchten Stämmen 225.51, 808.91, A 20-5 und A 20-8 wurden im S-haltigen LEATHAM-Medium deutlich geringere Lentinsäuregehalte ermittelt als bei den Stämmen Weserchamp, 389.89 und 530.90.

Das Fehlen der S-Quelle bewirkte hierbei – im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Stämmen – einen wesentlich geringeren Rückgang im Lentinsäuregehalt. So konnten für 808.91 ca. 90% nachgewiesen werden und für A 20-4 und A 20-8 jeweils 70%. Lediglich 225.51 zeigte ein uneinheitliches Bild (siehe Abb 2-58). Dies wird auf Meßungenauigkeiten aufgrund sehr geringer Biomassegehalte (siehe Abb 2-56) zurückgeführt. Da aber das Wachstum deutlich schlechter ausfiel, kann davon ausgegangen werden, daß auch hier der fehlende Schwefel im Medium für die im Mittel niedrigeren Lentinsäuregehalte verantwortlich gemacht werden kann. Die Ursache für die weniger stark ausgeprägten Rückgänge könnte darin liegen, daß andere im Pilz vorhandene schwefelhaltige γ -Glutamylpeptide metabolisiert werden.

3.3.5.3 Organische Precursoren

Die schwefelhaltige Aminosäure L-Cystein wurde als Precursor zur Steigerung der Lentinsäurebildung ausgewählt, da sie sowohl als Strukturelement in der Lentinsäure enthalten ist, als auch als potentielle Quelle für bereits reduzierten Schwefel fungieren könnte. L-Methionin, eine weitere schwefelhaltige Aminosäure, aber nicht strukturell mit der Lentinsäure verwandt, wurde ebenfalls als Precursor ausgewählt. Eine funktionelle Einheit des Methionins - die Methylthioethergruppe - enthält reduzierten Schwefel, der zur Biosynthese der Lentinsäure insbesondere der Seitenkette genutzt werden könnte. Darüber hinaus könnte eine Übertragung der Methylthiogruppe den Aufbau des methylenverbrückten Sulfoxid-/ Sulfonrestes im Aromaprecursor begünstigen.

In Tab 3-8 sind die Effekte, die durch den Zusatz von Cystein oder Methionin erzielt wurden, zusammengefaßt dargestellt.

Tab 3-8 Effekte auf Lentinsäurebildung nach Zusatz organischer Precursoren

| Stamm | Zusatz von Cystein | Zusatz von Methionin |
|------------|--------------------|----------------------|
| Weserchamp | (+) | ++ |
| LED 225.51 | ++ | ++ |
| LED 389.89 | ++ | +/- |
| LED 530.90 | -- | - |
| LED 808.91 | ++ | n.b. |
| LED A 20-5 | ++ | ++ |
| LED A 20-8 | + | ++ |

(+) = leicht positiv; + = positiv; ++ = deutlich positiv; +/- = nicht eindeutig positiv
 - = negativ; -- = deutlich negativ
 n.b. = nicht bestimmbar

530.90 zeigt als einziger Stamm sowohl bei Cystein als auch bei Methionin einen negativen Effekt nach Zugabe. Bei diesem untersuchten Stamm scheinen die schwefelhaltigen Aminosäuren inhibierend auf die Synthese der Lentinsäure zu wirken.

Dieser Effekt wurde für Methionin auch von MEISTER bei Untersuchungen über die Biosynthese von Glutathion in tierischen Zellen beobachtet [96]. Inwieweit hier ein ähnlicher Mechanismus vorliegt, kann nicht eindeutig geklärt werden, zumal die Verläufe des γ -Glutamylzyklus in tierischen und pflanzlichen Zellen nicht auf jeder Stufe übereinstimmen. Der deutlich positive Effekt, der sich bei 808.91 nach Zugabe von Cystein zeigte, konnte mit Methionin nicht erreicht werden. Im Gegensatz zu 530.90 hatte der Zusatz von Methionin einen stark negativen Einfluß auf das Wachstum, der sogar zu einem Absterben der Zellen führte. Zur genaueren Klärung dieses Problems hätte es weiterer Experimente mit einer geringeren Zusatzkonzentration bedurft. Da aber hauptsächlich nach effektiven Precursoren gesucht wurde und das Cystein schon einen deutlich positiven Effekt auf die Bildung der Lentinsäure gezeigt hatte, wurde auf diese Zusatzexperimente verzichtet.

Bei Stamm 389.89 lagen die Gehalte nach Cysteingabe deutlich höher, so daß von einem positiven Effekt ausgegangen werden kann. Allerdings war die Steigerungsrate innerhalb des Kultivierungszyklus mit 160% bei ungefütterter und gefütterter Kultur gleich.

Bei den übrigen vier untersuchten Stämmen (Weserchamp, 225.51, A 20-5 und A 20-8) wurden überwiegend positive Einflüsse verzeichnet, wobei die Steigerungen vor allem nach Zusatz von Methionin beträchtlich waren. Dies wurde besonders deutlich bei Weserchamp beobachtet. Die Gehalte lagen nicht nur absolut im Vergleich zu den anderen Stämmen am höchsten, sondern erreichten auch die Größenordnung, die für frische Fruchtkörper ermittelt wurde (siehe Tab 3-7). Bei A 20-5 und A 20-8 konnten zwar keine direkten Steigerungen innerhalb des Kultivierungszyklus festgestellt werden, dennoch lagen die Gehalte nach Fütterung mit schwefelhaltigen Aminosäuren am 9. Kulturtag signifikant über den Konzentrationen an Lentinsäure im Nährmedium ohne Precursorzusatz.

Obwohl der positive Effekt, den das Methionin auslöst, nicht bei allen Stämmen beobachtet werden konnte, scheint es in den zugesetzten Konzentrationen von 1 mmol L^{-1} Nährmedium der effektivere Precursor der beiden untersuchten schwefelhaltigen Aminosäuren zu sein.

Da der Pilz in der Lage ist, sämtliche Aminosäuren selbst aufzubauen (siehe 3.2.5) und damit auch den Dipeptidaufbau aus Glutaminsäure und Cysteinrest selbst zu synthetisieren, scheint die Precursorwirkung hauptsächlich auf dem Zusatz einer Schwefelquelle zu beruhen, die aufgrund des im Molekül schon reduzierten Schwefels schneller verwertet werden kann. Die Unterschiede zwischen Methionin und Cystein bei der Verwertbarkeit resultieren aus den unterschiedlichen funktionellen Gruppen. Die Thiolgruppe des Cysteins ist besonders oxidationsempfindlich, so daß es schon im Medium zu einer Änderung der chemischen Struktur kommen kann, die dann vom Pilz weniger gut nutzbar ist.

Darüber hinaus kann das Methionin als Methylthiodonator fungieren, das den Aufbau der Seitenkette im Lentinsäuremolekül begünstigen oder beschleunigen würde. Diese Wirkung von Methionin konnte in Untersuchungen von SUGII mit radioaktiv markiertem ^{35}S -Methionin für die Biosynthese von S-Methyl-L-Cysteinsulfoxid nachgewiesen werden [108, 109].

Obwohl Methionin als Aminosäure für den Pilz wenig cytotoxisch sein sollte, zeigte sich jedoch in Folgeexperimenten, daß eine Erhöhung der zugesetzten Menge die positiven Effekte umkehren kann. So bewirkte eine Konzentration von 10 mmol L^{-1} Methionin im Medium, daß der untersuchte Stamm *Weserchamp* die Biosynthese der Lentinsäure nahezu einstellte, obwohl sich keine Einschränkung der Stoffwechselaktivität bzgl. des Aufbaus an Biomasse zeigte.

3.3.5.4 Anorganische Precursoren

Bei den Precursorstudien mit organischen Substanzen zeigte sich, daß der limitierende Faktor bei der Biosynthese der Lentinsäure wahrscheinlich in der ausreichenden Versorgung mit Schwefel in reduzierter Form liegt. Da auf dem Weg der Sulfatreduktion (siehe 3.3.4.1) verschiedene reduzierte Formen des Schwefels durchlaufen werden, bevor es zu einem Einbau in organische Moleküle kommt, wurden Thiosulfat (+4 / 0) und Sulfid (-2) ausgewählt, um als Precursoren die Bildung der Lentinsäure zu steigern. Dabei liegt der Schwefel im Thiosulfat aufgrund der Nichtäquivalenz in zwei unterschiedlichen Oxidationsstufen vor, wobei es unter physiologischen Bedingungen im leicht sauren pH-Bereich zur Abspaltung von Schwefel und Bildung von Sulfid kommt

Zu diesen Experimenten wurde der Stamm *Weserchamp* ausgewählt, der nicht nur generell die höchsten Gehalte an Lentinsäure aufwies, sondern auch besonders ausgeprägte Effekte bzgl. einer Precursorgabe zeigte.

Beide anorganische Precursoren zeigten positive Effekte, womit die Vermutung erhärtet werden konnte, daß ein Zusatz an Schwefel in niedrigeren Oxidationsstufen die Biosynthese der Lentinsäure begünstigt. Wie sich aber mit den sehr geringen Anfangsgehalten am 9. und 15. Kulturtag zeigte, ist der Zusatz nicht ganz unkritisch. Offensichtlich benötigt der Pilz eine längere Adaptionsphase, da in beiden Fällen eine deutliche Steigerung erst zum 21. Kulturtag zu verzeichnen war, während an den beiden ersten Kulturtagen die Gehalte im Standardnährmedium höhere Werte erzielten.

Für die Thiosulfatmetabolisierung wurde bei einigen Pilzen und Hefen ein aktiver Transportmechanismus gefunden, der mit dem für Sulfat übereinstimmt [72]. Dies würde den verzögerten Effekt teilweise erklären, da es zu einer Konkurrenz zwischen Sulfat und Thiosulfat um denselben Transportmechanismus kommen kann.

Sulfid wird ohne aktiven Transport ins Innere der Zelle geschleust, so daß die beiden Ionen nicht um denselben Mechanismus konkurrieren müssen [72].

3.3.5.5 Schwefelbilanz

In der Nährstoffzusammensetzung des LEATHAM-Mediums liegt die Schwefel-Quelle in Form anorganischer Sulfate vor. Sie liegen im etwa hundertfachen molaren Überschuß gegenüber der gebildeten Lentinsäure vor, so daß eine ausreichende Versorgung mit Schwefel garantiert ist.

Trotzdem konnte durch einen Zusatz einer sehr viel geringeren Menge in Form von bereits reduziertem Schwefel eine deutliche Steigerung im Lentinsäuregehalt erreicht werden.

Tab 3-9 Lentinsäurebilanz für Weserchamp

| Medium | max. Lentinsäuregehalt | n (Lentinsäure*) | n (Schwefel) |
|--|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| LEATHAM-Medium (LM) | 200 mg kg ⁻¹ | 0,41 mmol kg ⁻¹ | 1,64 mmol kg ⁻¹ |
| S-freies LM | 10 mg kg ⁻¹ | 0,02 mmol kg ⁻¹ | 0,08 mmol kg ⁻¹ |
| LM + Cystein | 215 mg kg ⁻¹ | 0,44 mmol kg ⁻¹ | 1,76 mmol kg ⁻¹ |
| LM + Methionin | 595 mg kg ⁻¹ | 1,2 mmol kg ⁻¹ | 4,80 mmol kg ⁻¹ |
| LM + Na ₂ S | 474 mg kg ⁻¹ | 0,98 mmol kg ⁻¹ | 3,92 mmol kg ⁻¹ |
| LM + Na ₂ S ₂ O ₃ | 433 mg kg ⁻¹ | 0,90 mmol kg ⁻¹ | 3,60 mmol kg ⁻¹ |

*MW (Lentinsäure) = 483 g mol⁻¹

3.3.5.6 Kritische Betrachtung von Precursorexperimenten

Der Einsatz von Precursoren stellt eine gute Methode dar, die Ausbeute von Zielkomponenten zu steigern, wie am Beispiel von *Lentinus edodes* und der Erhöhung des Lentinsäuregehaltes gezeigt werden konnte. Die Aktivität der Precursoren läßt darüber hinaus auch Rückschlüsse auf Biosynthesewege zu (siehe 3.3.3 und 3.3.4). Allerdings bedeutet dies nicht, daß der Precursor ein direkter metabolischer Vorläufer der Zielverbindung sein muß bzw. direkt in den natürlichen Stoffwechselweg eingeschleust wird.

Eine Aufklärung könnte dann mit Hilfe isotope-markierter Verbindungen als Precursoren erfolgen, deren Einbau in die Zielstrukturen den Beweis liefern würde.

Darüber hinaus kann es zu „biologischen Schwankungen“ kommen, die eine Interpretation der erzielten Ergebnisse erschweren. Dies zeigte sich besonders deutlich bei der Wiederholung des Precursorexperimentes mit Methionin und dem Stamm Weserchamp. Hierbei wurden Unterschiede sowohl in den Gehalten, die ohne einen Precursorzusatz resultierten, als auch unterschiedliche Steigerungsraten nach der Fütterung erreicht.

Da zwischen den Experimenten eine erhebliche zeitliche Differenz lag, könnten die im Wiederholungsexperiment höheren Gehalte an Lentinsäure auf einer Speicherwirkung derselben beruhen. Die Kultivierung von *Lentinus edodes* fand sowohl in den Vorkulturen als auch in den experimentellen Kulturen im LEATHAM-Medium statt, das ständig eine ausreichende Schwefelversorgung garantiert. Dies würde die Vermutung bestätigen, daß die Speicherung als potentielle S-Quelle eine der Funktionen der γ -Glutamylpeptide und damit auch der Lentinsäure ist.

Andererseits könnte die Wirkung des Precursors immer geringer ausfallen und letztendlich ganz ausbleiben, wenn es zu einer Absättigung des Organismus an Lentinsäure und anderen γ -Glutamylpeptiden kommen würde.

3.3.6 Die Aromastoffe in Shiitake

Die intakten frischen Fruchtkörper des Shiitake verströmen nur einen schwachen, leicht moderigen Geruch. Dagegen entwickelt sich beim Zerkleinern der frischen Pilze bzw. Einweichen getrockneter Pilze in Wasser sein charakteristisches Aroma. Dieses erinnert an Knoblauch und Rettich und wird durch zahlreiche schwefelhaltige Verbindungen hervorgerufen.

3.3.6.1 C₈-Verbindungen

Darüber hinaus finden sich im Aroma des Shiitake flüchtige Stoffwechselprodukte mit 8 C-Atomen (C₈-Verbindungen), die als typische „Pilznoten“ das Aroma der meisten Speispilze entscheidend prägen [53, 55].

Die Bildung der flüchtigen Stoffwechselprodukte findet durch enzymatische und chemische Reaktionen aus aromainaktiven Vorstufen statt.

Bei den C₈-Verbindungen gehören zu den Aromaprecursoren ungesättigte Fettsäuren, vor allem Linolsäure, wobei sich die Biogenese der Geruchsstoffe in drei Schritte gliedern lässt [110].

1. Hydrolyse von Fetten zu den ungesättigten freien Fettsäuren (hauptsächlich Linol- und Linolensäure) durch Lipasen
2. Oxidation der ungesättigten Fettsäuren zu Hydroperoxiden durch Lipoxygenasen
3. Spaltung der Hydroperoxide in flüchtige Alkohole und Aldehyde durch spaltende Enzyme wie Hydroperoxidlyasen oder Oxidoreduktasen

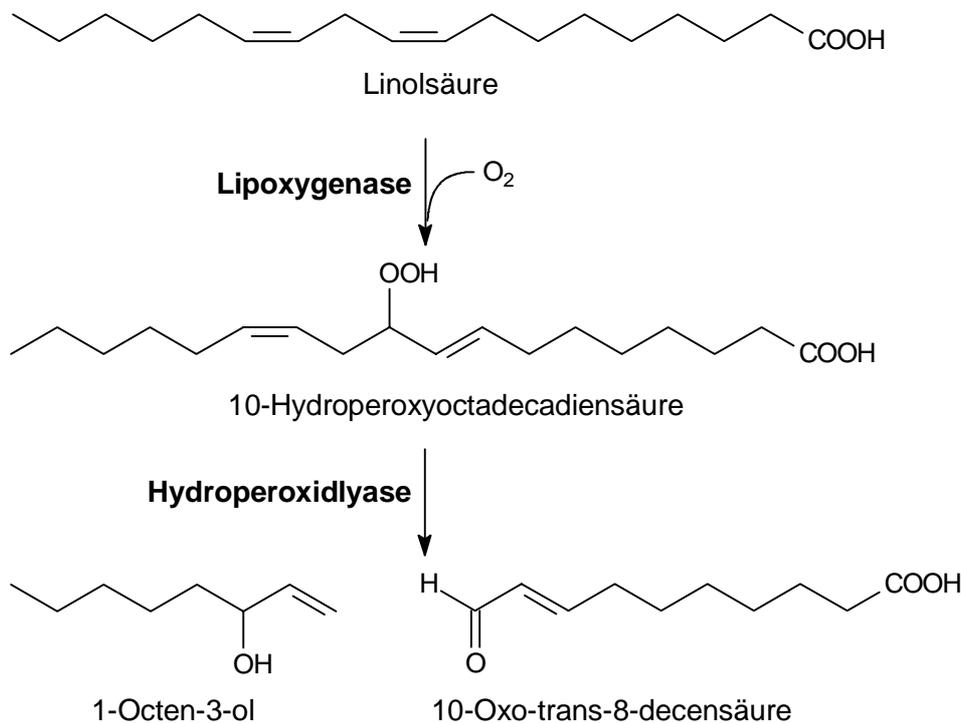


Abb 3-5 Hypothetischer Biogeneseweg von 1-Octen-3-ol in Pilzen [111]

Sowohl in den Aromaextrakten der frischen Shiitake-Fruchtkörper als auch in den Submerskulturen von *Lentinus edodes* war 1-Octen-3-ol das Hauptprodukt unter den C₈-Verbindungen. Dagegen konnte das Oxidationsprodukt 1-Octen-3-on nur in Spuren nachgewiesen werden [112], wobei es aufgrund der deutlich geringeren Geruchsschwellenkonzentration dennoch das Aroma von Pilzen prägt. In Übereinstimmung mit CHEN [44] wurden darüber hinaus zahlreiche weitere C₈-Verbindungen nachgewiesen (siehe Tab 2-11).

3.3.6.2 Schwefelhaltige Aromastoffe

Die Biogenese der schwefelhaltigen Aromastoffe in *Lentinus edodes* erfolgt wie bei den C₈-Verbindungen auf enzymatischem und chemischem Weg. Wie schon bei der Betrachtung der γ -Glutamylpeptide und dort insbesondere der Cysteinsulfoxidderivate erläutert wurde, finden ähnliche Prozesse auch in *Allium*-Arten statt, die sich mit einer analogen Enzymausstattung insbesondere der Cysteinsulfoxidlyase (Alliinase) erklären lassen [113, 114, 115, 116].

