

**Aromatische Metabolite in Zellkulturen
von Basidiomyceten**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Jan Taubert

geboren am 03.09.1969 in Hannover

Hannover, 2000

Referent:	Prof. Dr. R. G. Berger
Korreferent:	Prof. Dr. G. Gerlach
Tag der Promotion:	15. Juni 2000
Datum der Veröffentlichung:	15. August 2000

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. G. Berger, für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Besonders dankbar bin ich für den großen Freiraum bei der Bearbeitung der Fragestellung.

Ich danke Herrn Dr. Ulrich Krings, der jederzeit ein offenes Ohr hatte und mir mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut, allen voran meiner Labornachbarin Sabine Spaether, danke ich für das ausgesprochen gute und angenehme Arbeitsklima.

Auch allen weiteren, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, gilt mein herzlicher Dank.

Zusammenfassung

Die Nachfrage nach natürlichen Aromastoffen steigt stetig an. Biotechnologische Verfahren zur Herstellung aromaaktiver Substanzen gewinnen daher an Bedeutung. Höhere Pilze besitzen ein großes metabolisches Potential und finden zunehmend Beachtung für den Einsatz in entsprechenden Verfahren.

Voraussetzung sind schnelles Wachstum und hohe Produktivität. Eine Vielzahl von Maßnahmen zielt auf die Erhöhung der Produktbildung ab. Obwohl die Stimulation verschiedener physiologischer Prozesse in Pilzen durch Licht, insbesondere durch UV- und Blaulicht, seit langem bekannt ist, fand der mögliche Einfluß auf die Bildung aromaaktiver Substanzen bislang kaum Beachtung.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich UV-A-Licht auf die Aromabildung auswirkt. Besondere Aufmerksamkeit galt dem Phenylpropanoidstoffwechsel. Zur Stimulation wurde L-Phenylalanin als Precursor eingesetzt.

Bei 12 der 30 submers kultivierten Pilze hatte die Belichtung positive Auswirkungen auf die Bildung flüchtiger Metabolite. Alle beobachteten Effekte waren quantitativer Art. Die Induktion neuer Biogenesewege durch UV-A-Licht wurde nicht beobachtet. Mit Ausnahme von C₈-Verbindungen war ausschließlich die Bildung phenolischer Substanzen betroffen.

Wie die Untersuchungen zur Bildung von 1-Octen-3-ol und Organohalogenverbindungen durch *Gloeophyllum odoratum* bzw. *Bjerkandera adusta* zeigten, waren die Effekte nicht allein auf die Stimulation von Enzymaktivitäten zurückzuführen. Die enzymatische Bildung des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters durch *Lentinus lepideus* dagegen unterliegt eindeutig einer Photoregulation. Durch UV-A-Belichtung wurde die Konzentration von 6 mg L⁻¹ auf bis zu 20 mg L⁻¹ gesteigert. Die Bildung wurde durch Blaulicht unterdrückt.

Die Bestimmung der Einzelaktivitäten gab Einblick in die regulativen Vorgänge im Verlauf der Biogenese zwischen L-Phenylalanin und der Zielsubstanz. Durch die UV-A-Belichtung wurden die Phenylalanin-Ammonium-Lyase sowie eine 4-Hydroxylase (Hydroxylierung von Zimtsäuremethylester zu p-Cumarsäuremethylester) stimuliert. Neben einer generellen Stimulation wurde bei den beiden beteiligten O-Methyltransferasen eine temporale Aktivitätssteigerung gezeigt. Die Konzentrationserhöhung des Esters konnte insbesondere auf die Regulation dieser O-Methyltransferasen zurückgeführt werden.

Es kann davon ausgegangen werden, daß auch weitere Enzyme des Phenylpropanoidstoffwechsels einer Photoregulation unterliegen.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob Phytohormone potentiell geeignet sind, Wachstum und Aromabildung filamentöser Pilze zu stimulieren. Diese Effektoren werden standardmäßig in Pflanzenzellkulturen eingesetzt, um Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel zu steuern. Die zahlreichen Berührungspunkte zwischen Pilz und Pflanze machen eine Wirkung auf Pilze sehr wahrscheinlich.

Unterschiedliche Effekte auf die drei Testorganismen machten deutlich, daß die Wirkungsmechanismen, wie auch bei pflanzlichen Systemen, sehr komplex sind. Während 24-Epibrassinolid und die Polyamine Putrescin, Spermin und Spermidin keine bzw. eine hemmende Wirkung entfalteten, konnte durch die Kombination von Kinetin und Indole-3-sigsäure in bestimmten Konzentrationsbereichen das Wachstum von *Clitocybe odora* um bis zu 50% gesteigert werden. Ein Einfluß auf die Aromabildung war nicht erkennbar. Das Ergebnis soll als Anhaltspunkt dienen, daß ein Einsatz von Mediatoren bei der Kultivierung von Pilzen analog zu Pflanzenzellkulturen möglich ist.

Stichworte: Basidiomyceten, Aroma, Licht

Abstract

The demand on natural flavours is increasing. Biotechnology is getting more and more important for the production. Filamentous fungi have an immense metabolic potential and therefore getting attention on using them in appropriate applications.

Fast growth and a high productivity are recommended. A lot of efforts are done to optimize the productivity. The stimulation of different physiological processes in fungi by light, especially by UV- and blue-light, is known for a long time. A possible influence on the formation of volatiles by fungi is neglected so far.

This study was dealing with the effect of UV-A irradiation on the production of volatiles by filamentous fungi. Special attention was focused on phenylpropanoids. In order to stimulate this metabolic pathway L-phenylalanine was used as a precursor.

The irradiation had positive effects on the formation of flavours by 12 of the 30 cultivated fungi. All observed effects were of a quantitative kind. No induction of new metabolic pathways could be detected. Except for C₈-metabolites, only the formation of phenolic substances was affected.

Studying the formation of 1-octen-3-ol by *Gloeophyllum odoratum* and organohalogens by *Bjerkandera adusta* it could be demonstrated that the effects on these substances were not due to stimulation of enzymatic activities. In contrast, the enzymatic formation of methyl 4-methoxycinnamic acid by *Lentinus lepideus* definitely is regulated by UV-A irradiation. In light-grown cultures the concentration could be increased from 6 mg L⁻¹ up to 20 mg L⁻¹. When growing in blue-light, the production was suppressed.

The estimation of enzymatic activities of the pathway from L-phenylalanine the resulting ester gave a hint on the mode of regulation. The phenylalanine-ammonia-lyase and a hydroxylase (hydroxylating methyl cinnamic acid to methyl coumaric acid) were stimulated by UV-A. Beside a general stimulation, a temporary stimulation of the two involved O-methyltransferases occurred. The increase in the formation of the methyl 4-methoxy cinnamic acid could be attributed to the activities of these enzymes.

It could be supposed that even other enzymes of the phenylalanine-cinnamate pathway are subjected to photoregulation.

In addition, phytohormones were examined on their ability to stimulate the growth of filamentous fungi and the formation of volatiles by these organisms. Such effectors are used commonly in plant cell cultures to control growth, differentiation and physiology. Numerous points of contact in the natural habitat between plants and fungi suggest an effect of phytohormones on fungi.

The different effects on the three test organisms demonstrated the complexity of the mode of action, as already known from plant systems. 24-epibrassinolid and the polyamines putrescin, spermin and spermidin had no or even a negative effect on the growth of the fungi tested. In contrast, several combinations of kinetin and 3-indolyl acetic acid had a stimulatory effect on the growth of *Clitocybe odora*, increasing the biomass to an extent of 150%. The formation of volatile compounds was not affected. The results should be read as a first approach to using mediators in fungal cell cultures analogous to plant cell cultures.

keywords: basidiomycetes, flavour, light

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	3
2	Ergebnisse	4
2.1	Screening verschiedener Pilzstämme	4
2.1.1	Vorbemerkungen	4
2.1.2	<i>Agrocybe praecox</i> , CBS 108.59	5
2.1.3	<i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48	6
2.1.4	<i>Clitocybe geotropa</i> , CBS 110.21	7
2.1.5	<i>Clitocybe nebularis</i> , CBS 130.44	9
2.1.6	<i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44	10
2.1.7	<i>Collybia fusipes</i> , CBS 414.79	11
2.1.8	<i>Cortinarius odorifer</i> , CBS 517.95	12
2.1.9	<i>Cortinarius percomis</i> , CBS 130.42	12
2.1.10	<i>Cystoderma carcharias</i> , CBS 157.47	13
2.1.11	<i>Cystostereum murraini</i> , CBS 257.73	14
2.1.12	<i>Exidia thuretiana</i> , CBS 215.63	15
2.1.13	<i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61	16
2.1.14	<i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 553.80	17
2.1.15	<i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68	18
2.1.16	<i>Ischnoderma benzoinum</i> , CBS 211.29	19
2.1.17	<i>Lactarius deliciosus</i> , CBS 581.63	21
2.1.18	<i>Lactarius rufus</i> , CBS 181.57	22
2.1.19	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79	22
2.1.20	<i>Lepista irina</i> , CBS 366.47	24
2.1.21	<i>Lepista nuda</i> , CBS 300.58, DSM 8620	25
2.1.22	<i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 137.86	25
2.1.23	<i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 850.87	26
2.1.24	<i>Meripilus giganteus</i> , CBS 561.86	27
2.1.25	<i>Paxillus involutus</i> , CBS 591.89	28
2.1.26	<i>Polyporus tuberaster</i> , CBS 786.84	30
2.1.27	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> , CBS 353.63	31
2.1.28	<i>Rhodotus palmatus</i> , CBS 275.33	32
2.1.29	<i>Sparassis crispa</i> , CBS 408.71	33
2.1.30	<i>Suillus granulatus</i> , CBS 114.42	34