Der Aromaprecursor ist das γ -Glutamylpeptid Lentinsäure, das in zwei enzymatischen Schritten abgebaut wird (Abb 3-7). Zunächst wird der Glutamylrest durch eine γ -Glutamyltranspeptidase abgespalten. Dieser kann auf endogene Akzeptoren, wie z.B. Aminosäuren übertragen werden (siehe 3.3.3).

Im zweiten Schritt wird die entstandene Desglutamylentinsäure in einer α,β -Eliminierung durch Einwirken einer Cysteinsulfoxidlyase weiter abgebaut. Es werden Ammoniak und Pyruvat freigesetzt, so daß die Seitenkette aus methylenverbrückten Sulfoxid- und einer Sulfoneinheit als instabiles Restmolekül übrig bleibt. Die daraus entstehende Sulfensäure reagiert unter Kondensation zu Thiosulfinaten, die aufgrund ihrer Instabilität zu Disproportionierungen neigen, so daß daraus die nicht-cyclischen und cyclischen Polysulfide entstehen (siehe Tab 2-10).

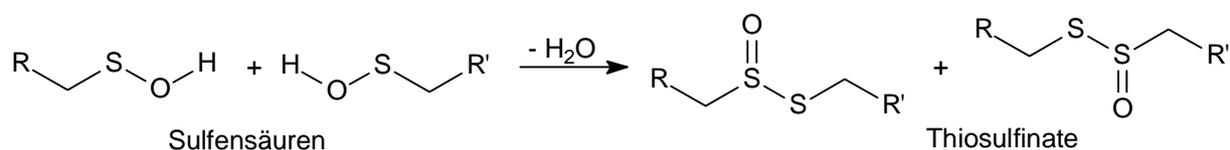


Abb 3-6 Kondensation von Sulfensäure zu Thiosulfinaten [117]

Sowohl die γ -Glutamyltranspeptidase (siehe 3.3.3) als auch eine Cysteinsulfoxidlyase (CS-Lyase) konnte in *Lentinus edodes* nachgewiesen werden [118]. Letztere wurde im Cytosol lokalisiert und konnte erst nach Abspaltung des Glutamylrestes Desglutamylentinsäure als Substrat nutzen.

Die „Chemie“ der letzten Schritte in der Bildung der Polysulfide ist noch nicht erschöpfend aufgeklärt. So ist unklar, wie der Verlust des Sauerstoffs, der in den Sulfon- und Sulfoxideinheiten des Aromaprecursors zu finden ist, abläuft, da in den cyclischen Polysulfiden kein Sauerstoff mehr enthalten ist.

Der enzymatische Abbau der Lentinsäure ist im folgenden schematisch dargestellt.

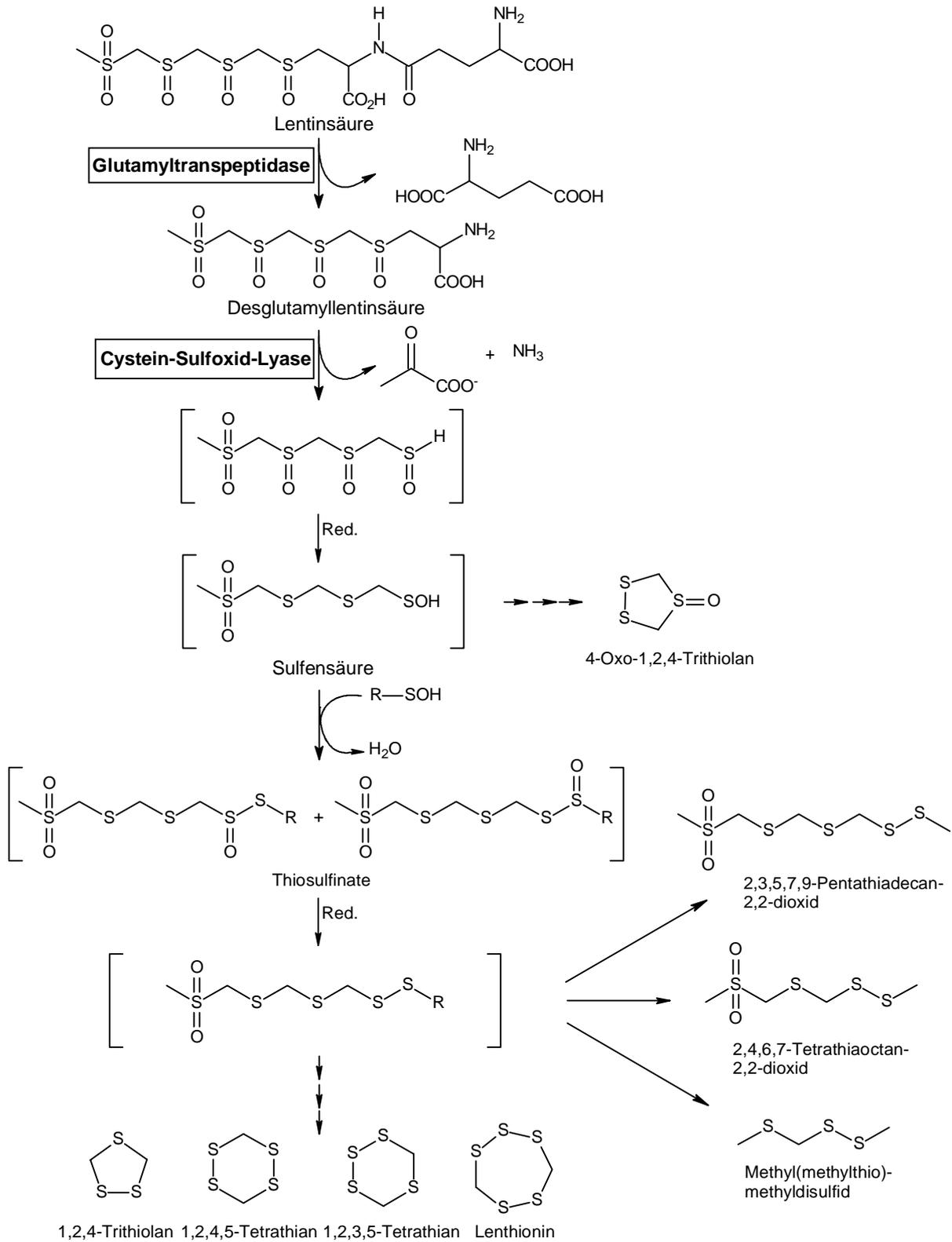


Abb 3-7 Biogenese schwefelhaltiger Aromastoffe aus Lentinsäure [44] (modifiziert)

In den Aromaextrakten aus Fruchtkörpern von Shiitake konnten neben den zahlreichen nicht-cyclischen und cyclischen Polysulfiden drei Verbindungen identifiziert werden, in denen noch Sauerstoff enthalten ist.

2,3,5,7,9-Pentathiadecan-9,9-dioxid wurde erstmals von MORITA isoliert, untersucht und als Precursor (SE-3) für Lenthionin und andere Polysulfide interpretiert [47]. Dabei wurde die Struktur zunächst fehlinterpretiert, was durch Arbeiten von BLOCK belegt werden konnte. Die Synthese und spektroskopischen Untersuchungen ergaben, daß der Sauerstoff an Schwefel gebunden vorliegt und nicht wie von MORITA vorgeschlagen als Etherbrücke [50].

In eigenen Untersuchungen der Aromaextrakte konnte die von BLOCK synthetisierte Verbindung in geringen Mengen nachgewiesen werden (siehe Tab 2-10).

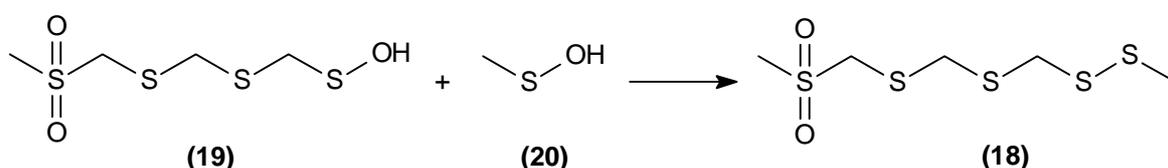


Abb 3-8 Hypothetischer Bildungsweg für 2,3,5,7,9-Pentathiadecan-9,9-dioxid (**18**) [119]

Der von BLOCK vorgeschlagene Biogeneseweg von (**18**) beinhaltet die Kondensation der Sulfensäuren (**19**) und (**20**), wobei keine der beiden Verbindungen nachgewiesen werden konnte. Dennoch ist die strukturelle Verwandtschaft von (**19**) und (**18**) mit der beim enzymatischen Abbau der Lentinsäure entstehenden Sulfensäure deutlich zu erkennen. Unklar bleibt - wie oben schon erwähnt - auch hier der Verlust des Sauerstoffs aus den Sulfinylgruppen. Sowohl 2,4,6,7-Tetrathiaoctan-2,2-dioxid (**16**) als auch 4-Oxo-1,2,4-Trithiolan (**9**) konnten als weitere sauerstoffhaltige Verbindungen im Aromaextrakt von Shiitake-Fruchtkörpern nachgewiesen werden. Die Identifizierung beruhte auf der Interpretation des Massenspektrums und Vergleich mit Literaturspektren [46, 120]. Das Vorkommen von (**16**) wurde für *Lentinus edodes* bisher nicht beschrieben. Ebenso konnte auch (**9**) bisher nicht im Aroma von *Lentinus edodes* nachgewiesen werden, stattdessen wurde (**9**) zusammen mit anderen cyclischen Polysulfiden, die ebenso im Aromaextrakt von *Lentinus edodes* gefunden wurden, aus der Rotalge *Chondria californica* extrahiert.

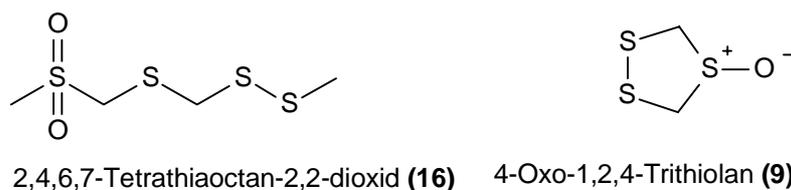


Abb 3-9 Schwefel-Sauerstoffverbindungen aus Aromaextrakten von Shiitake

Allen drei Verbindungen **(18)**, **(16)** und **(9)** ist neben der Anwesenheit von Sauerstoff im Molekül die Disulfidbrücke gemeinsam, die aus der Kondensation zweier Sulfensäuren und anschließender Reduktion des Sulfoxids entstehen könnte.

3.3.6.3 Physiologische Bedeutung der Aromastoffe

Besonders die schwefelhaltigen Geruchsstoffe tragen zum charakteristischen Aroma des Shiitake bei, die ihn von dem „typischen“ Pilz dem Champignon stark unterscheidet. Aufgrund dieser Tatsache sowie dem hohen Gehalt an Glutaminsäure und 5'-Guanosinmonophosphat (GMP) [121] wird der Shiitake auch gerne als Würzpilz verwendet.

Schwefelhaltigen Aromastoffen wird allgemein eine antimikrobielle Aktivität zugesprochen, die bei diversen *Allium*-Arten nachgewiesen wurde. Bei *Lentinus edodes* konnte dies für das Lenthionin ebenfalls gezeigt werden, das eine antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Bakterien und Pilze (v.a. Hefen) entfaltet [47].

Gerade beim Zerkauen von frischen Shiitake fällt neben dem würzigen Geschmack auch eine leichte Schärfe auf, die an Rettich erinnert. Bei den *Allium*-Arten wurden unter anderem die Thiosulfinate für den scharfen, beißenden Geruch und Geschmack von Zwiebeln und Knoblauch verantwortlich gemacht [122, 123, 124, 125]. Auch für die Thiosulfinate wurden antibakterielle Wirkungen festgestellt [126]. In Analogie könnte der scharfe Geschmack bei *Lentinus edodes* ebenfalls auf diese Gruppe von Verbindungen zurückzuführen sein. Wegen ihrer Instabilität konnten sie bislang in Aromaextrakten nicht näher identifiziert werden [127].

3.3.6.4 Aromaextrakte aus Submerskulturen

Der größte Unterschied in den gewonnenen Aromaextrakten aus Fruchtkörpern und dem Pilzmycel der Submerskulturen von *Lentinus edodes* lag in der Quantität der gewonnenen Aromastoffe. Bei etwa vergleichbaren Mengen an frischen Fruchtkörpern und Biomasse aus der Submerskulturen, die zur Gewinnung der Aromaextrakte eingesetzt wurden, konnten aus den Submerskulturen nur etwa 10% an Aromastoffen im Vergleich zu den Fruchtkörpern gewonnen werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Unterschieden in den Lentinsäuregehalten, die zwischen Fruchtkörpern und Submerskulturen aufgetreten sind. Wie schon zuvor vermutet, könnten die quantitativen Unterschiede an einer geringeren Stoffwechselaktivität liegen. Generell sind aber die Enzyme, die zur Biosynthese von γ -Glutamylpeptiden notwendig sind und die entsprechenden Enzyme, die zu ihrem Abbau und Entstehen der Aromastoffe führen, auch im vegetativen Pilzmycel vorhanden.

Die in dieser Arbeit nicht vollständig geklärten Zusammenhänge zwischen dem Lentin säuregehalt und der Menge an gebildeten Aromastoffen aus Submerskulturen von *Lentinus edodes* werden jedoch in Nachfolgearbeiten durchgeführt.

3.4 Ausblick

Es konnten die Nährstoffansprüche für *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp generell und hinsichtlich wirtschaftlicher Gesichtspunkte erfolgreich optimiert werden. Dazu stellte die Submerskultivierung in zweierlei Hinsicht eine geeignete Methode dar:

Sie erlaubt eine standardisierbare Kultivierung im Labormaßstab, bei der Parameter empirisch oder auch mit Hilfe statistischer Versuchspläne verändert und optimiert werden können. Dabei ist der Kultivierungszeitraum im Vergleich zu einer industriellen Anbaumethode deutlich verkürzt.

Darüber hinaus kann die Submerskultivierung in Schüttelkulturen oder im Bioreaktor zur Produktion von Biomasse genutzt werden, die in der industriellen Kultivierung als Substratinoculum verwendet werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Versuche zur Fruchtkörpererzeugung im Labormaßstab durchgeführt werden, die für eine weitere Optimierung für den industriellen Anbau eine gute Voraussetzung darstellen.

Bislang konnte der Zusammenhang zwischen Precursorzusatz und Steigerung der Lentin säuregehalte nur empirisch ermittelt werden, ohne einen direkten Einbau des Schwefels nachzuweisen. Durch geeignete Markierungsexperimente z.B. mit ³³S-markiertem Methionin könnte aufgeklärt werden, ob und wo der Schwefel in der gebildeten Lentin säure wieder zu finden ist.

Die zuvor diskutierten kompetitiven Transportmechanismen oxidierter Schwefelquellen ließen sich ebenfalls durch selektive Markierung weiter aufklären.

Darüber hinaus ist es sinnvoll, einen regioselektiven Einbau von Schwefelquellen verschiedener Oxidationsstufen bzw. einzelner Strukturelemente aus Vorläufern im Zielmolekül Lentin säure zu untersuchen. So könnte die Methylsulfoneinheit bevorzugt aus einer Precursorquelle (z.B. Methionin mit einer Methylthioethergruppierung), die drei Methylsulfanylgruppierungen aus einer anderen Precursorquelle gebildet werden. Neben einer Aufklärung des Schwefelmetabolismus könnten für weitere Optimierungsversuche mit Precursoren auch die Biosynthese von γ -Glutamylpeptiden insbesondere der Lentin säure von Interesse sein, da es offensichtlich zwischen Pilzen, den höheren Pflanzen und tierischen Zellen deutliche Unterschiede gibt.

Ein Vergleich zwischen Fruchtkörpern und vegetativem Pilzmycel wie es bei der Submerskultivierung vorliegt, konnte bei der Analyse des endogenen Metabolits Lentinsäure vor allem quantitative Unterschiede aufdecken, die sich auch bei der Gewinnung der Aromastoffe fortsetzte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Korrelation zwischen dem Gehalt an Lentinsäure und daraus entstandenen schwefelhaltigen Aromastoffen erbracht werden. Dies wäre im Hinblick auf die erzielten Steigerungen des Lentinsäuregehaltes durch Precursorzusatz und deren Auswirkungen auf eine vermehrte Bildung von schwefelhaltigen Aromastoffe jedoch von Interesse.

Da der Biogeneseweg der Aromastoffe nicht vollständig geklärt ist, könnten weitere Untersuchungen der noch nicht identifizierten Thiosulfinate und deren Folgeprodukte ein interessanter Aspekt sein. In dieser Arbeit wurden durch den Nachweis von Schwefelverbindungen, die Sauerstoff enthalten erste Anhaltspunkte erbracht.

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungsmaterial

Sowohl die getrockneten als auch die frischen Shiitake-Pilze wurden vom lokalen Handel bezogen. Die frischen Shiitake wurden visuell auf Verletzungen und Kontamination mit Schimmelpilzen untersucht. Nur unversehrte Fruchtkörper wurden weiter verarbeitet.

Das Herkunftsland der getrockneten Shiitake war China. Die Fruchtkörper wurden bis zur Verwendung in der Originalverpackung bei Raumtemperatur gelagert.

Das Herkunftsland der frischen Shiitake war Deutschland. Die Pilze wurden bei 6 °C in einer Kühlkammer (Kältezelle mit Kühlaggregat CS 0900 S, Viessmann) bis zu ihrer Verwendung gelagert.

4.2 Pilzkulturen

Tab 4-1 Namen und Bezugsquellen der verwendeten Pilzstämme

| Wissenschaftlicher Name | Abkürzung | Kultursammlung | Stammnr. |
|-------------------------------------|------------|----------------|----------|
| <i>Lentinus edodes</i> (Berk. Sing) | Weserchamp | * | — |
| <i>Lentinus edodes</i> (Berk. Sing) | LED A-20-5 | FSU | A 20-5 |
| <i>Lentinus edodes</i> (Berk. Sing) | LED A 20-8 | FSU | A 20-8 |
| <i>Lentinus edodes</i> (Berk. Sing) | LED 225.51 | CBS | 225.51 |
| <i>Lentinus edodes</i> (Berk. Sing) | LED 389.89 | CBS | 389.89 |
| <i>Lentinus edodes</i> (Berk. Sing) | LED 530.90 | CBS | 530.90 |
| <i>Lentinus edodes</i> (Berk. Sing) | LED 808.91 | CBS | 808.91 |

Kultursammlungen:

* = Firma Weserchampignon, Hessisch Oldendorf, Germany

FSU = Pilzkultursammlung der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Sektion Biologie

CBS = Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederlande

4.3 Kultivierung

4.3.1 Stammhaltung

Von jedem Stamm wurden Kulturen auf 2 Agarplatten und in einem Schrägagarröhrchen mit Standard Nähr-Agar (siehe 4.4.2.3) angelegt. Dazu wurden Platten und Röhrchen mit einem gut bewachsenen Agarstück (ca. 0,5-1 cm²) aus der vorhergehenden Stammkultur (bzw. der Originalkultur der o.g. Kultursammlung) beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C im Brutschrank bis zum vollständigen Bewachsen der Agaroberfläche (ca. 2 Wochen). Danach wurden die Platten und Röhrchen mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank (4-7 °C) gelagert. Etwa alle 6 Monate erfolgte eine Überimpfung nach dem gleichen Verfahren auf frische Agarmedien.