2.1.31 <i>Trametes hirsuta</i> , CBS 282.74	35
2.1.32 Teilzusammenfassung 2.1	36
2.2 Untersuchungen an ausgewählten Pilzstämmen	39
2.2.1 <i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61	39
2.2.1.1 Aktivitätsbestimmung von Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase	40
2.2.1.2 Extraktion flüchtiger Metabolite	41
Flüssig/flüssig-Extraktion	41
Festphasenmikroextraktion	41
2.2.1.3 Verminderung der Medienviskosität	42
Medienzusammensetzung	42
Zusatz hydrolytischer Enzyme zum Kulturfiltrat	44
Ausfrieren	45
2.2.1.4 Teilzusammenfassung 2.2.1	45
2.2.2 <i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48	45
2.2.2.1 Halogensubstituierte Metabolite	46
2.2.2.2 Medienzusätze	46
2.2.2.3 Submerskultivierung im Schüttelkolben	47
Zusatz von Halogeniden	47
Zusatz von Halogeniden und L-Phenylalanin	47
Zusatz von Halogeniden und L-Tyrosin	48
2.2.2.4 Submerskultivierung im Rührkesselbioreaktor	49
2.2.2.5 Statische Oberflächenkultur	50
Zusatz von Halogeniden und L-Phenylalanin	50
Zusatz von Halogeniden und L-Tyrosin	52
2.2.2.6 Teilzusammenfassung 2.2.2	52
2.2.3 <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79	53
2.2.3.1 Nährmedienscreening	53
2.2.3.2 Gesamtextrakt einer Kultivierungsperiode	55
2.2.3.3 Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase	56
2.2.3.4 Konzentrationsverlauf ausgewählter Metabolite über eine Kultivierungsperiode	57
2.2.3.5 Variation des Lichtspektrums	62
Belichtung mit einer „Fluora“-Pflanzenleuchte	63
Belichtung mit einer Kombination von UV-A- und „Fluora“-Leuchten	67
2.2.3.6 Bestimmung freier aromatischer Säuren im Medium	70

2.2.3.7	Enzymatische Untersuchungen zur Synthese von 4-Methoxyzimtsäuremethylester	70
	Supplementation einzelner Syntheseschritte bei Belichtung mit „Fluora“-Licht	71
	Bestimmung der Enzymaktivitäten bei UV-A-Belichtung	72
2.2.3.8	Teilzusammenfassung 2.2.3	77
2.3	Einflußnahme auf Wachstumsrate und Aromabildung	78
2.3.1	Zusatz von Phytoeffektoren	78
2.3.1.1	Polyamine	78
2.3.1.2	Cytokinine und Auxine	82
2.3.1.3	Brassinosteroide	86
2.3.2	Zusatz eines Kulturfiltrates	87
2.3.3	Teilzusammenfassung 2.3	88
3	Diskussion	89
3.1	Lichteinfluß auf Pilze	89
3.2	Bedeutung des L-Phenylalanins für die Aromabildung	92
3.3	Screening	93
3.3.1	Selektion der Stämme	93
3.3.2	Kulturführung	93
3.3.3	Analytik	94
3.3.4	Precursorwirkung des L-Phenylalanins	94
3.3.5	Lichtstimulierte Bildung flüchtiger Metabolite	95
3.3.6	Wachstum	96
3.4	Bildung halogener Anisylverbindungen durch <i>Bjerkandera adusta</i>	97
3.4.1	Verbreitung von Organohalogenverbindungen in der Natur	97
	Akkumulation oder Metabolisierung	97
	<i>de novo</i> Synthese	97
	Untersuchungen an <i>Bjerkandera adusta</i>	99
	Steigerung der Syntheseleistung	99
	Einfluß auf das Wachstum	100
	Einfluß der UV-A-Belichtung auf die Bildung halogener Anisyl-derivate	101
3.5	<i>Gloeophyllum odoratum</i>: Bildung von C₈-Verbindungen und Exopolysacchariden	101
3.5.1	Herkunft von C ₈ -Verbindungen in Pilzen	101

3.5.2	Lichtwirkung auf die Genese von 1-Octen-3-ol	102
3.5.3	Viskosität des Mediums	103
3.5.3.1	Exopolysaccharide	104
3.5.3.2	Maßnahmen zur Verringerung der Medienviskosität	104
	Variation der Medienzusammensetzung	104
	Einsatz hydrolytischer Enzyme zum Abbau von Exopolysacchariden	106
	Ausfrieren	106
3.6	UV-A-stimulierte Bildung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester durch <i>Lentinus lepideus</i>	107
3.6.1	Einfluß unterschiedlicher Nährmedien auf das Wachstum	107
3.6.2	Bildung flüchtiger Metabolite	107
3.6.2.1	Untersuchung von Sammelproben	107
3.6.2.2	Konzentrationsverlauf der Hauptmetabolite	108
3.6.2.3	Enzymatische Untersuchungen zur Genese von 4-Methoxyzimtsäuremethylester	111
3.7	Beeinflussung der Wachstumseigenschaften	114
3.7.1	Einsatz von Phytohormonen	116
3.7.1.1	Cytokinine und Auxine	118
3.7.1.2	Brassinosteroide	120
3.7.1.3	Polyamine	121
3.7.2	Übertragung von Effektoren zwischen zwei Pilzstämmen	122
3.7.3	Schlußbetrachtungen zum Einsatz von Mediatoren	122
3.8	Abschließende Betrachtungen und Ausblick	123
4	Experimenteller Teil	126
4.1	Mikrobiologie	126
4.1.1	Pilzkulturen	126
4.1.2	Kulturmedien	127
4.1.2.1	Flüssige Medien	127
4.1.2.2	Feste Nährböden	129
4.1.3	Kulturführung	130
4.1.3.1	Stammhaltung	130
4.1.3.2	Vorkulturen	130
4.1.3.3	Experimentelle Kulturen	130
4.1.3.4	Kultivierung im Bioreaktor	131
4.1.4	Applikation von Zusatzstoffen	131

4.1.4.1	Zusatz von Precursoren	131
4.1.4.2	Zusatz von Phytoeffektoren	132
4.1.4.3	Zusatz eines Kulturfiltrates	132
4.1.4.4	Zusatz von Halogenidsalzen	132
4.1.5	Probenahme	133
4.1.5.1	Standard-Probenahme	133
4.1.5.2	Probenahme für Sammelproben	133
4.1.6	Bestimmung verschiedener Kulturparameter	133
4.1.6.1	pH-Wert	133
4.1.6.2	Glucosekonzentration	134
4.1.6.3	Trockenmasse	134
4.1.6.4	Prüfung auf Kontamination	134
4.1.6.5	Viskositätsmessung	134
4.1.7	Belichtung	135
4.2	Enzymatik	136
4.2.1	Herabsetzung der Viskosität von Kulturfiltraten	136
4.2.2	Zellaufschluß	137
4.2.3	Proteinbestimmung	137
4.2.4	Enzymassays	138
4.2.4.1	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	138
	Methode 1	138
	Methode 2	138
4.2.4.2	4-Hydroxylasen	138
4.2.4.3	O-Methyltransferasen	139
4.2.4.4	Lipoxygenase/Hydroperoxidlyase	139
4.3	Synthesen	140
4.3.1	Synthese von p-Cumarsäuremethylester	140
4.3.2	Synthese von p-Methoxyzimtsäuremethylester	140
4.4	Analytik	141
4.4.1	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)	141
4.4.2	Probenvorbereitung für die HPLC	141
4.4.3	Gaschromatographie (GC)	142
4.4.3.1	GC-FID	142
	Konfiguration 1	142
	Konfiguration 2	142
4.4.3.2	GC-Massenspektrometrie (GC-MS)	143

Konfiguration 1	143
Konfiguration 2	143
4.4.3.3 GC-Atomemissionsdetektion (GC-AED)	144
4.4.4 Probenvorbereitung für die GC	144
4.4.4.1 Festphasenmikroextraktion (SPME)	144
4.4.4.2 Flüssig/flüssig-Extraktion	144
4.4.4.3 Kontinuierliche Flüssig/flüssig-Extraktion	145
4.4.4.4 Fraktionierte Destillation an einer Vigreux-Kolonne	145
4.4.4.5 Flüssig/flüssig-Mikroextraktion	146
Standardverfahren	146
Bestimmung von 1-Octen-3-ol	146
4.4.4.6 Methylierung	146
4.4.5 Identifizierung und Quantifizierung	147
4.4.5.1 Gaschromatographie	147
4.4.5.2 Flüssigchromatographie	147
4.5 Chemikalien und Geräte	148
4.5.1 Kulturmedienbestandteile	148
4.5.2 Standards und Precursoren	149
4.5.3 Weitere Chemikalien	150
4.5.4 Lösungsmittel	150
4.5.5 Gase	150
4.5.6 Geräte	151
4.6 Entsorgungshinweise	152
4.6.1 Biologisches Material	152
4.6.2 Lösungsmittel und Chemikalien	152
5 Literatur	153

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	<i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61: Bildung von 1-Octen-3-ol im Enzymassay	40
Abbildung 2-2:	<i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61: Medienviskosität und Biomassebildung bei unterschiedlicher Medienzusammensetzung, Kultivierung unter Lichtausschluß	43
Abbildung 2-3:	<i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61: Medienviskosität und Biomassebildung bei unterschiedlicher Medienzusammensetzung, Kultivierung unter UV-A-Belichtung	43
Abbildung 2-4:	Von <i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48 synthetisierte Organohalogenverbindungen	46
Abbildung 2-5:	<i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48 in Submerskultur: Einfluß zugesetzter Halogenide auf die Biomassebildung in L-phenylalaninhaltigem Medium	48
Abbildung 2-6:	<i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48 in Submerskultur: Einfluß zugesetzter Halogenide auf die Biomassebildung in L-tyrosinhaltigem Medium	49
Abbildung 2-7:	<i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48 in statischer Oberflächenkultur: Einfluß zugesetzter Halogenide auf die Biomassebildung in L-phenylalaninhaltigem Medium	51
Abbildung 2-8:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Bildung von Biomasse bei unterschiedlichen Belichtungsbedingungen	54
Abbildung 2-9:	Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Zellhomogenaten von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79. Kultivierung in Dunkelheit und unter Belichtung mit UV-A	57
Abbildung 2-10:	Retention der beobachteten Metabolite in der Gaschromatographie. Medienextrakte von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79	58
Abbildung 2-11:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Über den Kulturverlauf beobachtete Metabolite im Medium	59
Abbildung 2-12:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Entwicklung von Biotrockenmasse und pH-Wert im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung	59
Abbildung 2-13:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung verzweigter aliphatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung	60
Abbildung 2-14:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung aromatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung	60
Abbildung 2-15:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Zimt- und p-Anissäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung	61
Abbildung 2-16:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Isovanillinsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung	61

Abbildung 2-17: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung	62
Abbildung 2-18: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Entwicklung von Biotrockenmasse und pH-Wert im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung	63
Abbildung 2-19: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung verzweigter aliphatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung	64
Abbildung 2-20: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung aromatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung	64
Abbildung 2-21: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Zimt- und p-Anissäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung	65
Abbildung 2-22: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Isovanillinsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung	65
Abbildung 2-23: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung	66
Abbildung 2-24: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Entwicklung von Biotrockenmasse und pH-Wert im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht	67
Abbildung 2-25: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung verzweigter aliphatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht	67
Abbildung 2-26: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung aromatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht	68
Abbildung 2-27: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Zimt- und p-Anissäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht	68
Abbildung 2-28: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Isovanillinsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht	69
Abbildung 2-29: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht	69
Abbildung 2-30: Biosynthese des trans-4-Methoxyzimtsäuremethylesters durch <i>Lentinus lepideus</i>	71

Abbildung 2-31: Aktivität der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase nach Zellaufschluß von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79. Substrat: L-Phenylalanin	73
Abbildung 2-32: Aktivität der O-Methyltransferase 1 nach Zellaufschluß von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79. Substrat: trans-Zimtsäure	74
Abbildung 2-33: 4-Hydroxylaseaktivität nach Zellaufschluß von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79. Substrat: trans-Zimtsäuremethylester	74
Abbildung 2-34: Aktivität der O-Methyltransferase 2 nach Zellaufschluß von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79. Substrat: p-Cumarsäuremethylester	75
Abbildung 2-35: 4-Hydroxylaseaktivität nach Zellaufschluß von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79. Substrat: trans-Zimtsäure	75
Abbildung 2-36: Aktivität der O-Methyltransferase 1 nach Zellaufschluß von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79. Substrat: p-Cumarsäure	76
Abbildung 2-37: <i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44: Effekt kombinierter Polyamine in äquimolaren Konzentrationen auf die Biomassebildung	79
Abbildung 2-38: <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68: Effekt kombinierter Polyamine in äquimolaren Konzentrationen auf die Biomassebildung	79
Abbildung 2-39: <i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 850.87: Effekt kombinierter Polyamine in äquimolaren Konzentrationen auf die Biomassebildung	80
Abbildung 2-40: <i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44: Einzeleffekte von Polyaminen in einer Konzentration von 0,3 mmol L ⁻¹ auf die Biomassebildung	81
Abbildung 2-41: <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68: Einzeleffekte von Polyaminen in einer Konzentration von 0,3 mmol L ⁻¹ auf die Biomassebildung	81
Abbildung 2-42: <i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 850.87: Einzeleffekte von Polyaminen in einer Konzentration von 0,3 mmol L ⁻¹ auf die Biomassebildung	82
Abbildung 2-43: <i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44: Effekt von Kinetin und Indolessigsäure im Konzentrationsverhältnis 1:1 (m/m) auf die Biomassebildung	83
Abbildung 2-44: <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68: Effekt von Kinetin und Indolessigsäure im Konzentrationsverhältnis 1:1 (m/m) auf die Biomassebildung	83
Abbildung 2-45: <i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 850.87: Effekt von Kinetin und Indolessigsäure im Konzentrationsverhältnis 1:1 (m/m) auf die Biomassebildung	84
Abbildung 2-46: <i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44: Effekt von Kinetin und Indolessigsäure in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (m/m) auf die Biomassebildung	85
Abbildung 2-47: <i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44: Effekt von 24-Epibrassinolid auf die Biomassebildung	86
Abbildung 2-48: <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68: Effekt von 24-Epibrassinolid auf die Biomassebildung	86

Abbildung 2-49: <i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 850.87: Effekt von 24-Epibrassinolid auf die Biomassebildung	87
Abbildung 2-50: <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68: Effekt durch den Zusatz eines Kulturfiltrates des schnellwachsenden Stammes <i>H. odoratus</i> CBS 553.80 auf die Biomassebildung	88
Abbildung 3-1: Spektrum des sichtbaren Lichts als Teil der elektromagnetischen Strahlung	91
Abbildung 3-2: L-Phenylalanin als Precursor für flüchtige Aromastoffe	92
Abbildung 3-3: Flüchtige phenolische Metabolite in Kulturen von <i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61, oben: ohne Zusatz von L-Phenylalanin, unten: mit Zusatz von L-Phenylalanin	95
Abbildung 3-4: Genese von 1-Octen-3-ol aus Linolsäure	102
Abbildung 3-5: <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Einfluß von UV-A-Licht auf Enzymaktivitäten bei der Biogenese von 4-Methoxyzimtsäuremethylester	113
Abbildung 3-7: Struktur von Kinetin und Indoleessigsäure	119
Abbildung 3-8: Struktur von 24-Epibrassinolid	120
Abbildung 3-9: Struktur von Putrescin, Spermidin und Spermin	121
Abbildung 4-1: Lichtspektrum der UV-A-Lampe (Philips)	135
Abbildung 4-2: Lichtspektrum der „Fluora“-Pflanzenlampe (Osram)	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Agrocybe praecox</i> , CBS 108.59	5
Tabelle 2-2:	Sensorische Beurteilung von <i>Agrocybe praecox</i> , CBS 108.59	6
Tabelle 2-3:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48	6
Tabelle 2-4:	Sensorische Beurteilung von <i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48	7
Tabelle 2-5:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Clitocybe geotropa</i> , CBS 110.21	7
Tabelle 2-6:	Sensorische Beurteilung von <i>Clitocybe geotropa</i> , CBS 110.21	8
Tabelle 2-7:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Clitocybe nebularis</i> , CBS 130.44	9
Tabelle 2-8:	Sensorische Beurteilung von <i>Clitocybe nebularis</i> , CBS 130.44	9
Tabelle 2-9:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44	10
Tabelle 2-10:	Sensorische Beurteilung von <i>Clitocybe odora</i> , CBS 131.44	10
Tabelle 2-11:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Collybia fusipes</i> , CBS 414.79	11
Tabelle 2-12:	Sensorische Beurteilung von <i>Collybia fusipes</i> , CBS 414.79	11
Tabelle 2-13:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Cortinarius percomis</i> , CBS 130.42	12
Tabelle 2-14:	Sensorische Beurteilung von <i>Cortinarius percomis</i> , CBS 130.42	13
Tabelle 2-15:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Cystoderma carcharias</i> , CBS 157.47	13
Tabelle 2-16:	Sensorische Beurteilung von <i>Cystoderma carcharias</i> , CBS 157.47	14
Tabelle 2-17:	Sensorische Beurteilung von <i>Cystostereum murraili</i> , CBS 257.73	15
Tabelle 2-18:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61	16
Tabelle 2-19:	Sensorische Beurteilung von <i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61	17
Tabelle 2-20:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 553.80	17
Tabelle 2-21:	Sensorische Beurteilung von <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 553.80	18
Tabelle 2-22:	Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68	18
Tabelle 2-23:	Sensorische Beurteilung von <i>Hypomyces odoratus</i> , CBS 764.68	19