4.3.2 Standardbedingungen für Submerskulturen

Kultivierungstemperatur: 24 °C

Schüttelgeschwindigkeit: 150 rpm

4.3.3 Vorkulturen

4.3.3.1 Vorkulturen 1 (SNL-B₁, siehe 4.4.2.1)

Aus den Agarplatten-Stammkulturen wurde ein 1 x 1 cm großes Stück herausgeschnitten und in einen 200 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL SNL-B₁-Medium überführt. Die Vorkultur wurde 2 Tage im Schüttler (siehe 4.3.2) inkubiert und nach dem Sichtbarwerden eines Mycelflaums am Rande des Agarstücks mit dem Ultraturrax 30 s lang homogenisiert. In der Regel wurde nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen im Schüttler aus diesen Vorkulturen 1 die Vorkulturen 2 und Vorkulturen 3 angesetzt.

4.3.3.2 Vorkulturen 2 (SNL-H; siehe 4.4.2.2)

Von der Vorkultur 1 wurden 10 mL steril in einen 300 mL Erlenmeyerkolben mit 140 mL SNL-H-Medium pipettiert und anschließend 30 s lang mit dem Ultraturrax auf Stufe 5 homogenisiert. Die Vorkulturen 2 wurden nach 9 Tagen Inkubation direkt für die Inoculation der experimentellen Kulturen verwendet.

4.3.3.3 Vorkulturen 3 (LEATHAM-Medium, siehe 4.4.2.4)

Beim Ansetzen der Vorkulturen 3 wurde wie unter 4.3.3.2 verfahren. Statt SNL-H Medium wurden 10 mL Inoculum in 140 mL LEATHAM-Medium pipettiert.

4.3.4 Experimentelle Kulturen

Die experimentellen Kulturen wurden entweder aus den Vorkulturen 2 oder 3 inoculiert. Es wurde sowohl die Zusammensetzung und Menge der Nährlösung als auch unterschiedliche Inoculummengen verwendet, dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 200 mL Erlenmeyerkolben — 90 mL Medium — 10 mL Inoculum
- 300 mL Erlenmeyerkolben — 140 mL Medium — 10 mL Inoculum
- 500 mL Erlenmeyerkolben — 250 mL Medium — 50 mL Inoculum

4.3.5 Inoculumbereitung

siehe 2.2.1 und 2.2.2.2

Die Vorkulturen 3 wurden mit dem Ultraturrax (Stufe 5, 30 s) homogenisiert und anschließend abzentrifugiert (8000 g, 7 °C). Die für die Zentrifugation verwendeten 250 mL PP-Becher wurden durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Das Kulturmedium wurde vom Pellet steril abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 50 mL 0,9 %iger, steriler NaCl-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand durch Abpipettieren entfernt. Das gewaschene Pilzmycel wurde mit soviel steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung versetzt, wie als Inoculummenge benötigt wurde. Um eine homogene Verteilung des Pilzmycels in der NaCl-Lösung zu erzielen, wurde das Pellet erneut mit dem Ultraturrax homogenisiert (Stufe 3, 15 s) und anschließend als Inoculum verwendet.

4.3.6 Zusatz von Precursoren

Jeweils 1 mmol L⁻¹ der organischen Precursoren L-Cystein und L-Methionin wurde als Feststoffe in 4 mL-Schraubgläsern autoklaviert und den experimentellen Kulturen am 3. Kulturtag zugesetzt. Im Glas verbliebene Reste wurden mit 1 mL sterilem Wasser gelöst und ebenfalls den Kulturen zugefügt.

Die anorganischen Precursoren Na₂S und Na₂S₂O₃ wurden in Wasser gelöst, sterilfiltriert und den experimentellen Kulturen am 3. und 6. Kulturtag (jeweils 0,5 mmol L⁻¹) zugesetzt.

4.3.7 Kultivierung im Bioreaktor

Bei der Kultivierung von *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp im Bioreaktor wurde aus Vorkulturen 3 eine weitere Vorkultur mit 50 mL Inoculum auf 250 mL LM-Medium angesetzt, die als Inoculum für den Bioreaktor diente. Im Kulturgefäß wurden 5 L LM-Medium vorgelegt, die über das in 4.5.4 aufgeführte Belüftungsrohr direkt belüftet wurden. Die Vitaminlösung wurde zum Zeitpunkt der Inoculierung steril zupipettiert.

4.3.8 Kultivierung zur Fruchtkörpererzeugung

Bei der Kultivierung von *Lentinus edodes* Stamm Weserchamp zur Fruchtkörpererzeugung, wurden als Inoculum entweder 4-5 Agarstücke (ca. 1 cm²) aus den Stammkulturen (siehe 4.3.1) oder 10 mL aus der Vorkultur 3 (siehe 4.3.3.3) verwendet. Zur Kultivierung wurden Gläser mit einem Füllvolumen von ca. 500 mL und einer weiten Öffnung am oberen Rand verwendet. Sie wurden mit 40 mL optimiertem LEATHAM-Medium (LM-opt.) (siehe 4.4.3.11) und jeweils soviel des Hilfsmittels befüllt, daß der Boden des Kulturgefäßes komplett bedeckt wurde. Die Gefäße wurden mit Watte verschlossen, die mit einem Gummiband am oberen Rand fixiert wurde. Um eine Durchfeuchtung während des Autoklavierens zu vermeiden, wurde die Watte mit Alufolie abgedeckt. Diese Anordnung wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert und vor der Inoculation mit der Vitaminlösung des LEATHAM-Mediums (100 µL) versetzt. Eine Übersicht über die Versuchsanordnung gibt Tab 4-2.

Tab 4-2 Versuchsanordnung für die Kultivierung zur Fruchtkörpererzeugung

| Versuch | Kulturmedium | Hilfsmittel | Inoculum |
|---------|--------------|-------------|--------------------------------|
| 1 | LM-opt. | Glaswolle | Agarstück aus Stammkultur |
| 2 | LM-opt. | Glaswolle | 10 mL Inoculum aus Vorkultur 3 |
| 3 | LM-opt. | Watte | Agarstück aus Stammkultur |
| 4 | LM-opt. | Watte | 10 mL Inoculum aus Vorkultur 3 |

4.3.9 Kulturparameter

4.3.9.1 pH-Wert

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde direkt nach der Probenahme mit einem zuvor kalibrierten pH-Meter bestimmt.

4.3.9.2 Glucosegehalt

Die orientierende Bestimmung der Glucosekonzentration in den Kulturmedien erfolgte direkt nach der Probenahme mit Glucoseteststäbchen, Diabur-Test[®] 5000, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim. Die Durchführung der Messung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

4.3.9.3 Biotrockenmasse

Zentrifugationsmethode

Ein definiertes Medienvolumen wurde in 250 ml Zentrifugenbecher (Polypropylen) überführt, bei 8000 g und 10 °C abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen, nochmals abzentrifugiert. Der Rückstand wurde auf ein tariertes Filterpapier gebracht, im Trockenschrank bei 103 °C 24 h lang getrocknet und anschließend nach dem Abkühlen ausgewogen.

Schnellmethode

5 mL der Kultur wurden in ein tariertes 10 mL Zentrifugengläschen pipettiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, der Rückstand mit 5 mL Wasser gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend im Trockenschrank bei 103 °C 24 h lang getrocknet und nach dem Abkühlen ausgewogen.

Prüfung auf Kontamination

Die Prüfung auf Kontamination erfolgte durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen der Kulturen.

4.4 Kulturmedien

4.4.1 Herstellung steriler Kulturmedien

Zur Herstellung der Kulturmedien wurden die Medienbestandteile in dest. Wasser gelöst und der pH-Wert der Nährlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die Füllvolumina wurden entsprechend abgemessen: 90 mL Medium in 200 mL Kolben, 140 mL Medium in 300 mL Kolben und 250 mL Medium in 500 mL Kolben.

Die Kolben wurden anschließend mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Alufolie abgedeckt und dann für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

4.4.2 Standardkulturmedien

4.4.2.1 Standardnährlösung-B₁ (SNL-B₁)

| | |
|--------------------------------------|------------------------|
| D-(+)-Glucose-Monohydrat | 30,0 g L ⁻¹ |
| L-Asparagin-Monohydrat | 4,5 g L ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 g L ⁻¹ |
| MgSO ₄ x H ₂ O | 0,5 g L ⁻¹ |
| Spurenelementlösung | 1,0 mL L ⁻¹ |
| Thiamin-Hydrochlorid* | 2,0 mg L ⁻¹ |

*sterilfiltrierte Stammlösung; Zugabe nach dem Autoklavieren der Kulturmedien

Spurenelementlösung

| | |
|--|-------------------------|
| FeCl ₃ x 6 H ₂ O | 80,0 mg L ⁻¹ |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 90,0 mg L ⁻¹ |
| MnSO ₄ x 5 H ₂ O | 30,0 mg L ⁻¹ |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | 5,0 mg L ⁻¹ |
| EDTA | 0,4 g L ⁻¹ |

pH-Wert: mit 2 N NaOH auf pH 6,0 vor dem Autoklavieren eingestellt

4.4.2.2 Standardnährmedium-Hefe (SNL-H)

Ersatz von Thiamin-Hydrochlorid durch Hefeextrakt, ansonsten wie SNL-B₁

| | |
|-------------|-----------------------|
| Hefeextrakt | 3,0 g L ⁻¹ |
|-------------|-----------------------|

4.4.2.3 SNL-H-Agar

Wie SNL-H, jedoch Zusatz von Agar-Agar

| | |
|-----------|------------------------|
| Agar-Agar | 15,0 g L ⁻¹ |
|-----------|------------------------|

4.4.2.4 LEATHAM-Medium (LM) [20]

| | |
|--------------------------------------|-------------------------|
| D-(+)-Glucose-Monohydrat | 25,0 g L ⁻¹ |
| L-Glutaminsäure | 2,5 g L ⁻¹ |
| D-Glucuronsäure | 4,0 g L ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 g L ⁻¹ |
| MgSO ₄ x H ₂ O | 2,0 g L ⁻¹ |
| Mineralien-Lösung (A) | 10,0 mL L ⁻¹ |
| Spurenelementlösung (B) | 1,0 mL L ⁻¹ |
| Vitaminlösung (C)* | 1,0 mL L ⁻¹ |

*sterilfiltrierte Stammlösung; Zugabe nach dem Autoklavieren der Kulturmedien

(A)

| | |
|--|------------------------|
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 3,67 g L ⁻¹ |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 3,08 g L ⁻¹ |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 2,20 g L ⁻¹ |
| + 10 Tropfen HCl (konz.) | |

(B)

| | |
|--|-------------------------|
| Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O | 14,1 g L ⁻¹ |
| CuSO ₄ x 6 H ₂ O | 0,784 g L ⁻¹ |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,081 g L ⁻¹ |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x H ₂ O | 0,094 g L ⁻¹ |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,081 g L ⁻¹ |
| SnCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,038 g L ⁻¹ |
| HCl (konz.) | 2,0 mL L ⁻¹ |

(C)

| | |
|-------------------------|------------------------|
| myo-Inosit | 1,0 g L ⁻¹ |
| Thiamin-Hydrochlorid | 1,0 g L ⁻¹ |
| Pyridoxal-Hydrochlorid | 0,1 g L ⁻¹ |
| Nicotinsäure | 0,1 g L ⁻¹ |
| Ca-D-Panthotenat | 0,1 g L ⁻¹ |
| p-Aminobenzoesäure | 0,1 g L ⁻¹ |
| Riboflavin | 0,1 g L ⁻¹ |
| Biotin | 0,03 g L ⁻¹ |
| Folsäure | 0,01 g L ⁻¹ |
| Vitamin B ₁₂ | 0,01 g L ⁻¹ |

pH-Wert: mit 2 N NaOH auf pH 4,0 vor dem Autoklavieren eingestellt

4.4.3 Nährmedien

4.4.3.1 SNL-H-doppelt

Zusammensetzung wie SNL-H, aber mit höherer Konzentration an Hefeextrakt

| | |
|-------------|-----------------------|
| Hefeextrakt | 6,0 g L ⁻¹ |
|-------------|-----------------------|

4.4.3.2 Holzmehl-Medium

Zusammensetzung wie SNL-H, aber Zusatz von Holzmehl zum Medium

| | |
|----------|-----------------------|
| Holzmehl | 2,0 g L ⁻¹ |
|----------|-----------------------|

4.4.3.3 SNL-H-Gln

Ersatz der Stickstoffquelle Asparagin-Monohydrat durch Glutamin, ansonsten wie SNL-H

| | |
|----------|-----------------------|
| Glutamin | 4,5 g L ⁻¹ |
|----------|-----------------------|

4.4.3.4 SNL-B₁-N

Ersatz der Stickstoffquelle Asparagin-Monohydrat durch andere Stickstoffquellen, ansonsten wie SNL-B₁

| | |
|-------------|-----------------------|
| N1—Glutamin | 4,5 g L ⁻¹ |
|-------------|-----------------------|

| | |
|-------------------|-----------------------|
| N2—Ammoniumsulfat | 4,0 g L ⁻¹ |
|-------------------|-----------------------|

| | |
|------------------------|-----------------------|
| N3—Universalpepton M66 | 6,0 g L ⁻¹ |
|------------------------|-----------------------|

4.4.3.5 SNL-B₁-C

Ersatz der Kohlenstoffquelle D-Glucose-Monohydrat durch andere Kohlenstoffquellen, ansonsten wie SNL-B₁

| | |
|------------|------------------------|
| C1—Maltose | 30,0 g L ⁻¹ |
|------------|------------------------|

| | |
|-----------|------------------------|
| C2—Stärke | 30,0 g L ⁻¹ |
|-----------|------------------------|

| | |
|------------|-------------|
| C3—Ethanol | 2,0 % (v/v) |
|------------|-------------|

4.4.3.6 Shiitake-Medium [19]

| | |
|-------------|------------------------|
| Malzextrakt | 20,0 g L ⁻¹ |
|-------------|------------------------|

| | |
|-------------|-----------------------|
| Hefeextrakt | 1,0 g L ⁻¹ |
|-------------|-----------------------|

pH-Wert: mit 2 N NaOH auf pH 7,0 vor dem Autoklavieren eingestellt

4.4.3.7 Malzextrakt-Sojapepton-Medium [18]

| | |
|---------------------------|------------------------|
| Malzextrakt | 30,0 g L ⁻¹ |
| Pepton aus Sojabohnenmehl | 5,0 g L ⁻¹ |

4.4.3.8 LEATHAM-Medium-schwefelfrei (LM-S-frei)

Ersatz der Sulfathaltigen Salze, ansonsten wie LM

| | |
|--|-------------------------|
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 2,3 g L ⁻¹ |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 35,6 mg L ⁻¹ |
| ZnCl ₂ | 10,9 mg L ⁻¹ |
| FeCl ₃ x 6 H ₂ O | 10,8 mg L ⁻¹ |
| CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,5 mg L ⁻¹ |

4.4.3.9 LEATHAM-Medium mit variiertes C-Quelle (LM-C)

Ersatz von D-Glucuronsäure durch D-Galakturonsäure, D-Gluconsäure bzw. Pektin, ansonsten wie LM

| | |
|---------------------|-----------------------|
| C1—Galakturonsäure | 4,0 g L ⁻¹ |
| C2—Gluconsäure | 4,0 g L ⁻¹ |
| C3—Pektin | 4,0 g L ⁻¹ |
| C4—Galakturonsäure | 3,0 g L ⁻¹ |
| Pektin | 1,0 g L ⁻¹ |
| C5— Galakturonsäure | 2,0 g L ⁻¹ |
| Pektin | 2,0 g L ⁻¹ |
| C6— Galakturonsäure | 1,0 g L ⁻¹ |
| Pektin | 3,0 g L ⁻¹ |

4.4.3.10 LEATHAM-Medium mit variierten Mangan-Konzentrationen (LM-Mn)

Ersatz der Mn-Quelle, ansonsten wie LM

| | |
|--|--------------------------|
| Mn1—MnSO ₄ x H ₂ O | 120,0 mg L ⁻¹ |
| Mn2—MnSO ₄ x H ₂ O | 60,0 mg L ⁻¹ |
| Mn3—MnSO ₄ x H ₂ O | 30,0 mg L ⁻¹ |
| Mn4—MnSO ₄ x H ₂ O | 3,0 mg L ⁻¹ |
| Mn5—MnSO ₄ x H ₂ O | 0,3 mg L ⁻¹ |
| Mn6—MnSO ₄ x H ₂ O | 0,03 mg L ⁻¹ |
| Mn7—ohne Zusatz von MnSO ₄ x H ₂ O | |

4.4.3.11 Optimiertes LEATHAM-Medium (LM-opt.)

Ersatz von D-Glucuronsäure durch ein Gemisch von D-Galakturonsäure und Pektin,
Ersatz der im LEATHAM-Medium vorhandenen Mn-Konzentration,
Entfernen der Medienbestandteile $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times \text{H}_2\text{O}$ und $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$,
ansonsten wie LEATHAM-Medium

| | |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Galakturonsäure | 3,0 g L ⁻¹ |
| Pektin | 1,0 g L ⁻¹ |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 60,0 mg L ⁻¹ |

4.4.3.12 Faktorieller Versuchplan (PLACKETT-BURMAN-Design) [21 23 128]

Von den im PLACKETT-BURMAN-Design eingesetzten Faktorkombinationen für die insgesamt 8 Medienparameter und 3 Dummyvariablen wurden jeweils Doppelbestimmungen angesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile in der niedrigen und hohen Konzentrationsstufe sind Tab 2-2 zu entnehmen. Für die Vitaminmischung bzw. Thiaminlösung wurde eine Stammlösung angesetzt, die sterilfiltriert erst nach dem Autoklavieren zupipettiert wurde.

Bei der Probenahme wurde zunächst die Kultur homogenisiert (Stufe 3, 10 s), anschließend jeweils aus den Parallelkolben 5 mL Probe entnommen und die Trockenmasse bestimmt (siehe 4.3.9.3).

Aus diesem Versuchsplan sollten die Effekte der Faktoren auf die Trockenmasse berechnet werden. Dazu wurden für jeden Faktor die Summe der Zielgrößen der Kombinationen mit hohem Konzentrationslevel gebildet und ebenso die Summe mit dem niedrigen Konzentrationslevel. Die Summe aus den Kombinationen mit niedrigen Konzentrationen wurde von der Summe mit den hohen Konzentrationen subtrahiert. Der mittlere Effekt jedes Faktors ergab sich aus der Division durch die Zahl der niedrigen bzw. hohen Konzentrationen eines Faktors innerhalb der Kombinationen.

4.4.4 Nährmedienbestandteile

Tab 4-3 Organische Nährmedienbestandteile

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Bestell-Nr. |
|------------------------|------------|--------------------|-------------|
| Agar-Agar | Merck | f.d. Mikrobiol. | 1.01614 |
| L-Asparagin-Monohydrat | Merck | reinst | 1.01565 |
| L-(+)-Cystein | Merck | f. biochem. Zwecke | 2838 |

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Bestell-Nr. |
|---------------------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| Ethanol, unvergällt | Kraul & Wilkening | redest. | 1170 |
| D-(+)-Galakturonsäure | Fluka | ~ 99% | 48280 |
| D-(+)-Glucose-Monohydrat | Merck | f.d. Mikrobiol. | 1.08342 |
| D-Gluconsäure-Na-Salz | Sigma | ~ 99% | G-9005 |
| D-Glucuronsäure-Na-Salz | Sigma | - | G-8645 |
| L-Glutamin | | - | 101806 |
| L-Glutaminsäure | Fluka | > 99% | 49450 |
| Hefeextrakt | Merck | f.d. Mikrobiol. | 1.03753 |
| Maltose | Sigma | 90-95% | M-2250 |
| Malzextrakt | Merck | f.d. Mikrobiol. | 1.05391 |
| L-Methionin | Fluka | > 99% | 64320 |
| Pektin aus Zitruschalen | Fluka | - | 76280 |
| Pepton aus Sojabohnenmehl | Merck | f.d. Mikrobiol. | 7212 |
| Stärke | Riedel-de-Haen | p.a. | 33615 |
| Universalpepton M66 | Merck | f.d. Mikrobiol. | 7043 |

Tab 4-4 Anorganische Nährmedienbestandteile

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Bestell-Nr. |
|---|-------------------|---------------------|--------------------|
| $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | Riedel-de-Haen | p.a. | 31307 |
| $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | Riedel-de-Haen | rein | 12914 |
| $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | Fluka | > 97% | 61169 |
| $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ | Fluka | > 99% | 61245 |
| $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | Riedel-de-Haen | p.a. | 31110 |
| $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | Riedel-de-Haen | - | 12319 |
| KH_2PO_4 | Merck | f.d. Molekularbiol. | 1.12034 |
| $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ | Fluka | > 99% | 63072 |

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Bestell-Nr. |
|--|-------------------|-----------------|--------------------|
| MgSO ₄ x 3 H ₂ O | Riedel-de-Haen | reinst | 13143 |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | Merck | reinst | 5926 |
| Na ₂ S | Fluka | puriss. p.a. | 71975 |
| Na ₂ S ₂ O ₃ | Merck | p.a. | 6516 |
| NiCl ₂ x 6 H ₂ O | Riedel-de-Haen | reinst | 13613 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x H ₂ O | Fluka | > 99% | 09878 |
| SnCl ₂ x 2 H ₂ O | Fluka | > 98% | 96528 |
| ZnCl ₂ | Fluka | > 98% | 96470 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | Fluka | puriss. p.a. | 96500 |

Tab 4-5 Vitamine und Minorkomponenten

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Bestell-Nr. |
|-------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| p-Aminobenzoesäure | Fluka | > 99% | 06930 |
| (+)-Biotin | Fluka | > 99% | 14400 |
| Ca-D-Pantothenat | Fluka | > 99% | 21210 |
| Folsäure | Fluka | > 97% | 47620 |
| myo-Inosit | Fluka | > 99,5% | 57569 |
| Nicotinsäure (Niacin) | Fluka | > 99,5% | 72309 |
| Pyridoxal-Hydrochlorid | Merck | f. biochem. Zwecke | 7523 |
| Riboflavin | Dr. Marcus | - | 031116 |
| Thiamin-hydrochlorid | Fluka | > 99% | 95160 |
| Vitamin B ₁₂ | Fluka | > 98% | 95190 |

4.5 Geräte in der Mikrobiologie

4.5.1 Steriles Arbeiten

| | |
|--------------------------|---|
| Vertikal-Autoklav | VST 50/70 mit Dampfgenerator, Zirbus-Apparatebau, Osterode/Harz |
| Steril-Werkbank | Laminar-Flow 821/825, Stangl Reinraum- und Prozesstechnik, München |
| Sicherheitswerkbank | CA/RE 4, Clean Air, Hilden |
| Sterilfiltrationseinheit | Sartorius AG, Göttingen |
| | Membranfilter (Porengröße 0,45 µm), Cellulose-Acetat, Schleicher & Schüll |
| | Sterilfilter f. wässr. Lösungen Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm), Cellulose-Acetat, Roth |

4.5.2 Kultivierung

| | |
|------------------------------|---|
| Inkubationsschüttelmaschinen | Multitron, Infors AG, Bottmingen (CH) mit Umlaufkühler: FC 1000, Julabo, Seelbach |
| Ultra-Turrax | TP 18/10, 170 W, max. 20 000 rpm (Stufe 10), Janke&Kunkel |
| Brutschrank | BE 500, Memmert |

4.5.3 Aufarbeitung

| | |
|---------------------|---|
| Kühlzentrifuge | Varifuge 20 RS, Heraeus Sepatech, Osterode/Harz Zentrifugenbecher: 250 mL Polypropylen und 50 mL Polycarbonat, Nalgene |
| Tischzentrifuge | Typ 03400, Heraeus, Osterode/Harz |
| Rührwerkskugelmühle | DYNO-Mill Typ KDL, Willy A. Bachofen AG, Basel (CH) <u>Mahlbehälter:</u> 0,15 L (diskontinuierlich) und 0,6 L (kontinuierlich) |

4.5.4 Bioreaktor

Labortischfermenter Typ ISF-100, Infors GmbH, Einsbach

| | |
|--------------------------|---|
| Kulturgefäß | 5 L Doppelmantelgefäß mit externer Wasserkühlung |
| Sauerstoffelektrode | Ingold, Nr. 322 756 701, Steinbach/Taunus; nach dem Autoklavieren für 8 h polarisiert, kalibriert mit N ₂ (Nullabgleich) und O ₂ (100%) |
| pH-Elektrode | Mettler-Toledo Nr. 10 465-35-SC-P-K9; vor dem Autoklavieren auf pH 4,0 und 7,0 kalibriert |
| Druckluft | Membrankompressor (Druck: 0,6 bar), sterilfiltriert über einen PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midi-sart 2000, 0,2 µm Porengröße) |
| Belüftung | Luftrohr (a.D. 8 mm / zum Bioreaktor gehörend), Durchflußvolumen von 0,5-1 L min ⁻¹ ; 01, - 0,2 vvm |
| Abluft | PTFE-Membranfilter (s.o.) als Sterilbarriere |
| Kultivierungsbedingungen | 24 °C, 220 rpm |

4.6 Chemikalien, Lösungsmittel, Gase und sonstige Geräte

4.6.1 Chemikalien

Tab 4-6 Chemikalien für die Analytik

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Bestell-Nr. |
|--------------------------------------|----------------|-----------------------|-------------|
| Amberlite IR 120 | Fluka | - | 06428 |
| 1-Aminoadamantan (ADAM) | Fluka | ~ 97% | 06649 |
| Ammoniak (25%) | Riedel-de-Haen | reinst | 05003 |
| Borsäure | Fluka | puriss. | 15660 |
| Celite® 545 | Fluka | purified and calcined | 22140 |
| Eisessig | Baker | HPLC | 6152 |
| 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC) | Fluka | puriss. | 23186 |

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Bestell-Nr. |
|---|-------------------|-----------------|--------------------|
| KH ₂ PO ₄ | Merck | p.a. | 1.04873 |
| K ₂ HPO ₄ | Fluka | puriss. | 60356 |
| NaCl | AppliChem | reinst | A-1317 |
| Na ₂ SO ₄ | Riedel-de-Haen | reinst | 13464 |
| NaOH | Fluka | puriss. | 71690 |
| Ninhydrin | Merck | p.a. | 6762 |
| Salzsäure (37%) | Riedel-de-Haen | reinst | 07102 |
| Sephadex [®] DEAE A-25 (40 – 120 µm) | Fluka | - | 84956 |

4.6.2 Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Gebrauch redestilliert, ebenso wie Fassware über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt. Die Redestillate wurden nach einer Reinheitskontrolle wieder eingesetzt.

Tab 4-7 Lösungsmittel

| Bezeichnung | Hersteller | Reinheit | Verwendung |
|--------------------|-------------------|-----------------|----------------------------|
| Aceton | Hoechst | redest. | Reinigung; Derivatisierung |
| Acetonitril | Roth | HPLC | HPLC |
| 1-Butanol | | redest. | DC |
| Dichlormethan | Hoechst | redest. | Fließmittel |
| Diethylether | Kraemer & M | redest. | Extraktion |
| Methanol | Bayer | redest. | Aufarbeitung |
| Pentan | BASF | redest. | Extraktion |
| 2-Propanol | | redest. | DC |
| Tetrahydrofuran | Fluka | HPLC | HPLC |

4.6.3 Gase

Die Außenluft wurde über einen Staubfilter angesaugt und durch einen Membrankompressor komprimiert. Nach anschließender Trocknung an einem Wasserabscheider und an einer Silicagel-Patrone wurde die Luft für die GC verwendet.

Tab 4-8 Gase

| Bezeichnung | Qualität | Verwendung | Lieferant |
|-------------|------------|---------------------------|------------|
| Druckluft | getrocknet | Detektorgas/ Hilfsgas | Kompressor |
| Helium | 5.0 | Trägergas (GC/MS; GC/AED) | Linde |
| Stickstoff | 5.0 | Spülgas | Linde |
| Wasserstoff | 5.0 | Trägergas/Detektorgas | Linde |

4.6.4 Sonstige Laborgeräte

| | |
|---------------------|--|
| Lichtmikroskop | Will H-500, Hunt GmbH |
| pH-Meter | Calimatic 761, Knick mit pH-Elektrode Knick SE 100 |
| Schlauchpumpe | PA-SF, Janke & Kunkel |
| Rotationsverdampfer | R 134a, Büchi (CH) |
| Waring Blendor | Waring, mit Glasaufsatz, V = 0,2 L |
| Rotor-Blender | Rotor GT 800, mit 1,5 L Glasaufsatz, Rotor AG, Uetendorf |

4.7 Probenvorbereitung

4.7.1 Aufarbeitung von Pilzen für die Isolierung von Lentinsäure

4.7.1.1 Rohextrakt aus getrockneten Fruchtkörpern

100 g getrocknete Shiitake-Pilze wurden mit 300 mL eisgekühltem Methanol versetzt und im Waring Blendor auf Stufe 2 homogenisiert. Der Rückstand wurde mit 1 L Eiswasser versetzt und erneut homogenisiert. Das Homogenat wurde noch 8 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend 30 min lang bei 4000 g (30 min; 10 °C) zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit Eiswasser aufgeschlämmt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Die Überstände wurden vereint und bei 40 °C im Vakuum eingengt. Das erhaltene Konzentrat wurde mit Wasser auf 300 mL aufgefüllt.

4.7.1.2 Rohextrakt aus frischen Fruchtkörpern

750 g frische Shiitake-Pilze wurden im Waring Blendor mit 750 mL eisgekühltem Methanol versetzt und 2 min lang homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit 250 mL Wasser versetzt und noch 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde abzentrifugiert (8000 g, 15 min, 10 °C) und der Rückstand mit Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden vereint und bei 40 °C im Vakuum eingengt. Das erhaltene Konzentrat wurde mit Wasser auf 300 mL aufgefüllt.

4.7.1.3 IR 120-Extrakt

Der Rohextrakt (4.7.1.1 bzw. 4.7.1.2) wurde auf die unter 4.8.1.1 vorbereitete Säule mit dem stark sauren Kationenaustauscher Amberlite IR 120 (H⁺-Form) gegeben (Durchlaufgeschwindigkeit: 1 Tropfen s⁻¹). Der Durchlauf wurde dünnschichtchromatographisch (4.8.2) mit Ninhydrin als Detektionsreagens auf Abwesenheit von Aminosäuren untersucht. Anschließend wurde der Ionenaustauscher mit 500 mL Wasser gewaschen und das Waschwasser ebenfalls dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Elution der Aminosäuren erfolgte mit 5%iger Ammoniak-Lösung in 100 mL Fraktionen, wobei jede der Fraktionen wiederum dünnschichtchromatographisch untersucht wurde. Die aktiven Fraktionen (2-7) wurden vereint und im Vakuum bei 40 °C bis zur Trockene eingengt, um sämtliche Reste der Ammoniak-Lösung zu entfernen, die die weitere Aufarbeitung stören würde. Der Rückstand wurde in 300 mL Wasser aufgenommen.

4.7.1.4 Sephadex® DEAE A-25-Extrakt

Der unter 4.7.1.3 gewonnene Extrakt wurde auf die unter 4.8.1.2 vorbereitete Säule mit dem schwach basischen Anionenaustauscher Sephadex® DEAE A-25 (Acetat-Form) gegeben (Durchlaufgeschwindigkeit: 1 Tropfen s⁻¹) und mit 200 mL Wasser gewaschen. Die im Durchlauf enthaltenen basischen und neutralen Aminosäuren bzw. Peptide wurden verworfen. Die Elution erfolgte als Stufenelution mit je 200 mL Essigsäure pro Konzentrationsstufe in Konzentrationen wie unter 4.8.1.2 beschrieben. Von den aufgefangenen 10 mL Fraktionen wurde jede zweite dünnschichtchromatographisch untersucht. Die aktiven Fraktionen wurden vereint und im Vakuum bei 40 °C eingengt.

Zur Kristallisation der Lentinsäure wurde der Rückstand mit wenig heißem Wasser versetzt, bis sich gerade alles gelöst hat und dann tropfenweise mit Ethanol versetzt, bis zum Auftreten einer beständigen Trübung. Die Lösung wurde über Nacht bei 0 °C zur vollständigen Kristallisation stehen gelassen anschließend die Kristalle abgesaugt, mit eiskaltem Ethanol gewaschen und getrocknet.

4.7.2 Aufarbeitung von Pilzen zur Gewinnung der Aromastoffe

4.7.2.1 Rohextrakt

300 g frische Shiitake-Pilze wurden im Rotor-Blender mit 700 mL Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,0) versetzt und 2 min lang auf höchster Stufe homogenisiert. Das Homogenat wurde in eine 1 L Glasflasche mit Schraubverschluß überführt und für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat bei 7200 g (7 °C, 20 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und der in 4.7.2.2 beschriebenen Extraktionsmethode zugeführt, während der Rückstand mittels Soxhlet-Extraktion (siehe 4.7.2.3) weiter aufgearbeitet wurde.

4.7.2.2 Kontinuierliche Flüssig/Flüssig-Extraktion

Der in 4.7.2.1 gewonnene Rohextrakt wurde mit 5% NaCl-Lösung auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt und in eine kontinuierlich arbeitende Flüssig/Flüssig-Extraktionsanlage überführt und mit Pentan / Diethylether (1:1,12) als Lösungsmittel extrahiert (Dauer ca. 20 h, 40 °C Wasserbad-Temperatur der Lösungsmittelvorlage, Kühlung mit Methanol, -20 °C). Nach Beendigung der Extraktion wurde die organische Phase abgetrennt über Na₂SO₄ für 12 h getrocknet und bei 40 °C Wasserbad-Temperatur an einer Vigreux-Kolonnen eingeeengt. Der Extrakt wurde für GC-AED (siehe 4.8.4.3), GC-MS (siehe 4.8.4.2) und GC-O (siehe 4.8.4.1) eingesetzt.

4.7.2.3 Soxhlet-Extraktion

Der Rückstand aus 4.7.2.1 wurde mit Celite[®] verrieben und in eine Extraktionshülse gefüllt. Die Extraktion erfolgte in einer Extraktionsapparatur mit Soxhlet-Extraktor mit Pentan/Diethylether (1:1,12) als Lösungsmittel (Dauer ca. 20 h, 40 °C Wasserbadtemperatur der Lösungsmittelvorlage, Kühlung mit Methanol, -20 °C). Nach Beendigung der Extraktion wurde die organische Phase abgetrennt über Na₂SO₄ für 12 h getrocknet und bei 40 °C Wasserbad-Temperatur an einer Vigreux-Kolonnen eingeeengt. Der Extrakt wurde für GC-AED (siehe 4.8.4.3), GC-MS (siehe 4.8.4.2) und GC-O (siehe 4.8.4.1) eingesetzt.

4.7.3 Aufarbeitung von Pilzmycel aus Submerskulturen für die HPLC

Die Submerskulturen wurde vollständig in Zentrifugenbecher (250 mL, Polypropylen) überführt und das Pilzmycel durch Zentrifugation bei 8000 g (20 min; 7 °C) vom Kulturmedium abgetrennt. Um Medienreste zu entfernen, wurden die Zellen in 50 mL 0,9% NaCl-Lösung suspendiert, kurz geschüttelt und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor abzentrifugiert. Die so gewonnene Pilzmasse wurde mit 20 mL Methanol versetzt. Der Aufschluß des Pilzmycels erfolgte in einer Rührwerkskugelmühle zur Naßvermahlung (siehe 4.5.3). Die Mühle war mit einem doppelwandigen Mahlbehälter ($V = 0.15$ L, Durchflußkühlung) für eine diskontinuierliche Aufarbeitung ausgestattet. Das Mahlgefäß wurde mit 80 mL Glasperlen (0,5 mm \varnothing , bleifrei, Braun Biotech) und 10 g Pilzmycel in 20 mL Methanol befüllt und mit 50 mL Methanol/Wasser, 70:30 versetzt. Die Aufschlußzeit betrug 30 min bei -5 °C und 4000 Umdrehungen min^{-1} . Das Homogenat wurde von den Glasperlen durch Dekantieren abgetrennt, und die Glasperlen wurden mehrmals mit insgesamt 170 mL Wasser gewaschen. Das Homogenat wurde mit dem Waschwasser vereint und die Zelltrümmer sowie ausgefallene Proteine bei 36000 g (30 min, 1 °C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und bei 40 °C im Vakuum bis fast zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in 0,1 M Salzsäure aufgenommen, in einen 10 mL Meßkolben überführt und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Diese Lösung wurde erneut bei 36000 g (30 min, 1 °C) zentrifugiert. Die so gewonnene Lösung wurde direkt zur HPLC (Bedingungen und Derivatisierung siehe 4.8.3) eingesetzt.