Tabelle 2-24: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Ischnoderma benzoinum</i> , CBS 211.29	19
Tabelle 2-25: Sensorische Beurteilung von <i>Ischnoderma benzoinum</i> , CBS 211.29	20
Tabelle 2-26: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Lactarius deliciosus</i> , CBS 581.63	21
Tabelle 2-27: Sensorische Beurteilung von <i>Lactarius deliciosus</i> , CBS 581.63	21
Tabelle 2-28: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79	22
Tabelle 2-29: Sensorische Beurteilung von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79	23
Tabelle 2-30: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Lepista irina</i> , CBS 366.47	24
Tabelle 2-31: Sensorische Beurteilung von <i>Lepista irina</i> , CBS 366.47	24
Tabelle 2-32: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 137.86	25
Tabelle 2-33: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Marasmius scorodonius</i> , CBS 850.87	26
Tabelle 2-34: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Meripilus giganteus</i> , CBS 561.86	27
Tabelle 2-35: Sensorische Beurteilung von <i>Meripilus giganteus</i> , CBS 561.86	27
Tabelle 2-36: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Paxillus involutus</i> , CBS 591.89	28
Tabelle 2-37: Sensorische Beurteilung von <i>Paxillus involutus</i> , CBS 591.89	29
Tabelle 2-38: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Polyporus tuberaster</i> , CBS 786.84	30
Tabelle 2-39: Sensorische Beurteilung von <i>Polyporus tuberaster</i> , CBS 786.84	31
Tabelle 2-40: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> , CBS 353.63	31
Tabelle 2-41: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Sparassis crispa</i> , CBS 408.71	33
Tabelle 2-42: Sensorische Beurteilung von <i>Sparassis crispa</i> , CBS 408.71	33
Tabelle 2-43: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Suillus granulatus</i> , CBS 114.42	34
Tabelle 2-44: Sensorische Beurteilung von <i>Suillus granulatus</i> , CBS 114.42	35
Tabelle 2-45: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von <i>Trametes hirsuta</i> , CBS 282.74	35
Tabelle 2-46: Sensorische Beurteilung von <i>Trametes hirsuta</i> , CBS 282.74	36
Tabelle 2-47: Effekte von UV-A-Belichtung und L-Phenylalanin auf die Produktbildung	37
Tabelle 2-48: <i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61: Variation der Medienzusammensetzung	42

Tabelle 2-49:	<i>Gloeophyllum odoratum</i> , CBS 444.61: Wachstumsverhalten bei Variation der Medienzusammensetzung	44
Tabelle 2-50:	<i>Bjerkandera adusta</i> in statischer Oberflächenkultur: Vorkommen von Metaboliten in L-phenylalaninhaltigem Medium bei Zusatz von Halogeniden	51
Tabelle 2-51:	<i>Bjerkandera adusta</i> , CBS 414.48 in statischer Oberflächenkultur: Vorkommen von Metaboliten in L-tyrosinhaltigem Medium bei Zusatz von Halogeniden	52
Tabelle 2-52:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Einfluß der Medienzusammensetzung auf das Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Belichtungsbedingungen	54
Tabelle 2-53:	<i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79: Hauptkomponenten in Pentan/Ether-Extrakten von Sammelproben aus dunkel und belichtet geführten Kulturen	56
Tabelle 3-1:	Beispiele für lichtbedingte Effekte bei Pilzen	90
Tabelle 3-2:	Über den Kulturverlauf im Medium von <i>Lentinus lepideus</i> , CBS 450.79 beobachtete Hauptmetabolite und ihre biochemische Herkunft	109
Tabelle 3-3:	Übersicht über die wichtigsten Gruppen der Phytohormone und ihrer Charakteristika	117
Tabelle 4-1:	Namen und Bezugsquellen der untersuchten Basidiomyceten	126
Tabelle 4-2:	Spurenelementelösung für SNL	127
Tabelle 4-3:	Nährlösung SNL-B ₁	127
Tabelle 4-4:	Nährlösung SNL-Hefe	127
Tabelle 4-5:	Leatham-Medium	128
Tabelle 4-6:	Mineralienlösung für Leatham-Medium	129
Tabelle 4-7:	Spurenelementelösung für Leatham-Medium	129
Tabelle 4-8:	Vitaminlösung für Leatham-Medium	129
Tabelle 4-9:	Eingesetzte Lichtquellen	135
Tabelle 4-10:	Organische Kulturmedienbestandteile	148
Tabelle 4-11:	Anorganische Kulturmedienbestandteile	148
Tabelle 4-12:	Wichtige Standards und Precursoren	149
Tabelle 4-13:	Weitere verwendete Chemikalien	150
Tabelle 4-14:	Verwendete Lösungsmittel	150
Tabelle 4-15:	Verwendete Gase	150
Tabelle 4-16:	Geräte und Hilfsmittel in der Mikrobiologie	151
Tabelle 4-17:	Weitere Hilfsmittel und Geräte	151

Abkürzungsverzeichnis

AED	Atomemissionsdetektor
BSA	Rinderserumalbumin
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
d	Tag
ECD	Elektrochemischer Detektor
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Feuchtmasse
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
4-Hydr.	4-Hydroxylase
IAA	Indolessigsäure
ID	Innendurchmesser
KI	Kovats-Index
Konz.	Konzentration
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
4-MZS-ME	4-Methoxyzimtsäuremethylester
min	Minute
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduzierte Form
N-Quelle	Stickstoffquelle
OMT	O-Methyltransferase
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosylmethionin
SNL	Standard-Nährlösung
Sp.	Spuren
SPME	solid phase microextraction, Festphasenmikroextraktion
TM	Trockenmasse
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

1 Einleitung

Mit dem steigenden Bewußtsein für Umwelt, Gesundheit und Lebensqualität wurden auch die Ernährungsgewohnheiten des modernen Menschen verstärkt Gegenstand der Diskussionen. Viele Nahrungsmittel enthalten Inhaltsstoffe, die auf chemischem Wege hergestellt wurden. Manche Zutatenliste liest sich wie der Beipackzettel eines Arzneimittels. Diesen naturfernen Lebensmitteln haftet der Makel an, sie seien schlecht für die Gesundheit. Der Verbraucher verlangt zunehmend nach Nahrungsmitteln aus natürlichen Zutaten. Zu diesen Zutaten gehören auch die Aroma- und Geschmackstoffe. Die Lebensmittelindustrie ist bemüht, dem Anspruch der Verbraucher nachzukommen und setzt bevorzugt natürliche Aromastoffe ein. Doch die Quellen sind vielfach begrenzt, so daß der Bedarf nicht immer gedeckt werden kann. Diese Verknappung führt zu einer enormen Preisdiskrepanz zwischen natürlichem und künstlich hergestelltem Aromastoff. Jährlich werden etwa 30 t natürliches Vanillin zu einem Kilopreis von nicht weniger als US\$ 3200 vermarktet. Auf chemischem Wege synthetisiertes „naturidentisches“ Vanillin dagegen kostet gerade US\$ 13,50 [WEBSTER, 1995] bei einer Jahresproduktion von mehr als 12000 t [HAGEDORN UND KAPHAMMER, 1994]. Alternative Quellen für natürliche Aromastoffe sind daher von großem wirtschaftlichen Interesse.

Ein populäres Mittel zur Erschließung dieser alternativen Quellen ist die Biotechnologie. Zahlreiche Mikroorganismen sind in der Lage, *de novo* oder durch Biotransformation geeigneter Precursoren die gefragten Substanzen zu synthetisieren [JANSSENS ET AL., 1992]. Die Bedeutung filamentöser Pilze nimmt dabei laufend zu. Sie besitzen ein großes Potential zur Herstellung z. B. phenylpropanoider Verbindungen oder Terpene. Doch die Ausschöpfung dieses Potentials ist häufig nicht ohne weiteres möglich.

Geringes vegetatives Wachstum und geringe Produktivität verteuern den Herstellungsprozeß und machen diesen Weg der Produktgewinnung ökonomisch uninteressant. Zudem wird die Abtrennung der Zielsubstanz nicht selten durch morphologische oder metabolische Eigenschaften der Pilze erschwert (mycelartiges Wachstum, Exkretion von Exopolysacchariden).

Zur Steigerung von Wachstum und Produktbildung werden unterschiedlichste Strategien verfolgt. Als Beispiele seien hier genannt:

- Die Bildung von Biomasse und Sekundärmetaboliten ist stark abhängig von den Kulturbedingungen. Die Zusammensetzung des Nährmediums entscheidet vielfach darüber, ob und in welchem Maße Metabolite von Interesse gebildet werden. Von großer Bedeutung sind hier die Art der Kohlenstoffquelle und das C/N-Verhältnis [FASIDI UND OLORUNMAIYE, 1993; SPRECHER UND HANSSSEN, 1982; HANSSSEN, 1986].