4.7.4 Aufarbeitung von Pilzmycel aus dem Bioreaktor

Der gesamte Inhalt des Kulturgefäßes (5 L) wurde durch den Probenahmestutzen des Reaktors abgelassen. Die Abtrennung des Pilzmycels von dem Kulturmedium erfolgte durch Filtration durch ein Käsetuch. Die gesamte Frischmasse wurde mit 1 L Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,0) versetzt und im Eisbad gekühlt. Der Aufschluß der Pilzzellen erfolgte in einer Rührwerkskugelmühle mit kontinuierlichem Betrieb, die mit einem doppelwandigen Mahlgefäß (Fassungsvermögen $V = 0,6$ L) ausgestattet war. Dieses wurde mit 480 mL Glasperlen (0,5 mm \varnothing , bleifrei) befüllt. Die Separierung der Mahlkörper vom Mahlgut erfolgte durch einen dynamischen Spaltseparator (Spaltbreite 0,05 mm). Das Homogenat wurde mittels eines Auslaufrohres in eine gekühlte Vorlage abgeführt. Die Zufuhr des vorgekühlten Pilzmycels in Puffer erfolgte durch eine Schlauchpumpe.

Die Aufschlußzeit betrug 15 min bei -10 °C und $4000\text{ Umdrehungen min}^{-1}$. Dabei wurden mehrere Mahldurchgänge vorgenommen, indem das ablaufende Homogenat dem Mahlbehälter wieder zugeführt wurde, um einen vollständigen Aufschluß zu erzielen. Nach Beendigung des Mahlvorgangs wurden die Glasperlen mit jeweils 250 mL Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,0) und 5% NaCl-Lösung gewaschen und diese Waschlösungen dem Homogenat hinzugefügt. Die vereinten Lösungen wurden in eine Glasflasche mit Schraubverschluß überführt und für 2 h unter Rühren bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlen im Eisbad wurde das Homogenat bei 7200 g (7 °C , 20 min) zentrifugiert. Mit dem Überstand bzw. dem Zentrifugierrückstand wurde wie unter 4.7.2.2 bzw. 4.7.2.3 verfahren.

4.8 Analytik

4.8.1 Ionenaustauschchromatographie

4.8.1.1 Stark saurer Kationenaustauscher Amberlite IR 120

Eine Glassäule (30 x 4 cm), wurde mit dem stark sauren Kationenaustauscher Amberlite IR 120 (Na^+ -Form) befüllt (Füllhöhe ca. 20 cm) und über Nacht in Wasser quellen lassen. Das Austauscherharz wurde mit 2 M Salzsäure in die H^+ -Form überführt und mit Wasser neutral (Test mit pH-Papier) gewaschen. Nach Beschickung mit der Probelösung wurde erneut mit Wasser gewaschen. Die Elution der Aminosäuren erfolgte mit 5%iger Ammoniak-Lösung.

Zur Regeneration der Säule (Überführung in die H^+ -Form) wurde zunächst mit Wasser neutral gewaschen und anschließend erneut mit 2 M Salzsäure behandelt, bis der Durchlauf sauer (pH-Papier) reagierte. Der Überschuß an Salzsäure wurde durch Waschen mit Wasser entfernt.

4.8.1.2 Schwach basischer Anionenaustauscher Sephadex[®] DEAE A-25

Eine Glassäule (30 x 4 cm) wurde mit einer wässrigen Aufschlammung aus 25 g schwach basischem Anionenaustauscher Sephadex[®] DEAE A-25 befüllt (Füllhöhe nach dem Absetzen ca. 17 cm). Um den Austauscher in die Acetat-Form zu bringen, wurde mit 5%iger Essigsäure perkoliert und anschließend mit Wasser neutral (pH-Papier) gewaschen. Nach Aufgabe der Probelösung wurde erneut mit Wasser gewaschen, bis der Durchlauf aminosäurefrei (Test mit Ninhydrin) war. Die Elution der Aminosäuren erfolgte durch eine 5-stufige Gradientenelution mit Essigsäure (0,5%, 1,6%; 2,7%; 3,8%; 4,9%; 6,0%).

Zur Regeneration der Säule wurde mit Wasser neutral gewaschen.

4.8.2 Dünnschichtchromatographie

| | |
|-----------------|--|
| Schicht: | Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20 x 20 cm, 0,2 mm (Merck) |
| Fließmittel I: | 1-Butanol/ Essigsäure/ Wasser/ 2-Propanol, 40:10:15:25; Kammersättigung |
| Fließmittel II: | 2-Propanol/ 17%ige Ammoniak-Lsg., 70:30 |
| Detektion: | 0,4% Ninhydrin in Aceton |

4.8.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

4.8.3.1 HPLC mit Fluoreszenzdetektor

| | |
|-------------------|--|
| Pumpe: | Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump |
| Injektionsventil: | Rheodyne 7125 mit 20 µL Probenschleife |
| Vorsäule: | LiChroCart [®] 4-4, Lichrospher 100, RP-8 (5 µm) |
| Säule: | LichroCart [®] Superspher 60 RP-8, 250 mm x 4 mm (Merck) |
| Säulenofen: | Techlab Kühlöfen K1; 40,0 ± 0,1 °C |
| Degaser: | Jasco 3-Line Degaser DG-980-50 |
| Gradientenformer: | Jasco Ternary Gradient Unit LG-980-02 |
| Detektor: | Gynkotheek Fluorescence Spectromonitor RF 530, mit analytischer Meßzelle $\lambda_{\text{Ex}} = 263 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 313 \text{ nm}$ |
| Datenaufnahme: | Gynkotheek C-R3A |
| Fließmittel A: | 0,1 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,6/ THF (v/v//95/5) |
| Fließmittel B: | Acetonitril |
| Flußrate: | 1,0 mL min ⁻¹ |

Gradient:

| Zeit t [min] | Fließmittel A [%] | Fließmittel B [%] |
|--------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 88 | 12 |
| 10 | 80 | 20 |
| 20 | 72 | 28 |
| 25 | 70 | 30 |
| 35 | 45 | 55 |
| 40 | 0 | 100 |
| 45 | 0 | 100 |
| 50 | 88 | 12 |
| 60 | 88 | 12 |

Derivatisierung:

Vorsäulenderivatisierung

Probe bzw. Standard

40 µL

+ 0,4 M Boratpuffer, pH 7,7

200 µL

+ 3 mM FMOC-Cl

200 µL

⇒ mischen, 1 min Reaktionszeit

+ 40 mM ADAM

200 µL

⇒ mischen, 1 min Reaktionszeit

Verdünnung:

Derivatlösung

20 µL

Verdünnungslösung*

380 µL

* 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 4,6/ Acetonitril 4:1

4.8.3.2 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)

HPLC-System:

HP 1100, mit Autosampler, Gradientenpumpe Diode-Array-Detektor, Hewlett Packard, Waldbronn

Quadrupol-Massenspektrometer:

VG Platform II, Micromass, Manchester

Ionisation:

Elektrospray-Ionisation (ES+), 1,0 V

Massenbereich:

 m/z 80-12000

Datenaufnahme:

MassLynx 3.2 (Micromass)

4.8.4 Kapillargaschromatographie

4.8.4.1 HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion (GC-O)

| | |
|---------------------|--|
| Gaschromatograph: | Satochrom (Sato) |
| Injektor: | Cold on column, 40 °C |
| Trennsäule: | MN Optima-5-MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Macherey & Nagel |
| Detektor: | Flammenionisationsdetektor (FID), 290 °C |
| Trägergas: | H ₂ ; Vordruck 50 kPa; Fluß: |
| Detektorgase: | H ₂ : 50 kPa; Luft: 100 kPa |
| Datenaufnahme: | Chrom Card (CE Instruments) Version 1.19 |
| Temperaturprogramm: | 40 °C (5 min), 4 °C min ⁻¹ - 200 °C (10 min), 8 °C min ⁻¹ – 320 °C (10 min) |

4.8.4.2 HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor (GC-MS)

| | |
|---------------------|--|
| Gaschromatograph: | GC 8000 (Fisons) |
| Injektor: | Cold on column, 40 °C |
| Trennsäule: | MN Optima-5-MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Macherey & Nagel |
| Detektor: | MD 800 (Fisons) |
| Trägergas: | He; Vordruck 50 kPa |
| Temperaturen: | Ionenquelle 200 °C, Interface 230 °C, Quadrupol Massenfilter 100 °C |
| Ionisation: | Elektronenstoßionisation 70 eV |
| Massenbereich: | <i>m/z</i> 33-300 |
| Datenaufnahme: | Masslab Version 1.3 (Fisons) |
| Temperaturprogramm: | 40 °C (5 min), 4 °C min ⁻¹ - 200 °C (10 min), 8 °C min ⁻¹ – 320 °C (10 min) |

4.8.4.3 HRGC mit Atom-Emission-Detektor (AED)

| | |
|-------------------------|---|
| Gaschromatograph: | Hewlett Packard Gaschromatograph HP 6890 |
| Injektor: | Kaltaufgabesystem KAS 4, Gerstel, Mühlheim/Ruhr, 40 °C |
| Cavity: | 300 °C |
| Xferline: | 300 °C |
| Trennsäule: | MN Optima-5-MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Ma- cherey & Nagel |
| Temperaturprogramm: | 40 °C (5 min), 4 °C min ⁻¹ - 200 °C (10 min), 8 °C min ⁻¹ - 320 °C (10 min) |
| Detektor: | Atomic Emission Detector HP G2350, Hewlett Pa- ckard Kohlenstoffspur: C 193 nm Schwefel Spur: S 181 nm |
| Trägergas: | He = 20 psi |
| Reaktandgase: | H ₂ = 30 psi; O ₂ = 30 psi |
| Spülgas (Spektrometer): | N ₂ = 0,5 L min ⁻¹ |
| Auswertestation: | HP GC ChemStation A.04.05 |
| Temperaturprogramm: | 40 °C (5 min), 4 °C min ⁻¹ - 200 °C (10 min), 8 °C min ⁻¹ - 320 °C (10 min) |

4.8.4.4 Berechnung von Kovats-Indices

Die Kovats-Indices wurden nach folgender Formel berechnet:

$$KI = 100 \cdot N + 100 \cdot n \cdot \frac{(\log t'_A - \log t'_N)}{(\log t'_{N+n} - \log t'_N)}$$

| | | | |
|------|----|---|---|
| mit: | N | = | Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyt eluiert |
| | n | = | Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans |
| | A | = | Analyt |
| | t' | = | relative Retentionszeit = Retentionszeit t – Totzeit t ₀ |

4.8.5 Elementaranalyse

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| Gerät | Elementar Vario EL |
| | Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff |
| Schwefel: | Atom Scan 16, Thermo Jarrel Ash |

4.8.6 Spektroskopische Methoden

4.8.6.1 Infrarot-Spektroskopie (IR)

| | |
|-----------------|---|
| IR-Spektrometer | Perkin Elmer Paragon 1000 PC FTIR |
| Datenauswertung | GRAMS Analyst |
| KBr-Preßling | 2 mg Substanz wurden mit ca. 50 mg KBr ca. 2 min lang gemörstert und anschließend 10 min lang bei einem Druck von 10 t zu einer Pille gepreßt. Die Messung erfolgte gegen einen Preßling nur aus KBr. |

4.8.6.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

| | |
|------------------------------|---|
| NMR-Spektrometer | Varian Unity 500 spectrometer (500 MHz) |
| Lösungsmittel | D ₂ O |
| Interner Standard | Tetramethylsilan (TMS) |
| Temperatur | 25 °C |
| Abkürzungen der Signalformen | s = Singulett d = Dublett t = Triplett m = Multiplett |
| Meßverfahren | ¹ H-NMR ¹³ C-NMR ¹ H- ¹ H-Relay-COSY (H-H-Korrelation) ¹³ C- ¹ H-GHSQC (C-H-Korrelation) DEPT |

4.9 Entsorgungshinweise

4.9.1 Biologisches Material

Sämtliche Kulturen und Kulturreste wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Nach Abtrennung des Mycels wurde das Medium in das Laborabwasser und die Mycelrückstände in den Laborabfall gegeben.

4.9.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch die verwendeten Aufarbeitungsverfahren sowie durch die weitgehende Wiederverwendung destillativ aufgereinigter Lösungsmittel auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogener Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht wiederverwertbare Lösungsmittel wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel

Ebenso wie andere Sonderabfälle wurden diese Lösungsmittel der zentralen Entsorgung der Universität Hannover zugeführt.

5 Literatur

- [1] Schwantes H.O.: Biologie der Pilze, Eugen Ulmer, Stuttgart (1996), S. 14-20
- [2] Chang S.T. Cultivated mushrooms, in: Handbook of Applied Mycology, Vol.3 : Foods and Feeds (Arora D.K., Mukerji K.G., Marth E.H, Hrsg.), Marcel Dekker, New York (1991)
- [3] Schwantes H.O.: Biologie der Pilze, Eugen Ulmer, Stuttgart (1996), S. 171-188
- [4] Ruttloff H., Proll J., Leuchtenberger A.: Lebensmittel-Biotechnologie und Ernährung, Springer, Berlin (1997)
- [5] Rajarathnam S., Shashirekha M.N.J., Bano Z. Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: Present and future strategies, *Crit. Rev. Biotechnol.* **18** (1998), S. 91-236
- [6] Chang S.T., Miles P.G. Recent trends in world production of cultivated mushrooms, *Mushroom J.* **503** (1991), S. 15-18
- [7] Jong S.C., Birmingham J.M. Medicinal and therapeutic value of the Shiitake mushroom, *Adv. Appl. Microbiol.* **39** (1993), S. 153-184
- [8] Eder J., Weig C. Pilze als Arzneipflanzen, *Ernährungs-Umschau* **35** (1988), S. 396-398
- [9] Mizuno T. Shiitake, *Lentinus edodes*: Functional properties for medicinal and food purposes, *Food Rev. Int.* **11** (1995), S. 111-128
- [10] Ito T. Cultivation of *Lentinus edodes*, in: The biology and cultivation of edible mushrooms (Chang S.T., Hayes W.A., Hrsg.), Academic Press, New York (1978), S. 461-473
- [11] Ohga S., Kitamoto Y. Future of mushroom production and biotechnology, *Food Rev. Int.* **13** (1997), S. 461-469
- [12] Lelley J.: Pilzanbau - Biotechnologie der Kulturspeisepilze, 2. Aufl., Eugen Ulmer, Stuttgart (1991)
- [13] Rohrbach M.-L. Biotechnologische Untersuchungen über den Shii-Take (*Lentinus edodes* (BERK.) Sing.) zur Fruchtkörpererzeugung, Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (1986)
- [14] Schünemann G. Biotechnologische Untersuchungen über Möglichkeiten des Intensivanbaus von Shii-Take (*Lentinus edodes*) (BERK.) SING., Dissertation, Universität Oldenburg (1988)
- [15] Abraham B. Flüchtige Metabolite in Submerskulturen lignolytischer Pilze (Klasse Basidiomycetes), Dissertation, Universität Hannover (1994)

-
- [16] Sprecher E. Über die Guttation bei Pilzen, *Planta* **53** (1959), S. 565-574
- [17] Sugimori T., Oyama Y., Omichi T. Studies on Basidiomycetes, *J. Ferment. Technol.* **49** (1971), S. 435-446
- [18] Kirchhoff B., Lelley J. Investigations of Shiitake (*Lentinus edodes* (Berk.) Singer) bag-log cultivation to increase the yield in Germany, in: Science and cultivation of edible fungi (Maher, Hrsg.), Balkema, Rotterdam (1991), S. 509-516
- [19] Atlas R.M.: Handbook of microbiological media (Parks L.C., Hrsg.), 2. Aufl., CRC Press, Boca Raton (1997), S. 1253
- [20] Leatham G.F. A chemical defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*, *Mycologia* **75** (1983), S. 905-908
- [21] Greasham R., Inamine E. Nutritional improvement of processes, in: Manual of industrial microbiology and biotechnology (Demain A.L., Solomon N.A., Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1986), S. 41-48
- [22] Plackett R.L., Burman J.P. The design of optimum multifactorial experiments, *Biometrika* **33** (1946), S. 305-325
- [23] Erhardt V., Seppelt B. Anwendung statistischer Versuchspläne, in: Industrielle Enzyme (Rutloff H., Hrsg.), 2. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg (1994), S. 517-553
- [24] Yasumoto K., Iwami K., Mitsuda H. A new sulfur-containing peptide from *Lentinus edodes* acting as a precursor for lenthionine, *Agric. Biol. Chem.* **35** (1971), S. 2059-2069
- [25] N'Galamulume-Treves M. Untersuchungen über Geruchs- und Aroma-Precursors - Lentinsäure und Epilentsäure - in einigen *Collybia*- und *Micromphale*-Arten, Dissertation, Freie Universität Berlin (1979)
- [26] Luxa H.-H. Untersuchung über die Bildung des Knoblauchgeruchs in drei *Marasmius*-Arten, Dissertation, Freie Universität Berlin (1976)
- [27] Gmelin R., Luxa H.-H., Roth K., Höfle G. Dipeptide precursor of garlic odour in *Marasmius* species, *Phytochemistry* **15** (1976), S. 1717-1721
- [28] Höfle G., Gmelin R., Luxa H.-H., N'Galamulume-Treves M., Hatanaka S.I. Struktur der Lentinsäure 2-(γ -Glutamylamino)-4,6,8,10,10-Pentaoxo-4,6,8,10-Tetrathiaundecansäure, *Tetrahedron Lett.* **36** (1976), S. 3129-3132
- [29] Gmelin R., N'Galamulume-Treves M., Höfle G. Epilentsäure, ein neuer Aroma- und Geruchs-Precursor in *Tricholoma*-Arten, *Phytochemistry* **19** (1980), S. 553-557
- [30] Lottspeich F., Zorbas H.: Bioanalytik, Spektrum, Heidelberg (1998)
- [31] McLafferty F.W., Turecek F.: Interpretation von Massenspektren, Spektrum, Heidelberg (1995)

- [32] Beinert W.-D., Meisner A., Fuchs M., Riedel E., Lüpke M., Brückner H. OPA oder FMOC?, *GIT Fachz. Lab.* **10** (1992), S. 1018-1027
- [33] Ogden G., Földi P. Amino acid analysis: An overview of current methods, *LC-GC Int.* **5** (1992), S. 29-40
- [34] Einarrson S., Joseffsson B., Lagerkvist S. Determination of amino acids with 9-Fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* **282** (1983), S. 609-618
- [35] Einarrson S. Selective determination of secondary amino acids using precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* **348** (1985), S. 213-220
- [36] Taubert J. Verfahren zum Zellaufschluß von Basidiomyceten und Charakterisierung von Enzymen des Ferulasäurestoffwechsels, Diplomarbeit, Universität Hannover (1997)
- [37] Betnér I., Földi P. The FMOC-ADAM approach to amino acid analysis, *LC-GC Int.* **2** (1989), S. 45-53
- [38] Betnér I., Földi P. New automated amino acid analysis by HPLC precolumns derivatization with Fluorenylmethyloxycarbonylchloride, *Chromatographia* **22** (1986), S. 381-387
- [39] Lüpke M. Entwicklung und Anwendung von Reagenzien und Verfahren zur achiralen und chiralen Analytik von Aminosäuren mittels GC und HPLC, Dissertation, Universität Hohenheim (1996)
- [40] <http://www.cbs.knaw.nl>, Centralbureau voor Schimmelcultures, Nederlande (1998)
- [41] Skoog D.A., Leary J.J.: Instrumentelle Analytik, Springer, Berlin (1996)
- [42] Chen C.-C., Ho C.-T. Identification of sulfurous compounds of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), *J. Agric. Food Chem.* **34** (1986), S. 830-833
- [43] Drumm T.D., Spanier A.M. Changes in the content of lipid autoxidation and sulfur-containing compounds in cooked beef during storage, *J. Agric. Food Chem.* **39** (1991), S. 336-343
- [44] Chen C.-C, Liu S.-E., Wu C.-M., Ho C.-T. Enzymic formation of volatile compounds in Shiitake mushroom (*Lentinus edodes* Sing.), in: Biogeneration of aromas, ACS symposium series; 317 (Parliament T.H., Hrsg.), American Chemical Society, Washington, D.C. (1986), S. 176-181
- [45] Kameoka H., Higuchi M. The constituents of the steam volatile oil from *Lentinus edodes* Sing., *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **50** (1976), S. 185-186
- [46] Wratten S.J., Faulkner D.J. Cyclic polysulfides from the red alga *Chondria californica*, *J. Org. Chem.* **41** (1976), S. 2465-2467

- [47] Morita K., Kobayashi S. Isolation, structure, and synthesis of lenthionine and its analogs, *Chem. Pharm. Bull.* **15** (1967), S. 988-993
- [48] Wasa S., Nakatani H., Morita K. A new aroma-bearing substance from Shiitake, an edible mushroom, *J. Food Sci.* **32** (1967), S. 559-561
- [49] Morita K., Kobayashi S. Isolation and synthesis of lenthionine, an odorous substance of Shiitake, an edible mushroom, *Tetrahedron Letters* **6** (1966), S. 573-577
- [50] Block E., DeOrazio R., Thiruvazhi M. Simple total synthesis of biologically active pentathiadecane natural products, 2,4,5,7,9-Pentathiadecane 2,2,9,9-tetraoxide (Dysoxysulfone), from *Dysoxylum richii*, and 2,3,5,7,9-Pentathiadecane 9,9-dioxide, the misidentified lenthionine precursor SE-3 from Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), *J. Org. Chem.* **59** (1994), S. 2273-2275
- [51] Tressl R., Bahri D., Engel K.-H. Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*), *J. Agric. Food Chem.* **30** (1982), S. 89-93
- [52] Rapior S., Breheret S., Talou T., Bessièrè J.-M. Volatile flavor constituents of fresh *Marasmius alliaceus* (Garlic marasmius), *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997), S. 820-825
- [53] Buchbauer G., Jirovetz L., Wasicky M., Nikiforov A. Zum Aroma von Speisepilzen, *Z Lebensm Unters Forsch* **197** (1993), S. 429-433
- [54] Dijkstra, F.I., Wiken T.O. Studies on mushroom flavours, *Z Lebensm Unters Forsch* **160** (1976), S. 263-269
- [55] Hanssen H.-P. Pilzaromen - Aromen aus Pilzen?, *Deutsche Lebensm Rdschau* **78** (1982), S. 435-440
- [56] Zadrazil F., Kamra D.N. Edible mushrooms, in: *Fungal Biotechnology* (Anke T., Hrsg.), Chapman & Hall, Weinheim (1997), S. 14-25
- [57] Böker A. Untersuchungen zur biotechnologischen Gewinnung einer Fruchtaroma-Impact-Verbindung mit Kulturen von Basidiomyceten, Dissertation, Universität Hannover (1997)
- [58] Tokimoto K., Komatsu M. Biological Nature of *Lentinus edodes*, in: *The biology and cultivation of edible mushrooms* (Chang S. T., Hayes W. A., Hrsg.), Academic Press, New York; San Francisco; London (1978), S. 445-459
- [59] Krämer J.: *Lebensmittel-Mikrobiologie*, Eugen Ulmer, Stuttgart (1992), S. 113-114
- [60] Campbell A.C., Racjan M. The commercial exploitation of the white rot fungus *Lentinus edodes* (shiitake), *Int. Biodet. Biodegr.* **43** (1999), S. 101-107

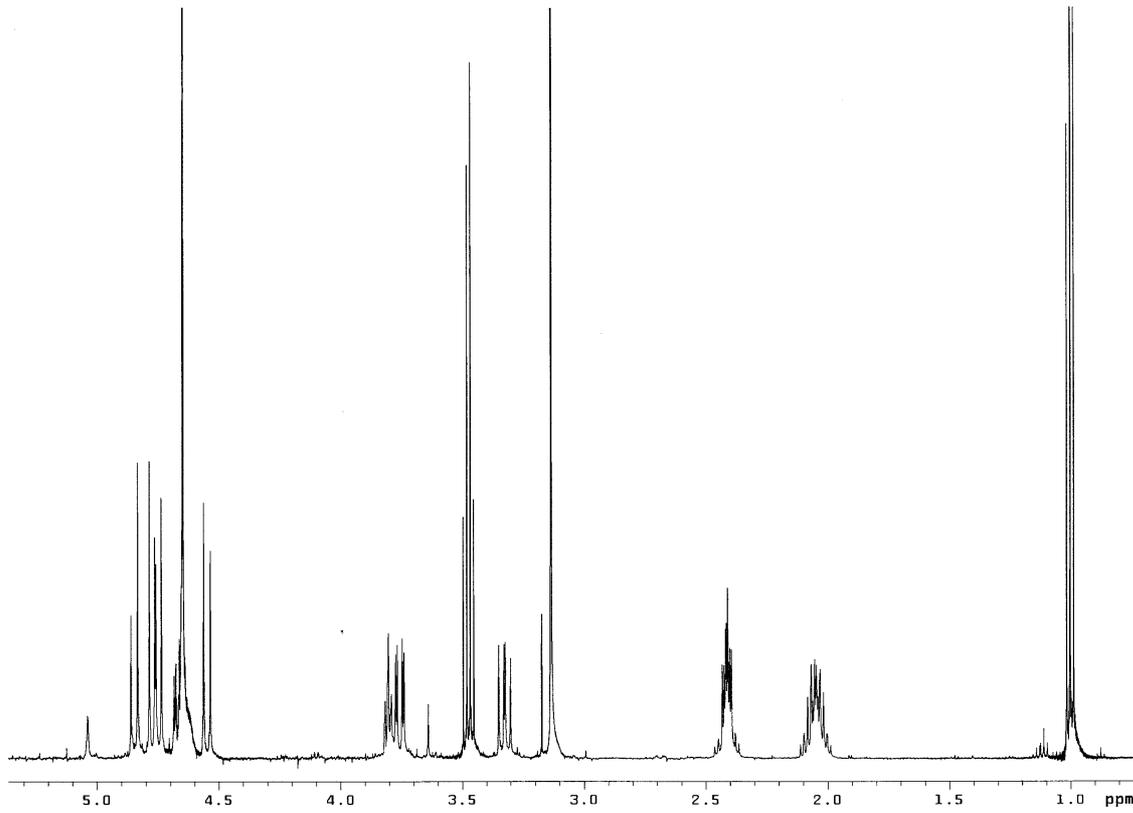
- [61] Griffin D.H.: Fungal physiology, 2. Aufl., Wiley-Liss, New York (1994), S. 140-142
- [62] Dijkstra F. I. Submerged cultures of mushroom mycelium as sources of protein and flavour compounds, Dissertation, Technische Hogeschool te Delft (1976)
- [63] Schwantes H.O.: Biologie der Pilze, Eugen Ulmer, Stuttgart (1996), S. 10-14
- [64] Charpentier B.A., Sevenants M.R., Sanders R.A. Comparison of the effect of extraction methods on the flavor volatile composition of Shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) vis GC/MS and GC/FTIR, in: The shelf life of foods and beverages; International Flavor Conference; 4, Elsevier Science, Amsterdam (1986), S. 413-433
- [65] Yoshida T., Taguchi H., Teramoto S. Studies on submerged culture of basidiomycetes (I). Some factors affecting the growth of shiitake (*Lentinus edodes*), *J. Ferment. Technol.* **43** (1965), S. 325-334
- [66] Jennings D.H.: The physiology of fungal nutrition, University Press, Cambridge (1995), S. 195-250
- [67] Horák J. Amino acids transport in eucaryotic microorganisms, *Biochem. Biophys.* **864** (1986), S. 223-256
- [68] Griffin D.H.: Fungal physiology, Wiley-Liss, New-York (1994), S. 63-74
- [69] Cheung P.C.-K. Dietary fiber content and composition of some cultivated edible mushroom fruiting bodies and mycelia, *J. Agr. Food Chem.* **44** (1996), S. 468-471
- [70] Griffin D.H.: Fungal physiology, Wiley-Liss, New-York (1994), S. 215-245
- [71] Michal G.: Biochemical Pathways, Spektrum, Heidelberg (1999)
- [72] Garraway M.O., Evans R.C.: Fungal nutrition and physiology, John Wiley & Sons, New York (1984), S. 124-170
- [73] Boyle C.D., Kropp B.R., Reid I.D. Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungi, *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992), S. 3217-3224
- [74] Leatham G.F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium, *Appl. Environ. Microbiol.* **50** (1985), S. 859-867
- [75] Buswell J.A., Cai Y.J., Chang S.-T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*, *FEMS Microbiology Letters* **128** (1995), S. 81-88
- [76] Auling G. Manganese: Function and transport in fungi, in: Metal Ions in Fungi, Vol. 2 (Winkelmann G., Winge D.R., Hrsg.), Marcel Dekker, New York (1994), S. 215-236

- [77] Pitt D., Kaile A. Transduction of the Calcium signal with special reference to Ca^{2+} -induced conidiation in *P. notatum* in: Biochemistry of cell walls and membranes in fungi (Kuhn P.J., Trinci A.P.J., Jung M.J., Goosey M.W., Copping L.G., Hrsg.), Springer, Berlin (1990), S. 283-296
- [78] Garraway M.O., Evans R.C.: Fungal nutrition and physiology, John Wiley & Sons, New York (1984), S. 171-211
- [79] Fukushima Y., Okada K., Kawai G., Motai H. Efficient production of mycelium of *Lentinus edodes* by a continuous culture and the effect of lignin on growth, *J. Ferm. Bioeng.* **76** (1993), S. 45-48
- [80] Kawai G., Kobayashi H., Fukushima Y., Yamada S., Fuse H., Ohsaki K. Continuous manufacturing system of solid culture media packed in film bags for cultivation of shiitake, *Food Rev. Int.* **13** (1997), S. 349-356
- [81] Schwantes H.O.: Biologie der Pilze, Eugen Ulmer, Stuttgart (1996), S. 266-280
- [82] Iisuka H. Production of *Lentinus edodes* mycelia extracts (LEM), *Food Rev. Int.* **13** (1997), S. 343-348
- [83] Miles, P.G., Chang S.T. Fruiting of *Lentinus edodes* (Shiitake) in liquid media, *MIRCEN* **3** (1987), S. 103-112
- [84] Michael E., Hennig B., Kreisel H.: Handbuch der Pilzfreunde, Bd. 1 & 3, Gustav Fischer, Stuttgart (1983)
- [85] Suzuki T.M., Sugii M., Kakimoto T. New γ -Glutamyl peptides in garlic, *Chem. Pharm. Bull.* **9** (1961), S. 77-78
- [86] Kasai T., Larsen P.O. Chemistry and biochemistry of γ -glutamyl derivatives from plants including mushrooms (Basidiomycetes), in: Progress in the chemistry of organic natural products (Herz W., Griesbach H., Kirby G.W., Hrsg.), Springer, Berlin (1980), S. 173-285
- [87] Virtanen A.I., Matikkala E.J. New γ -Glutamyl peptide 4 isolated from onion (*Allium cepa*), *Suom. Kemistilehti* **34** (1961), S. 84-88
- [88] Ito K., Fowden L. New characterization of amino acids and γ -Glutamyl peptides from *Acacia georginae* seed, *Phytochemistry* **11** (1972), S. 2541-2546
- [89] Aoyagi Y., Sasaki H., Sugahara T. On peptides in dried shiitake *Lentinus edodes*, *J. Agric. Chem. Soc. Japan* **54** (1980), S. 253-261
- [90] Aoyagi Y., Sasaki H., Sugahara T., Hasegawa T., Suzuki T. Sulfur containing peptides in *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.* **44** (1980), S. 2667-2670
- [91] Aoyagi Y., Sugahara T., Hasegawa T., Suzuki T. Constituents of a cationic peptide-rich fraction of *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.* **46** (1982), S. 987-991

- [92] Aoyagi Y., Sasaki H., Sugahara T. Isolation and identification of Nicotianine and Cysthionine from *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.* **41** (1977), S. 213-214
- [93] Aoyagi Y., Sasaki H., Sugahara T. Isolation and identification of saccharopine from *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.* **42** (1978), S. 1941-1942
- [94] Orłowski M., Meister A. The γ -glutamyl cycle: A possible transport system for amino acids, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67** (1970), S. 1248-1255
- [95] Meister A. Inhibition of the synthesis of glutathione, glutamine, and glutamate by certain methionine derivatives, in: Natural Sulfur Compounds (Cavallini D., Gaull G.E., Zappia V., Hrsg.), Plenum Press, New York (1980), S. 93-106
- [96] Meister A. Metabolism and transport of glutathion and other γ -glutamyl compounds, in: Functions of Glutathione: Biochemical, physiological, toxicological, and clinical aspects (Larsen A., Hrsg.), Raven Press, New York (1983), S. 1-22
- [97] Lancaster J.E., Reynolds P.H.S., Shaw M.L., Dommissie E.M., Munro J. Intracellular localization of the biosynthetic pathway to flavour precursors in onion, *Phytochemistry* **28** (1989), S. 461-464
- [98] Jaspers C., Gigot D., Penninckx M. Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytochemistry* **24** (1985), S. 703-707
- [99] Jaspers C., Penninckx M. On the role of glutathione in the transport of amino acid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: contradictionary results, *FEBS Letters* **132** (1981), S. 41-44
- [100] Robins R.J., Davies D.D. Lack of correlation between glutathione turnover and amino acid absorption by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytochemistry* **20** (1981), S. 1497-1499
- [101] Iwami K., Yasumoto K., Nakamura K., Mitsuda H. Properties of γ -glutamyltransferase from *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.* **39** (1975), S. 1933-1944
- [102] Iwami K., Yasumoto K., Nakamura K., Mitsuda H. Reactivity of *Lentinus* γ -glutamyltransferase with lentinic acid as the principal endogenous substrate, *Agric. Biol. Chem.* **39** (1975), S. 1941-1946
- [103] Iwami K., Yasumoto K. Substrate preference of γ -Glutamyltransferase from caps of fruiting bodies of *Lentinus edodes*, *Agric. Biol. Chem.* **46** (1982), S. 2387-2388
- [104] Richter G.: Biochemie der Pflanzen, Georg Thieme, Stuttgart (1996), S. 145-148
- [105] Jennings D.H.: The physiology of fungal nutrition, University Press, Cambridge (1995), S. 288-302

- [106] Togo H., Oae S. Reduction of sulfur compounds, in: Organic sulfur chemistry: Biochemical aspects (Oae S., Okuyama T., Hrsg.), CRC Press, Boca Raton (1992), S. 223-260
- [107] Elskens M.T., Jaspers C.J., Penninckx M.J. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* **137** (1991), S. 637-644
- [108] Lancaster J.E., Shaw M.L. γ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-Alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavour precursors) in *Allium*, *Phytochemistry* **28** (1989), S. 455-460
- [109] Sugii M., Nagasawa S., Suzuki T. Biosynthesis of S-Methyl-L-cysteine and S-Methyl-L-cysteine Sulfoxide from Methionine in garlic, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **11** (1962), S. 135-136
- [110] Assaf S., Hadar Y., Dosoretz C.G. 1-Octen-3-ol and 13-hydroperoxylinoleate are the products of distinct pathways in the oxidative breakdown of linoleic acid by *Pleurotus pulmonarius*, *Enz. Microb. Technol.* **21** (1997), S. 484-490
- [111] Wurzenberger M., Grosch W. The enzymic oxidative breakdown of linoleic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*), *Z Lebensm Unters Forsch* **175** (1982), S. 186-190
- [112] Chen C.-C., Wu C.-M. Studies on the enzymic reduction of 1-octen-3-one in mushrooms (*Agaricus bisporus*), *J. Agric. Food Chem.* **32** (1984), S. 1342-1344
- [113] Clark S.A., Shaw M.L., Every D., Lancaster J.E. Physical characterization of alliinase, the flavor generating enzyme in onions, *J. Food Biochem.* **22** (1998), S. 91-103
- [114] Nock L.P., Mazelis M. The C-S-lyases of higher plants, *Physiol. Plant.* **85** (1987), S. 1079-1083
- [115] Nock L.P., Mazelis M. C-S-Lyase of higher plants: Preparation and properties of homogenous alliin lyase from garlic (*Allium sativum*), *Arch. Biochem. Biophys.* **249** (1986), S. 27-33
- [116] Hanum T., Sinha M.K., Cash J.N. Characteristics of γ -glutamyl transpeptidase and alliinase of onion and their effects on the enhancement of pyruvate formation in onion macerates, *J. Food Biochem.* **19** (1995), S. 51-65
- [117] Block E., Naganathan S., Putman D., Zhao S.-H. *Allium* Chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsons), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive, and chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples, *J. Agric. Food Chem.* **40** (1992), S. 2418-2430
- [118] Iwami K., Yasumoto K., Mitsuda H. Enzymatic cleavage of cysteine sulfoxide in *Lentinus edodes*, *Agr. Biol. Chem.* **39** (1975), S. 1947-1955