- Durch die Biotransformation zugesetzter Precursoren kann die Ausbeute der Zielsubstanzen erheblich gesteigert werden. L-Phenylalanin ist ein sehr häufig eingesetzter Precursor, da es leicht in den Phenylpropanoidstoffwechsel eingeschleust wird. *Bjerkandera adusta* bildete in L-phenylalaninhaltigem Medium bis zu 587 mg L⁻¹ Benzaldehyd [LAPADATESCU ET AL., 1997].
- Die Abtrennung des Produktes während der Kultivierung beeinflusst das chemische Gleichgewicht und hält zudem die Belastung durch eventuell zellschädigende Substanzen gering. Mögliche Verfahren sind die *in situ*-Adsorption aus dem Medium [ABRAHAM ET AL., 1993], Head-space-Adsorption [KÜHNE UND SPRECHER, 1989] oder der Einsatz von Membranreaktoren [ONKEN, 1998].
- Immobilisierung der Zellen auf festen Oberflächen führt zu verstärktem vegetativem Wachstum und erhöhter Produktbildung [LAPADATESCU ET AL., 1997].

Ein Ansatzpunkt, der bislang außer Acht gelassen wurde, ist die Wahl der Belichtungsparameter. Pilze gelten landläufig als lichtunabhängige Organismen. Lichtstimulierte Differenzierungsprozesse oder Pigmentbildung zeigen jedoch sehr anschaulich, daß auch diese Organismen auf Lichtreize reagieren. Trotz dieser deutlichen Hinweise auf den Einfluß von Licht auf die Entwicklung von Pilzen gibt es kaum Erkenntnisse über Wirkmechanismen und die Effekte auf den Stoffwechsel.

NAMBUDIRI ET AL. [1973] zeigten die Stimulation von Enzymen des Phenylpropanoidstoffwechsels durch Tageslicht in *Polyporus hispidus*. BÖKER [1997] steigerte in *Nidula niveotomentosa* die Bildung von Himbeeralkohol (4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-ol) und Himbeerketon (4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on), der *character impact compound* des Himbeeraromas, durch Belichtung der Kulturen mit UV-A-Licht. Möglicherweise handelt es sich in diesen beiden Fällen um exotische Ausnahmen. In Anbetracht der verschiedenen Hinweise auf photoregulative Effekte ist es jedoch denkbar, daß auch in weiteren Pilzen die Bildung aromaaktiver Metabolite stimuliert werden könnte.

Neben mikrobiellen Systemen werden auch pflanzliche Zellkulturen zur Produktion von Sekundärmetaboliten eingesetzt. Von großer praktischer Bedeutung sind hier die sogenannten Phytohormone. Diese Effektoren steuern Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel. Ohne sie ist die Pflanzenbiotechnologie nicht möglich [GALSTON UND KAURSAWHNEY, 1995]. An den natürlichen Standorten sind Pilze und Pflanzen häufig vergesellschaftet. In symbiotischen Lebensgemeinschaften beeinflussen sie sich durch die Abgabe von Effektoren gegenseitig. Es konnte gezeigt werden, daß Phytohormone dabei auch auf Wachstum und Stoffwechsel der Pilze Einfluß nehmen [GOGALA, 1991].

Obwohl bereits erste Erfolge in ihrer Anwendung auf Pilze erzielt wurden, haben Mediatoren bislang noch keinen Einzug in die Biotechnologie der Pilze gefunden.

1.1 Zielsetzung

Es ist bekannt, daß Licht bei Pilzen stimulierend auf Differenzierungsprozesse oder Pigmentbildung wirkt. Bei vielen Pilzen ist die Stimulation von Fruchtkörperbildung und Sporulation durch Licht zu beobachten. Möglicherweise hat die Bildung von Aromastoffen in den Fruchtkörpern, analog zu Blütenpflanzen, eine Signalfunktion, die zur Verbreitung der Sporen durch Tiere beiträgt. Insbesondere vor diesem Hintergrund ist ein Einfluß von Licht auf die Aromabildung vorstellbar. BÖKER [1997] beschrieb die positive Wirkung von UV-A-Licht auf die Bildung von Himbeeralkohol und -keton, NAMBUDIRI [1973] zeigte die Stimulation von Enzymaktivitäten des Phenylpropanoidstoffwechsels. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob bei weiteren Pilzen belichtungsbedingte Effekte bezüglich der Aromabildung erzielt werden können.

Der Ablauf sollte sich in mehrere Abschnitte gliedern:

- Untersuchung einer Auswahl von Pilzen hinsichtlich des Einflusses von UV-A-Licht auf die Bildung aromaaktiver Metabolite,
- besondere Berücksichtigung des Phenylpropanoidstoffwechsels (Applikation von L-Phenylalanin als Precursor),
- detaillierte Untersuchung positiver Effekte, Aufklärung der photoregulierten Geneschritte.

Im weiteren Zusammenhang sollten folgende Aspekte bearbeitet werden:

- Untersuchung von Phytohormonen auf ihr Potential, Wachstum und Aromabildung in Pilzen zu stimulieren,
- möglicherweise deren Einsatz, um langsam wachsende Pilze der Untersuchung zugänglich zu machen.

2 Ergebnisse

2.1 Screening verschiedener Pilzstämme

Die Submerskultivierung der 30 verschiedenen Pilze erfolgte in SNL-Hefe. Vorkulturen sowie Kontrollansätze wurden in Dunkelheit inkubiert. Belichtete Kulturen wurden von Beginn der Inkubation an für 14 h d^{-1} dem Licht von UV-A-Lampen ausgesetzt. Da ein besonderes Augenmerk auf die Synthese phenylpropanoider Strukturen gelegt werden sollte, wurde L-Phenylalanin in einer Konzentration von 10 mmol L^{-1} zugesetzt. Entsprechende Kontrollansätze blieben ohne Zusatz.

2.1.1 Vorbemerkungen

Für jede aufgeführte Substanz wurden der Kovatsindex (KI_{best} = aus der Probe bestimmt, KI_{Ref} = Literaturwert bzw. durch Referenzsubstanz bestimmt) sowie die Konzentrationsverhältnisse in den unterschiedlichen Kulturansätzen angegeben.

Die Bezeichnung der vier Kulturansätze erfolgte nach dem Schema D = dunkel geführte, H = belichtete Kultur und 0 = ohne, P = mit Zusatz von L-Phenylalanin. Die jeweils in den vier unterschiedlichen Proben ermittelten Konzentrationen wurden auf den geringsten Wert normiert (Konz.-Verhältnis). Die Konzentrationen wurden in die folgenden Bereiche (Konz) eingeordnet: + = $0-1 \text{ mg L}^{-1}$; ++ = $1-5 \text{ mg L}^{-1}$; +++ = $5-10 \text{ mg L}^{-1}$ sowie ++++ = $>10 \text{ mg L}^{-1}$. Diese Einordnung bezog sich auf den unter der Rubrik „Konz.-Verhältnis“ mit „1“ angegebenen Faktor. Sehr geringe Substanzmengen wurden als Spuren (Sp.) bezeichnet. Wurde eine Substanz in einem der Ansätze nicht detektiert, wurde dies mit „-“ gekennzeichnet. Die Quantifizierung erfolgte in bezug auf einen externen Standard. Aus methodischen Gründen (vergleichende Untersuchungen) wurde auf eine exakte Kalibrierung der einzelnen Substanzen verzichtet. Bedingt durch die unterschiedlichen Kultivierungszeiten der einzelnen Stämme variierte die Zahl von Einzelproben, die zu einer Sammelprobe vereinigt wurden. Verdünnungseffekte waren daher von Stamm zu Stamm verschieden.

Belichtungsbedingte Verschiebungen der Konzentrationsverhältnisse sind in der Tabelle fett hervorgehoben. Die Entscheidung, ob ein Effekt vorlag, war in erster Linie abhängig vom Konzentrationsbereich und der Größenordnung des Konzentrationsverhältnisses. Ein beobachtetes Verhältnis von 1:2 auf einem niedrigen Konzentrationsniveau ist voraussichtlich auf zufällige Schwankungen zurückzuführen, wohingegen eine Verdoppelung der Konzentration von 10 auf 20 mg L^{-1} auf die Wirkung exogener Faktoren hindeutet.

Substanzen, deren Bildung durch den Zusatz von L-Phenylalanin als Precursor begünstigt wurde, sind kursiv geschrieben.

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich Angaben zu Kulturparametern und Wachstumseigenschaften auf alle Kulturen eines Stammes (= keine Unterschiede). Der Biomassezuwachs wurde nach visuellen Eindrücken beurteilt. Angaben über Färbung und Geruchseindrücke der Fruchtkörper wurden einschlägigen Lexika entnommen [CETTO (Ed.), 1992; MICHAEL ET AL. (Eds.), 1987].

Am Ende dieses Abschnittes werden die beobachteten Effekte in einer zusammenfassenden Tabelle (Tabelle 2-47, S. 37) aufgeführt.

2.1.2 *Agrocybe praecox*, CBS 108.59

Tabelle 2-1: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Agrocybe praecox*, CBS 108.59

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
1-Octen-3-on	1307	1299	++	Sp.	Sp.	1	2
trans-2-Octenal	1406	1423	+	Sp.	Sp.	Sp.	1
Essigsäure	1432	1410	+	1	1	1	1
1-Octen-3-ol	1445	1447	+	1	4	2	9
<i>Benzaldehyd</i>	1489	1492	+	–	–	1	3
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1598	1618	+	1	1	1	1
<i>Phenylacetaldehyd</i>	1612	1618		–	–	Sp.	Sp.
γ -Butyrolacton	1613	1632		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1880	1883	+	–	–	Sp.	1
<i>cis-Zimtsäuremethylester</i>	1920	1920		–	–	–	Sp.
<i>trans-Zimtsäuremethylester</i>	2065	2050	+	1	3	4	4
p-Anissäuremethylester	2081	2080	+	Sp.	1	Sp.	Sp.
cis-4-Methoxyzimtsäuremethylester	2423	2420	+	Sp.	1	Sp.	Sp.
trans-4-Methoxyzimtsäuremethylester	2566	2567	+	Sp.	1	Sp.	Sp.

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Die Precursorwirkung des L-Phenylalanins war gering. Die Produktkonzentrationen lagen unter 1 mg L⁻¹.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Ein Belichtungseffekt war lediglich in bezug auf 1-Octen-3-ol zu erkennen.

Tabelle 2-2: Sensorische Beurteilung von *Agrocybe praecox*, CBS 108.59

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
4	Spargel	Spargel	Spargel, Styrol	Spargel, Styrol
7	grün, Erbse	grün, Erbse	grün, Erbse	grün, Erbse
9	schwach Erbse	schwach Erbse	Erbse	Erbse
11	schwach Erbse	schwach Erbse	schwach Erbse	schwach Erbse
14	–	–	schwach Erbse	schwach Erbse

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: Kakao

Mit 14 Tagen war die Kultivierungsperiode vergleichsweise kurz. Der Pilz bildete kleine kompakte Pellets mit glatter Oberfläche. Die beiden Kulturen ohne L-Phenylalaninzusatz blieben hell, während sich die beiden anderen Ansätze im Kulturverlauf bräunlich färbten. Die Farbe der Fruchtkörper von *A. praecox* wird in der Literatur als schmutzig weiß angegeben. Der pH-Wert des Mediums sank innerhalb der ersten 4 Tage auf ca. 4,5. Am 14. Kulturtag setzte ein stetiger Anstieg ein. Glucose war am 14. Kulturtag nicht mehr detektierbar.

2.1.3 *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48

Tabelle 2-3: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48

Substanz	Kl _{best}	Kl _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
3-Methyl-1-butanol	1206	1215	+	2	1	2	1
Octansäureethylester	1437	1422		Sp.	–	–	–
Essigsäure	1490	1410	+	1	2	–	–
<i>Benzaldehyd</i>	1494	1492	+	–	–	1	2
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1622	1618		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Benzoessäureethylester</i>	1637	1649	+	–	–	1	1
Phenylmethanol	1855	1851	++	–	–	1	2
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1885	1883	+	–	–	1	2
γ -Nonalacton	1983	1996		Sp.	Sp.	–	Sp.
γ -Decalacton	2103	2107		–	Sp.	–	Sp.
Nonansäure	2150	2163		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
3,5-Dichloranisaldehyd	2163		++	1	1,5	1,5	4
<i>Benzoessäure</i>	2388	2409	++	–	–	1	1
3,5-Dichloranisalkohol	2768		++	–	–	1	4

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Nach Zusatz von L-Phenylalanin wurden vermehrt phenolische Komponenten detektiert.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Die Bildung von Phenylmethanol sowie zwei chlorierter Anisyl-derivate wurde durch die Belichtung stimuliert.

Tabelle 2-4: Sensorische Beurteilung von *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	–	–	–	–
7	süßlich	süßlich	süß, aromatisch	süß, aromatisch
9	süß	süß	süß	Bittermandel
11	süß, frisch	süß, frisch	süß, Bittermandel	süß, Bittermandel
13	schwach süß	schwach süß	schwach süß	Bittermandel
beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: süß, aromatisch				

Die Biomassebildung war während der 13tägigen Kultivierungsdauer sehr hoch. Das sehr lockere Mycel formte große, blaßgelbe Pellets mit langen Ausläufern. Der Fruchtkörper wird als ledergelb oder fuchsig beschrieben. Der pH-Wert lag konstant bei 5,0 und stieg vom 7. Kulturtag an bis auf ein Niveau von 6,5 ab dem 10. Tag. Nach einer stetigen Konzentrationsabnahme war die Glucose im Medium nach 10 Tagen verbraucht. Es wurde eine starke Viskositätserhöhung des Kulturmediums beobachtet.

2.1.4 *Clitocybe geotropa*, CBS 110.21

Tabelle 2-5: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Clitocybe geotropa*, CBS 110.21

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
Essigsäure	1445	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Benzaldehyd	1491	1492	++++	Sp.	Sp.	1	1,5
<i>Benzoessäuremethylester</i>	1589	1601	++	–	–	2	1
Phenylacetaldehyd	1614	1618	+	1	1	1	1
γ -Butyrolacton	1620	1632	+	1	1	1	1
Phenylmethanol	1855	1851	++++	–	–	2	1
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1883	1883	++	–	–	1	1
<i>cis-Zimtsäuremethylester</i>	1923	1930	+	–	–	Sp.	1
<i>p-Anisaldehyd</i>	1982	1982	+	–	–	1	2
<i>trans-Zimtaldehyd</i>	1996	2001	+	–	–	1,5	1
3-Phenyl-1-propanol	2016	2020	++	–	–	2,5	1
<i>trans-Zimtsäuremethylester</i>	2037	2050	+	–	–	4	1
<i>trans-Zimtalkohol</i>	2250	2252	+	–	–	1,5	1
Decansäure	2273	2244	+	5	1	3	Sp.
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2390	2410	++	Sp.	1	2	4

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Zahlreiche phenolische Metabolite wurden erst durch Zusatz von L-Phenylalanin gebildet. Insbesondere Benzaldehyd und Phenylmethanol wurden in hohen Konzentrationen (>10 mg L⁻¹) ins Medium abgegeben.

- Belichtungsabhängige Produktbildung: Während Benzaldehyd und p-Anisaldehyd bei UV-A-Belichtung in höheren Konzentrationen gebildet wurden, führte die Belichtung mehrfach zu verminderten Metabolitenkonzentrationen im Medium.

Tabelle 2-6: Sensorische Beurteilung von *Clitocybe geotropa*, CBS 110.21

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
9	–	–	schwach süßlich	schwach süßlich
13	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald.	Benzald.
16	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald.	Benzald.
20	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald., frisch	Benzald.
23	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald.	Benzald.
24	–	–	Benzald.	Benzald.
27	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald., pilzig	Benzald., pilzig
30	–	–	Benzald., süßl.	Benzald., süßl.
34	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald., süßl.	Benzald., süßl.
37	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald.	Benzald.
41	schwach pilzig	schwach pilzig	Benzald., süßl.	Benzald., süßl.
44	–	–	Benzald., süßl.	Benzald., süßl.
47	–	–	Benzald.	Benzald.
51	–	–	Benzald.	Benzald.
54	–	–	Benzald.	Benzald.
57	–	–	–	–

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: obstartig

Die Wachstumsgeschwindigkeit von *C. geotropa* war sehr gering. Nach 57 Tagen wurde die Kultivierung abgebrochen. Der Biomassezuwachs war minimal. Die kleinen Pellets sowie das Medium verfärbten sich leicht rot-bräunlich. Die Fruchtkörper werden in der Literatur als ocker- bis mirabellenfarbig beschrieben. Der pH-Wert sank bis zum 12. Kulturtag stetig bis auf 4,5 und blieb anschließend konstant. Bei Abbruch der Kultivierung betrug die Glucosekonzentration im Medium 20 g L⁻¹ (Ausgangskonzentration: 30 g L⁻¹).

2.1.5 *Clitocybe nebularis*, CBS 130.44

Tabelle 2-7: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Clitocybe nebularis*, CBS 130.44

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
3-Octanon	1237	1242	+	1	1	–	–
cis-Linalooloxid, furanosid	1453	1426	+	Sp.	Sp.	1	2,5
Linalool	1541	1519	+	3	1	1	2
5-Methyl-2-furaldehyd	1557	1549		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1609	1618		–	–	Sp.	Sp.
<i>Phenylacetaldehyd</i>	1609	1609	+	–	–	1	1
<i>Acetophenon</i>	1615	1611	+	–	–	1	1
trans-Linalooloxid, pyranosid	1769	1764		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
trans-Zimtaldehyd	1995	2001		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
3-Phenyl-1-propanol	2016	2020	+	2	1	Sp.	Sp.
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2473	2410	+	1	1	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Nur bei den geringkonzentrierten Metaboliten Phenylacetaldehyd und Acetophenon wurde eine Precursorwirkung beobachtet.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Belichtungseffekte waren nicht ersichtlich.