- [119] Block E., Deorazio R. Chemistry in a salad bowl: Comparative organosulfur chemistry of garlic, onion and shiitake mushroom, *Pure & Appl. Chem.* **66** (1994), S. 2205-2206
- [120] Burton S.G., Kaye P.T. Isolation and characterization of sulphur compounds from *Tulbaghia violacea*, *Planta Med.* **58** (1992), S. 295-296
- [121] Yamaguchi S., Ninomiya K. Umami and food palatability, in: Flavor Chemistry (Teranishi R., Wick E.L., Hornstein I., Hrsg.), Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York (1999), S. 423-431
- [122] Block E., Putman D., Zhao S.-H. *Allium* Chemistry: GC-MS analysis of thiosulfinates and related compounds from onion, leek, scallion, shallot, chive, and chinese chive, *J. Agric. Food Chem.* **40** (1992), S. 2431-2438
- [123] Ferary S., Auger J. What is the true odour of cut *Allium*? Complementarity of various hyphenated methods: gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with particle beam and atmospheric pressure ionization interfaces in sulphenic acids rearrangement components discrimination, *J. Chromatogr.* **750** (1996), S. 63-74
- [124] Block E., Gulati H., Sha D., You N., Zhao S.-H. *Allium* Chemistry: Synthesis of 1-[Alk(en)ylsulfinyl]propyl Alk(en)yl disulfides (Cepaenes), antithrombotic flavorants from homogenates of onion (*Allium cepa*), *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997), S. 4414-4422
- [125] Calvey E.M., Matusik J.E., White K.D., DeOrazio R., Sha D., Block E. *Allium* Chemistry: Supercritical fluid extraction and LC-APCI-MS of Thiosulfinates and related compounds from homogenates of garlic, onion, and ramp. Identification in garlic and ramp and synthesis of 1-propanesulfinothioic acid S-allyl ester, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997), S. 4406-4413
- [126] Block E., Calvey E.M. Facts and artifacts in *Allium* Chemistry, in: Sulfur compounds in food, ACS Symposium Series 564 (Mussinan C.J., Keelan M.E., Hrsg.), American Chemical Society, Washington, D.C. (1994), S. 63-79
- [127] Yasumoto K., Iwami K., Mitsuda H. Enzyme-catalized evolution of lenthionine from lentic acid, *Agric. Biol. Chem.* **35** (1971), S. 2070-2080
- [128] Box G.E.P., Behnken, D.W. Some new three level design for the study of quantitative variables, *Technometrics* **2** (1960), S. 455-475

6 AnhangAbb 6-1 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Lentinsäure

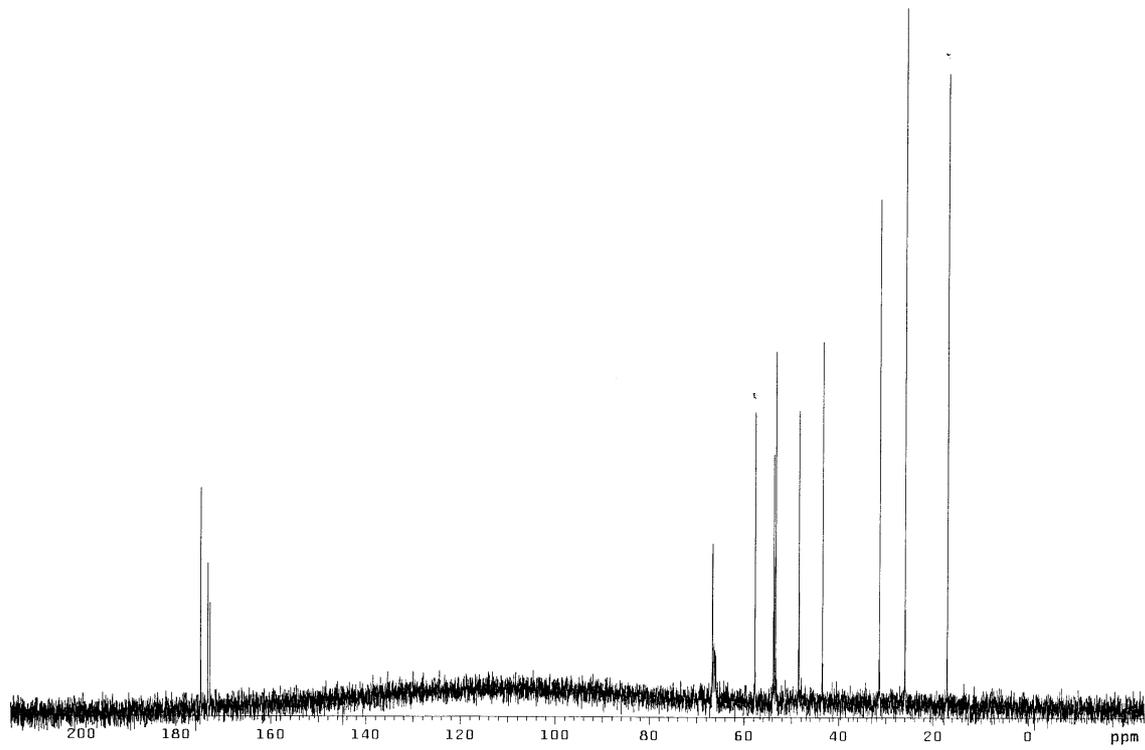
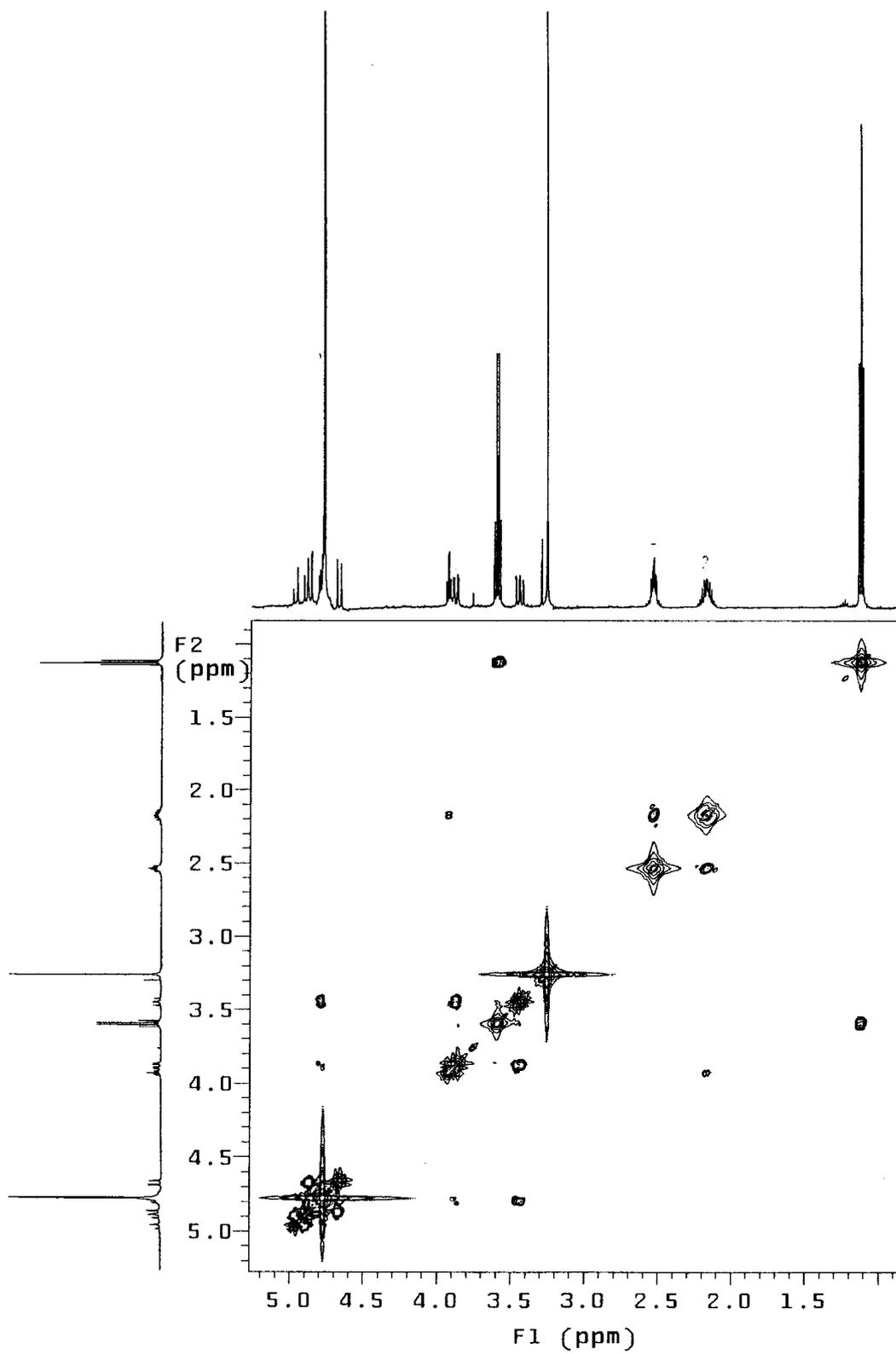


Abb 6-2 ^{13}C -NMR Spektrum der Leucinsäure

Abb 6-3 ^1H - ^1H -Korrelationsspektrum der Leucinsäure

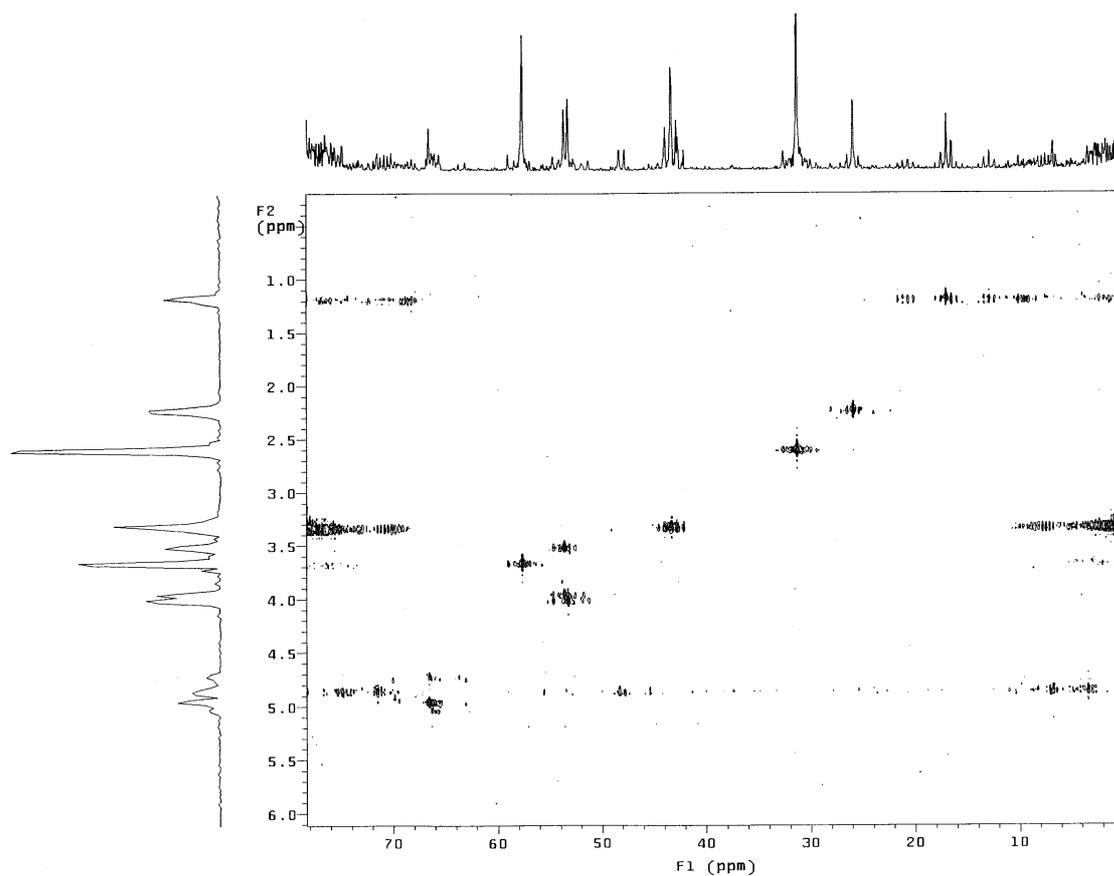


Abb 6-4 ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektrum der Lentinsäure

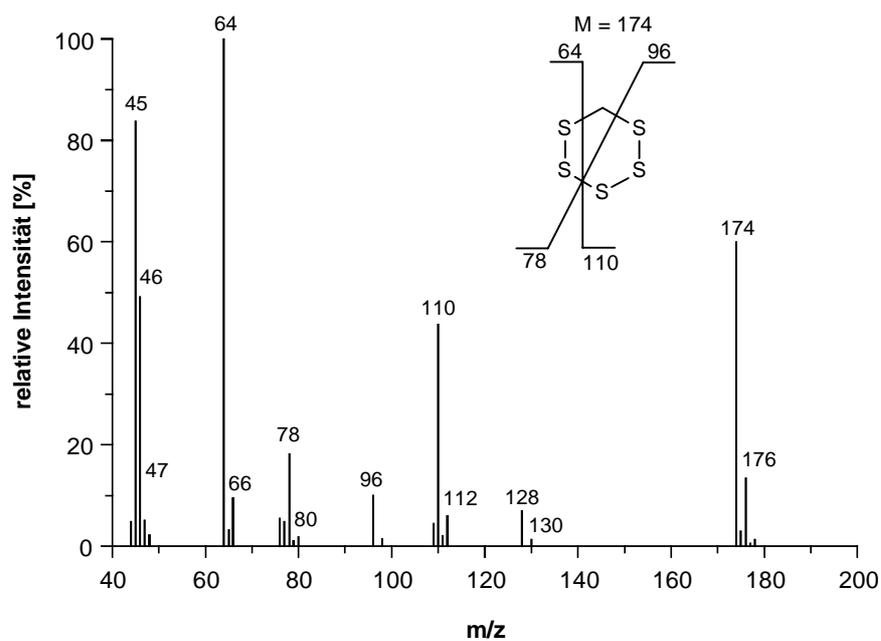
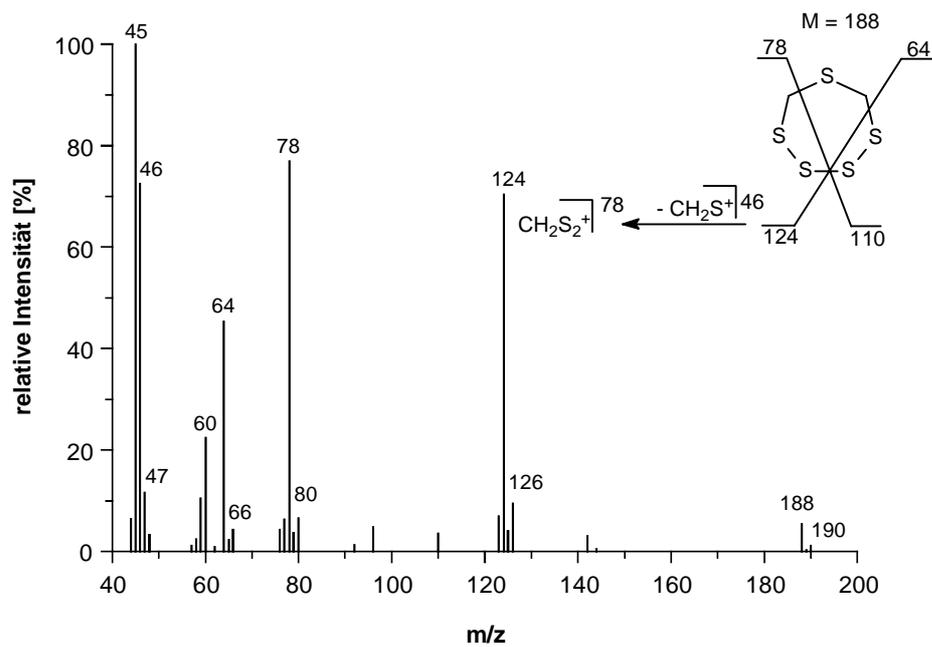
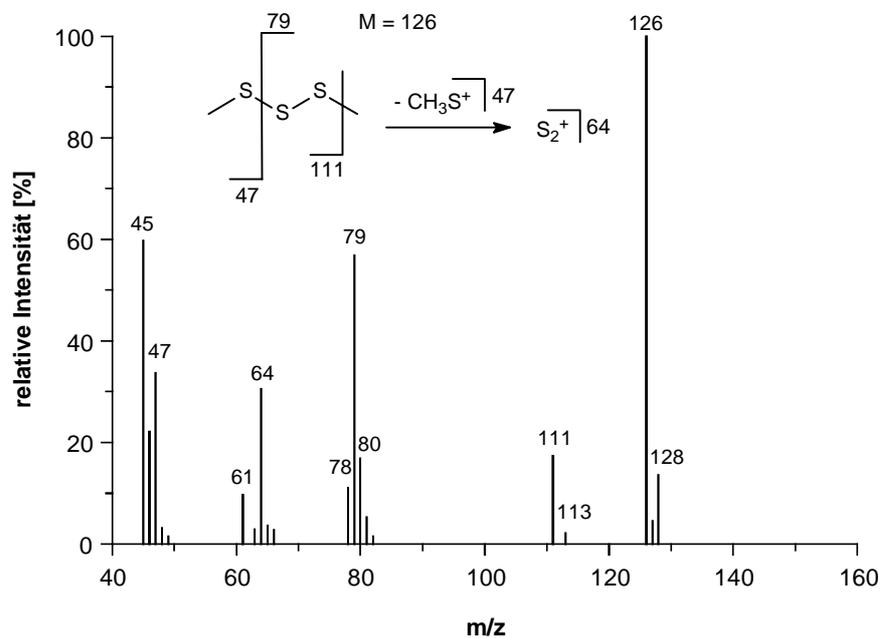


Abb 6-5 Massenspektrum von 1,2,3,4,5-Pentathian (**10**)

Abb 6-6 Massenspektrum von 1,2,3,4,6-Pentathiepan (**12**)Abb 6-7 Massenspektrum von Dimethyltrisulfid (**2**)

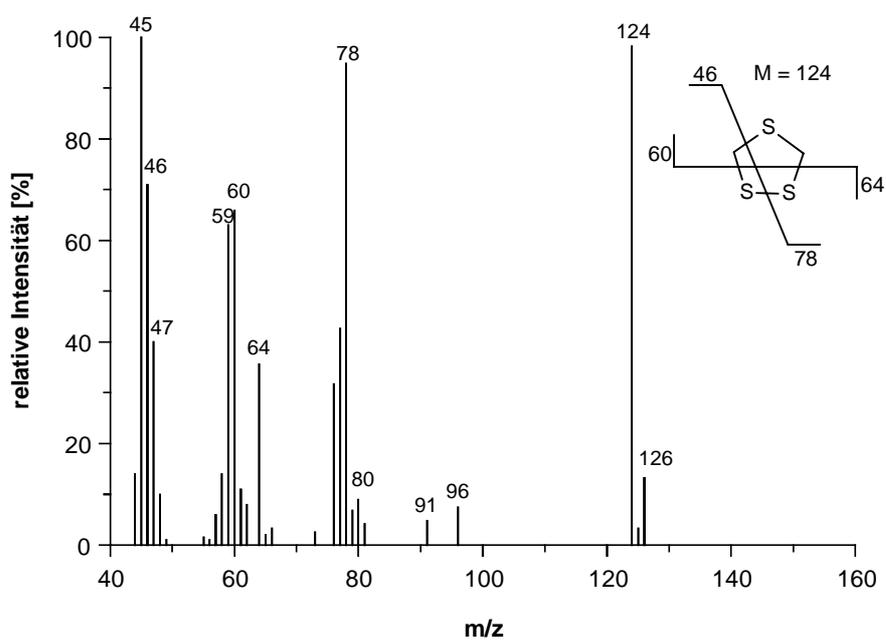


Abb 6-8 Massenspektrum von 1,2,4-Trithiolan (3)