Tabelle 2-8: Sensorische Beurteilung von *Clitocybe nebularis*, CBS 130.44

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
7	schwach süß	schwach süß	–	–
9	schokoladig	schokoladig	schokoladig	schokoladig
11	angenehm süß	angenehm süß	angenehm süß	angenehm süß
14	schwach süß	schwach süß	schwach süß	schwach süß
16	–	schwach süß	schwach süß	schwach süß
18	leicht pilzig	–	schwach süß	–
21	schwach süß	schwach süß	schwach süß	schwach süß
24	schwach süß	schwach süß	schwach süß	schwach süß
26	angenehm süß	angenehm süß	angenehm süß	angenehm süß
29	angenehm süß	angenehm süß	angenehm süß	angenehm süß
31	schwach süß	schwach süß	angenehm süß	angenehm süß
33	süß	süß, leicht pilzig	schwach süß	schwach süß
36	süß	süß, pilzig	schwach	schwach

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: aufdringlich süß, würzig

C. nebularis wies eine nur sehr geringe Wachstumsgeschwindigkeit auf. Am 36. Kulturtag wurde die Kultivierung abgebrochen. Der Biomassezuwachs war gering. Die Kulturmedien verfärbten sich kräftig gelb. Für den Fruchtkörper wird eine bis gelbgräuliche Farbe angegeben. Der pH-Wert in den supplementierten Kulturen sank auf 4,3 am 21. Tag, bevor er ab dem 31. Tag zu steigen begann. In den Kulturen ohne Zusatz von L-Phenylalanin wurde ab dem 11. Kulturtag konstant ein pH-Wert von 6,3 gemessen. In den Nährmedien aller Ansätze befand sich bei Abbruch der Kultivierung noch Restglucose (ca. 5 g L⁻¹).

2.1.6 *Clitocybe odora*, CBS 131.44

Tabelle 2-9: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Clitocybe odora*, CBS 131.44

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
Essigsäure	1430	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
1-Octen-3-ol	1447	1445		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Benzaldehyd	1492	1492	+	1	1	15	10
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1610	1618		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Phenylacetaldehyd</i>	1616	1618	+	–	–	1	1
<i>1-Phenyl-1,2-propandion</i>	1799	1800		–	–	Sp.	Sp.
Phenylmethanol	1852	1851	++	–	–	4	1
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1883	1883	+	–	–	2	1
p-Anisaldehyd	1980	1982	+	–	–	2,5	1
<i>trans-Zimtaldehyd</i>	1995	2001	+	–	–	1	2
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	2020	2020		–	–	Sp.	Sp.
p-Anisalkohol	2252	2210	+	–	–	2	1
<i>trans-Zimtalkohol</i>	2259	2252		–	–	Sp.	Sp.
3-Chlor-p-Anisaldehyd	2295		+	Sp.	–	3	1
Benzoessäure	2389	2409	+	–	–	3	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Der Zusatz von L-Phenylalanin führte zur Bildung zahlreicher phenolischer Metabolite. Die Konzentrationen waren nur gering (Ausnahme: 8 mg L⁻¹ Phenylmethanol in der dunkel geführten Kultur mit Zusatz).
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Verminderte Metabolitenkonzentrationen in allen Fällen deuteten auf einen negativen Einfluß der UV-A-Belichtung hin.

Tabelle 2-10: Sensorische Beurteilung von *Clitocybe odora*, CBS 131.44

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	–	–	schwach süßlich	schwach süßlich
7	–	–	Vanillepudding	schwach süßlich
10	schwach	schwach	süß, cremig	süß, cremig
12	schwach	schwach	süß, cremig	süß, cremig
14	schwach	schwach	süß	süß
17	muffig	muffig	süß, stechend	süß, stechend
19	–	–	–	–

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: stark nach Anis

Mit einer Kulturdauer von 21 Tagen war die Wachstumsgeschwindigkeit moderat. Keine der Kulturen nahm die grün-blaue Farbe des Fruchtkörpers an. Lediglich die belichtete Kultur mit L-Phenylalaninzusatz zeigte gegen Ende des Kulturzeitraumes einen leichten Grünschimmer. Ansonsten blieben die Pellets hell, die Medien blaßgelb. Der pH-Wert stieg über den gesamten Kulturverlauf stetig an und erreichte am 21. Kulturtag einen Wert von ca. 7,0. Nach 21 Tagen wurde keine Glucose mehr im Medium detektiert.

2.1.7 *Collybia fusipes*, CBS 414.79

Tabelle 2-11: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Collybia fusipes*, CBS 414.79

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1092	1092	++	1,5	1	1,	1
2-Methyl-1-butanol	1226	1241	++	1,5	1,5	1,5	1
Benzaldehyd	1488	1492	++	Sp.	1	1	1
Linalool	1548	1519	+	4	1	3	5
2,3-Butandiol	1553	1540		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Benzoessäuremethylester	1578	1601	+	1	1	1	1
<i>Benzoessäureethylester</i>	1632	1649	+	1	3	30	2
2-Methylbuttersäure	1688	1680	+++	1,5	1,5	1,5	1
cis-Carveol	1852	1820	+	12	1	7	1
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1880	1883	++	Sp.	1	4	4
p-Anisaldehyd	1998	1982	++	–	1	1	1
trans-Zimtaldehyd	2010	2001		–	Sp.	Sp.	Sp.
3-Phenyl-1-propanol	2030	2020	+++	Sp.	1	1	2
trans-Zimtsäuremethylester	2033	2050	+	1	2	10	3
4-Phenyl-2-butenon	2091	2103	+	1,5	1	4	2
trans-Zimtsäureethylester	2117	2101	+	–	–	1	Sp.
cis-Zimtalkohol	2147	2152	+	1	5	2	8
Drimenol	2523	2525		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Auch ohne Zusatz von L-Phenylalanin bildete *C. fusipes* phenolische Metabolite. Durch den Zusatz wurden die Konzentrationen des Benzoessäureethylesters, des trans-Zimtsäuremethylesters sowie von 2-Phenyl-1-ethanol und besonders 3-Phenyl-1-propanol erhöht.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Während sich insbesondere die Konzentration von 3-Phenyl-1-propanol bei Belichtung verdoppelte (auf ca. 12 mg L⁻¹ bei Zusatz von L-Phenylalanin), wurden die Konzentrationen anderer Metabolite vermindert (cis-Carveol, trans-Zimtsäuremethylester).

Tabelle 2-12: Sensorische Beurteilung von *Collybia fusipes*, CBS 414.79

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	leicht würzig	Benzaldehyd	Benzaldehyd	Benzaldehyd
8	Benzaldehyd	Benzaldehyd	Benzaldehyd	Benzaldehyd
10	fruchtig	fruchtig	fruchtig, obstig	Benzaldehyd
12	fruchtig, frisch	fruchtig, frisch	fruchtig	fruchtig, frisch
14	fruchtig, süß	fruchtig, süß	fruchtig, obstig	fruchtig, herb
17	säuerlich	obstig	obstig	obstig
beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: zimtartig				

Während der ersten 10 Kulturtage war ein schneller Biomassezuwachs zu beobachten. Die lockeren Pellets und die Medien blieben blaß-gelblich. Der Fruchtkörper von

C. fusipes dagegen ist nach Literaturangaben ziegelrot. Der pH-Wert in den Kulturmedien ohne Phenylalaninzusatz lag bei konstant 5,0, die supplementierten Kulturen säuerten ihr Medium auf pH 4,5. Die Glucose war nach 12 Kulturtagen verbraucht.

2.1.8 *Cortinarius odorifer*, CBS 517.95

Für den kupferrötlichen Fruchtkörper von *C. odorifer* wird ein starker Anisgeruch beschrieben. In Submerskultur konnte dieser Geruchseindruck nicht bestätigt werden. Der Pilz zeigte ein extrem langsames Wachstum. Wiederholtes Homogenisieren und Umsetzen der gesamten Biomasse in frisches Kulturmedium führten nicht zu einer Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Aufgrund der zu geringen Wachstumsrate und des unspezifischen Geruchseindrucks wurde auf weiterführende Versuche verzichtet.

2.1.9 *Cortinarius percomis*, CBS 130.42

Tabelle 2-13: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Cortinarius percomis*, CBS 130.42

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1090	1092	++	1	1	1	1
3-Methyl-1-butanol	1190	1215	+	1	1	1	1
3-Hydroxy-2-butanon	1289	1295	+	1	1	1	1
Essigsäure	1442	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Benzaldehyd</i>	1476	1492	++	1	1,5	4	3
<i>Benzoessäuremethylester</i>	1570	1601	++	1,5	1	3	2,5
<i>Benzoessäureethylester</i>	1613	1649	+	1	1,5	2	2
<i>Phenylmethanol</i>	1835	1851	++++	1	1	5	4
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1863	1883	+++	1	1	5	4
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	1998	2020	++++	Sp.	1	1,5	1,5
<i>cis-Zimtalkohol</i>	2127	2152	+	Sp.	Sp.	1	5
<i>trans-Zimtalkohol</i>	2225	2252	++	Sp.	1	6	3
<i>Benzoessäure</i>	2386	2409	+	Sp.	Sp.	1	1
Phenyllessigsäure	2500	2569		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: *C. percomis* bildete auch ohne den Zusatz von L-Phenylalanin phenolische Metabolite. Zusätzliches L-Phenylalanin verstärkte die Bildung aller dieser Substanzen.

- Belichtungsabhängige Produktbildung: Die Belichtung mit UV-A hatte keine stimulierende Wirkung. Die Konzentrationen von Phenylmethanol, 2-Phenyl-1-ethanol sowie trans-Zimtalkohol waren in belichteten Kulturen sogar vermindert.