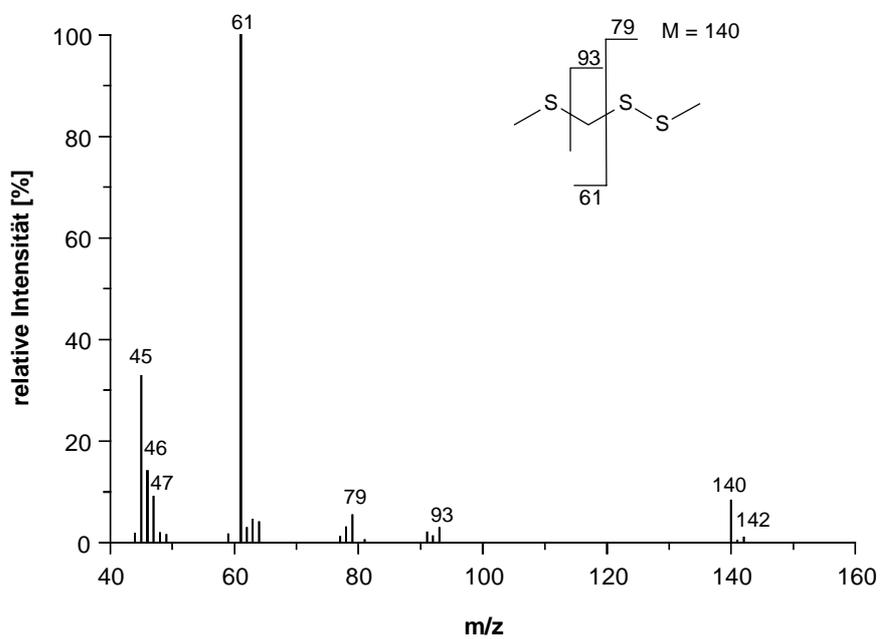
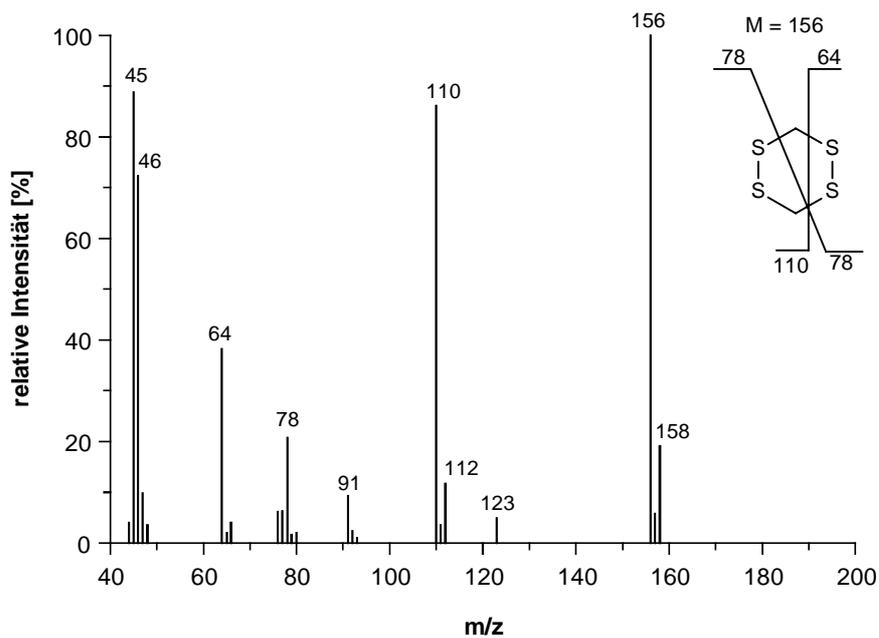
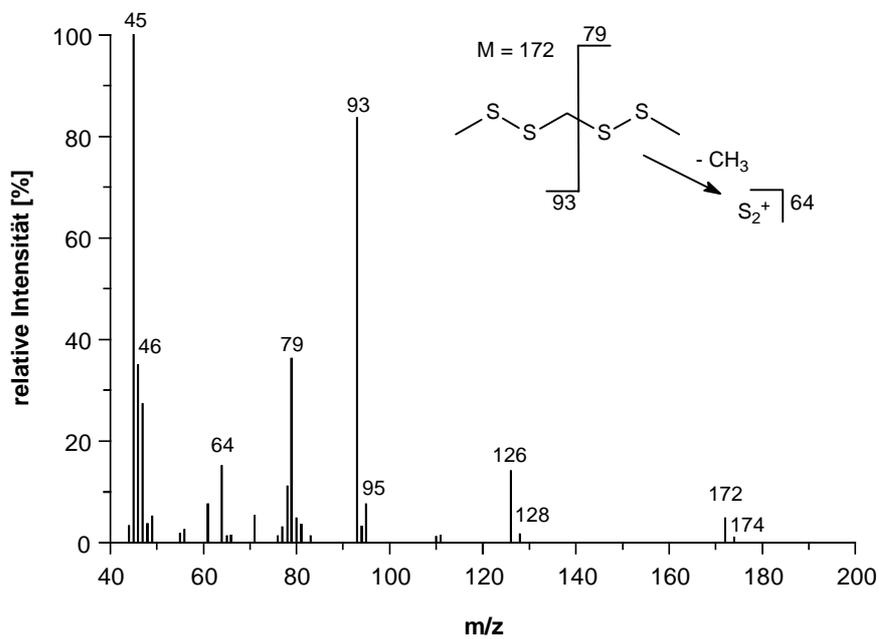
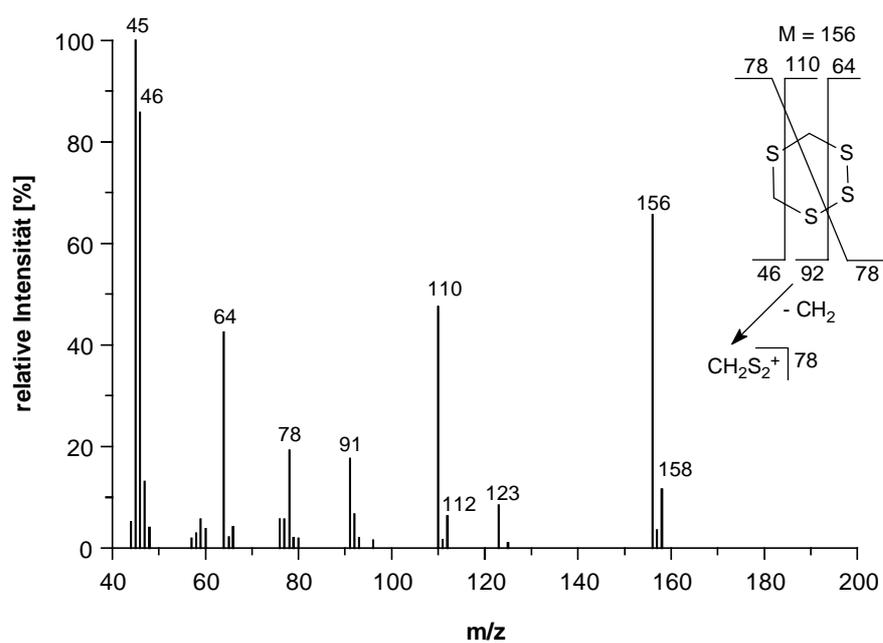
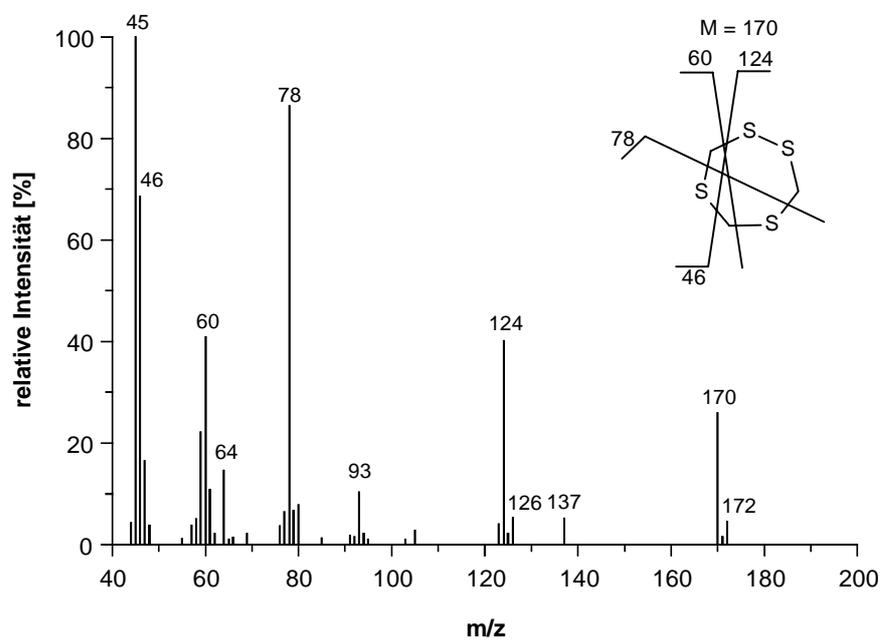


Abb 6-9 Massenspektrum von Methyl(methylthio)methyldisulfid (4)

Abb 6-10 Massenspektrum von 1,2,4,5-Tetrathian (**6**)Abb 6-11 Massenspektrum von 2,3,5,6-Tetrathiaheptan (**7**)

Abb 6-12 Massenspektrum von 1,2,3,5,-Tetrathian (**8**)Abb 6-13 Massenspektrum von 1,2,4,6-Tetrathiepan (**11**)

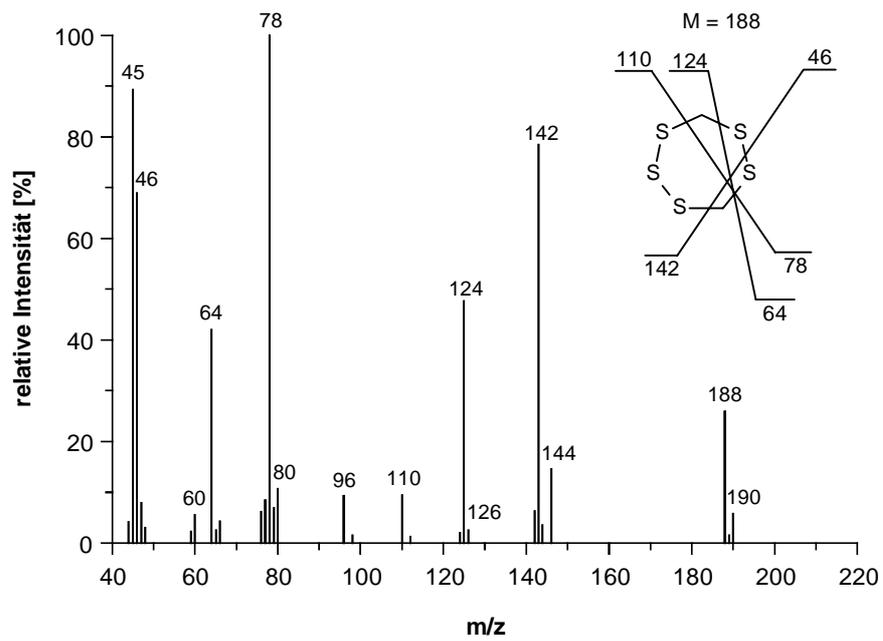


Abb 6-14 Massenspektrum von 1,2,3,5,6-Pentathiepan (Lenthionin) (13)

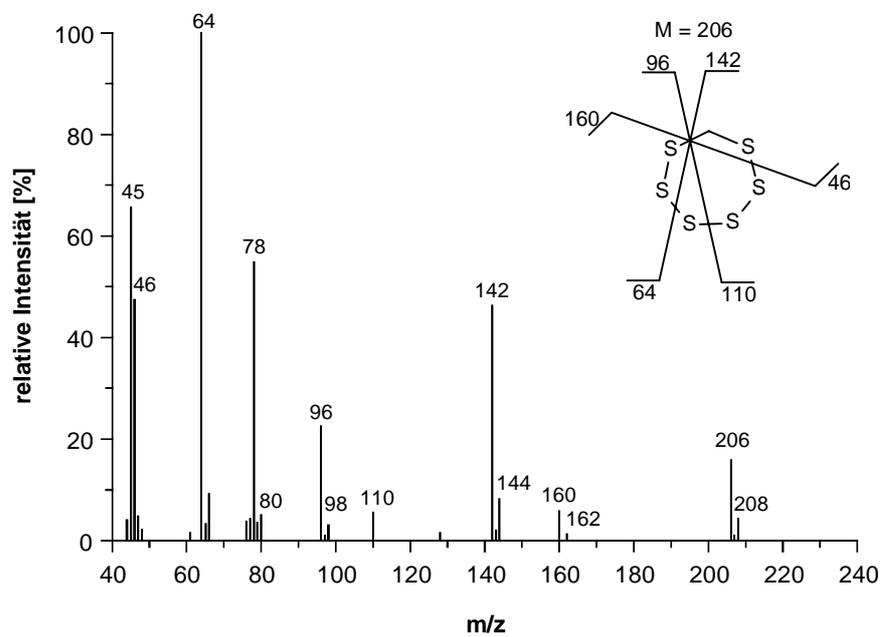
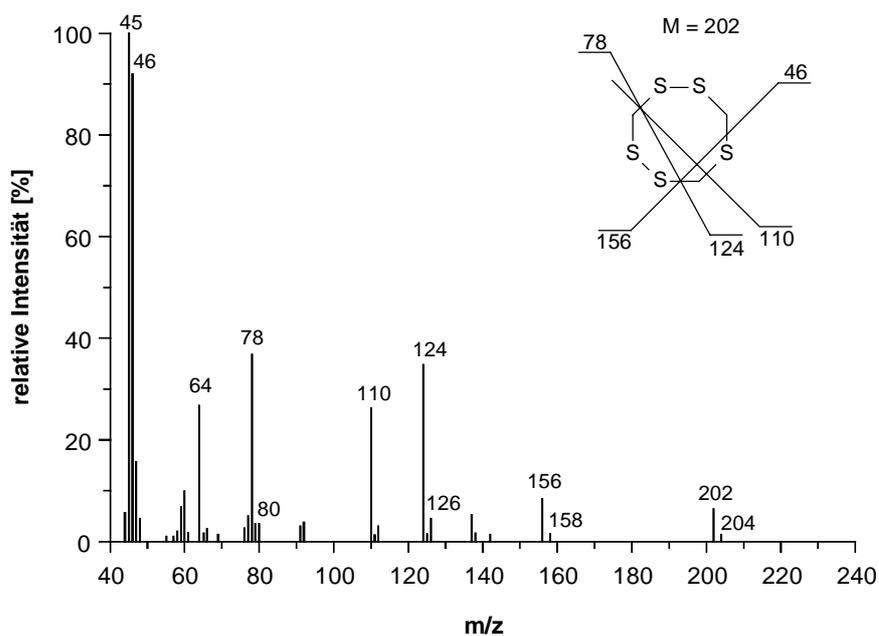
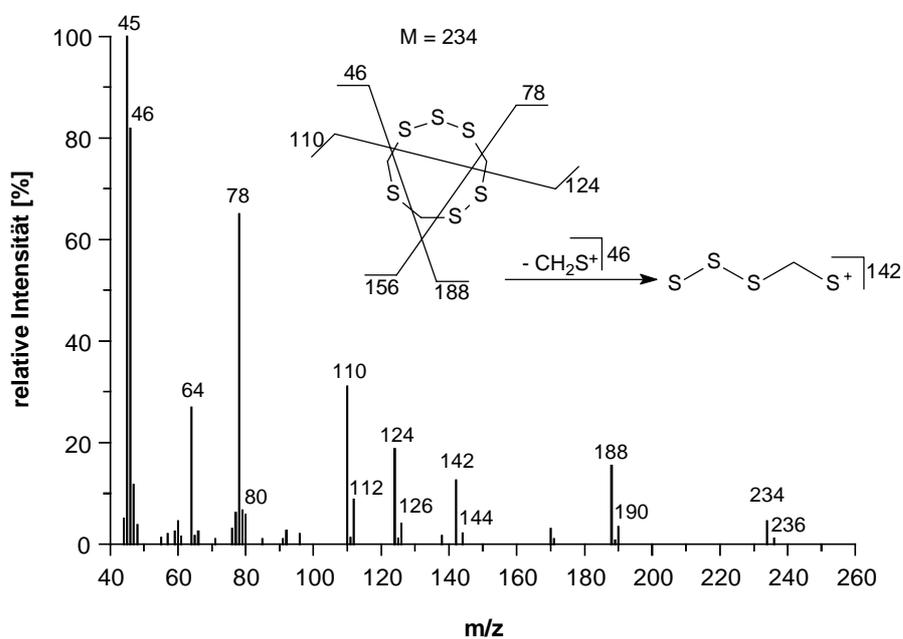


Abb 6-15 Massenspektrum von 1,2,3,4,5,6-Hexathiepan (14)

Abb 6-16 Massenspektrum von 1,2,4,5,7-Pentathioan (**15**)Abb 6-17 Massenspektrum von 1,2,3,5,6,8-Hexathioan (**17**)

Lebenslauf

Sabine Spaether, geb. Aalken
geboren am 18. Juni 1968 in Herford

Schulische Ausbildung

- | | |
|-------------|---|
| 1974 – 1978 | Grundschule Lockhausen |
| 1978 – 1987 | Städtisches Gymnasium im Schulzentrum Aspe, Allgemeine Hochschulreife im Juni 1987 |

Akademische Ausbildung

- | | |
|---------------------|--|
| 1988 - 1994 | Studium der Lebensmittelchemie an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster, Erste Staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker im Mai 1994 |
| Dez 1994 - Dez 1995 | Berufspraktische Ausbildung zur Lebensmittelchemikerin an dem Chemischen Untersuchungsamt der Stadt Bielefeld, Zweite Staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker im Januar 1996 |
| Jan 1997 | Beginn der vorliegenden Arbeit am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover (Prof. Dr. R. G. Berger) |