Tabelle 2-14: Sensorische Beurteilung von *Cortinarius percomis*, CBS 130.42

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
9	–	–	leicht verbrannt	leicht verbrannt
12	leicht verbrannt	leicht verbrannt	verbrannt	verbrannt
15	kaum	kaum	verbrannt	verbrannt
19	leicht pilzig	leicht pilzig	süß	süß, verbrannt
22	pilzig, erdig	pilzig, erdig	leicht verbrannt	leicht verbrannt

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: stark gewürzartig (Majoran)

Die Glucose im Kulturmedium wurde bis zum 22. Kulturtag verbraucht. Damit gehörte *C. percomis* zu den mäßig schnell wachsenden Pilzen. In Übereinstimmung mit der beschriebenen Farbe des Fruchtkörpers färbten sich Medium und Pellets im Laufe der Zeit kräftig gelb. Der pH-Wert betrug bis zum 15. Kulturtag konstant 4,5. Bei einer Glucosekonzentration von etwa 5 g L⁻¹ begann der Wert stetig zu steigen und erreichte bei Beendigung der Kultivierung etwa 6,0.

2.1.10 *Cystoderma carcharias*, CBS 157.47

Tabelle 2-15: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Cystoderma carcharias*, CBS 157.47

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1092	1092	++	1	2	1	4
3-Methyl-1-butanol	1201	1215	+	1	1	2	2
Essigsäure	1431	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Benzaldehyd</i>	1479	1492	++	–	–	1	1
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1583	1618		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Phenylacetaldehyd	1585	1618		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Benzoessäureethylester</i>	1618	1649	+	–	–	1	1
<i>Phenylmethanol</i>	1838	1851	++++	Sp.	Sp.	1	1,5
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1866	1883	+	Sp.	Sp.	1	2,5
<i>trans-Zimtaldehyd</i>	1975	2001	+	–	–	1	1
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	2010	2020	++++	–	–	1	1
<i>trans-Zimtsäuremethylester</i>	2026	2050	++++	–	–	1	1
Octansäure	2036	2070		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>trans-Zimtsäureethylester</i>	2070	2081	+	–	–	1	1
Nonansäure	2137	2163	+	1	1	1	1
cis-Zimtalkohol	2147	2152		–	–	–	Sp.
<i>trans-Zimtalkohol</i>	2232	2252	+++	–	–	1	1,5

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Zugewetztes L-Phenylalanin wurde von *C. carcharias* sehr gut umgesetzt, wie die zahlreichen abgeleiteten Metabolite zeigten. Insbesondere Phenylmethanol, 3-Phenyl-1-propanol, trans-Zimtsäure und trans-Zimtalkohol wurden in erheblichen Konzentrationen gebildet (bis über 10 mg L⁻¹).
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Eindeutige Belichtungseffekte wurden nicht beobachtet.

Tabelle 2-16: Sensorische Beurteilung von *Cystoderma carcharias*, CBS 157.47

Kulturtag	DO	H0	DP	HP
1	säuerlich	säuerlich	säuerlich	säuerlich
2	obstig	obstig, rauchig	säuerlich, obstig	sauer, verbrannt
3	obstig	obstig	verbrannt	verbrannt
4	süßlich	obstig	verbrannt, blumig	verbrannt, blumig
5	fruchtig	leicht frisch	leicht frisch	verbrannt, leicht fruchtig

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: keine Angabe

Die Wachstumsgeschwindigkeit von *C. carcharias* erwies sich als sehr hoch. Die Zelldichte war am Ende des Kultivierungszeitraumes von lediglich 5 Tagen so hoch, daß die Separation des Mediums erschwert wurde. Glucose wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr detektiert. *C. carcharias* säuerte das Medium kurzzeitig bis auf pH 4,0 an. Der pH-Wert in der belichteten Kultur ohne Phenylalaninzusatz lag etwa eine halbe Einheit darüber. Die kleinen, locker wachsenden Pellets sowie das Kulturmedium waren blaßgelb. Der Fruchtkörper des Pilzes dagegen wird in der Literatur als fleischrosa oder braun beschrieben.

2.1.11 *Cystostereum murraili*, CBS 257.73

Die GC-Chromatogramme zeigten das Vorkommen verschiedener Substanzen an, die nicht durch GC-MS-Untersuchungen identifiziert werden konnten. Die Fragmentierungsmuster deuteten jedoch darauf hin, daß es sich in der Regel um Terpene handelte. Ein Einfluß der UV-A-Belichtung auf die Synthese war nicht erkennbar, von weiterreichenden Maßnahmen zur Identifizierung wurde daher abgesehen.

Appliziertes L-Phenylalanin hatte keine Funktion als Precursor für flüchtige Metabolite.

Tabelle 2-17: Sensorische Beurteilung von *Cystostereum murrayi*, CBS 257.73

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	schwach blumig	schwach blumig	schwach blumig	schwach blumig
7	–	frisch	–	frisch
9	frisch, blumig	frisch, blumig	frisch, blumig	frisch, blumig
12	leicht anisartig	leicht anisartig	leicht anisartig	leicht anisartig
14	leicht anisartig	–	leicht anisartig	–
16	leicht anisartig	–	–	–

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: vanilleartig, blumig

Trotz des geringen Biomassezuwachse war die Glucose nach 16 Kulturtagen verbraucht. Nach einem anfänglich konstanten pH-Wert von 5,0 in Kulturen mit L-Phenylalaninzusatz und 5,9 ohne Zusatz war ab dem 7. Kulturtag in den belichteten Ansätzen ein langsamer Anstieg bis ca. pH 7,0 am 16. Tag zu verzeichnen. Die kleinen Pellets von *C. murrayi* färbten sich auffällig rosa, die rote Farbe des Mediums intensivierte sich im Laufe der Kultivierung.

2.1.12 *Exidia thuretiana*, CBS 215.63

Die Wachstumsrate von *E. thuretiana* war zu gering, um Untersuchungen in einem angemessenen Zeitrahmen durchführen zu können. Auch durch wiederholtes Homogenisieren und Umsetzen in frisches Kulturmedium konnte die Wachstumsgeschwindigkeit nicht gesteigert werden. Die Submerskulturen wiesen zu keinem Zeitpunkt den für den Fruchtkörper beschriebenen Geruch nach Zedernholz auf.

2.1.13 *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61

Tabelle 2-18: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1095	1092	+	1	2	2	3
3-Methyl-1-butanol	1214	1215	++	1	Sp.	1	1
3-Octanon	1233	1242	+	1	1,5	–	–
3-Octanol	1397		+	1	1,5	–	–
Essigsäure	1452	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
1-Octen-3-ol	1454	1445	++	1	4	1,5	3
Benzaldehyd	1492	1492	++	–	–	1	2,5
1-Octanol	1563	1535	+	1	2	1	2
3-Methylbutansäure	1669	1678	+	1	1,5	2,5	1,5
<i>Phenyllessigsäuremethylester</i>	1735	1726	+	1	1	7	7
β -Citronellol	1765	1731	+	1,5	1	2,5	3
Geraniol	1833	1801	++	–	Sp.	1	2
<i>cis</i> -Zimtaldehyd	1852		+	–	–	1	1
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1888	1883	++++	–	–	1	1
3,7-Dimethyl-3-hydroxy-6-octensäuremethylester	1896		++++	1	1	2	2
trans-Zimtaldehyd	1998	2001	+++	–	–	1	1,5
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	2023	2020	+	Sp.	Sp.	1	1
Octansäure	2051	2056	+	1	1,5	1	2
cis-Zimtalkohol	2153	2152	+	–	–	1	10
Nonansäure	2163	2163	+	4	4	1	1
<i>Benzoessäure</i>	2393	2409	+	–	–	1	1
Drimenol	2521	2525	+	1	1	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Nach Zusatz von L-Phenylalanin wurden verstärkt phenolische Metabolite detektiert. Die Konzentrationen von 2-Phenyl-1-ethanol und trans-Zimtaldehyd erreichten Konzentrationen von über 10 mg L⁻¹. Aufgrund der hohen Wachstumsgeschwindigkeit wurde das L-Phenylalanin bereits am 2. Kulturtag zugeführt.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Die UV-A-Belichtung wirkte sich positiv auf die Konzentrationen von C₈-Verbindungen sowie Benzaldehyd, trans-Zimtaldehyd und cis-Zimtalkohol aus.

Tabelle 2-19: Sensorische Beurteilung von *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
3	–	–	–	–
4	süß	süß	frisch	verbrannt
5	leicht harzig	leicht harzig	stark verbrannt	stark verbrannt
6	obstig	obstig	stark verbrannt	stark verbrannt
7	schwach obstig	schwach obstig	stark verbrannt	stark verbrannt
8	schwach obstig	schwach obstig	verbrannt	verbrannt
9	schwach obstig	schwach obstig	verbrannt	verbrannt

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: Fenchel, Anis

Die hohe Biomasse sowie die Viskositätserhöhung erschwerten die tägliche Probenahme. *G. odoratum* wuchs sehr schnell und verbrauchte die Glucose innerhalb von 8 Tagen. Der pH-Wert sank bis zum 6. Tag auf 3,5 ab. Der Pilz bildete sehr lockere Hyphengeflechte mit langen Ausläufern. Während der Fruchtkörper als ziegelrot oder fuchsigbraun beschrieben wird, blieb *G. odoratum* in Submerskultur blaßgelb.

2.1.14 *Hypomyces odoratus*, CBS 553.80

Tabelle 2-20: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Hypomyces odoratus*, CBS 553.80

Substanz	Kl _{best}	Kl _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
3-Methyl-1-butanol	1214	1215	+	1	–	1	–
Essigsäure	1435	1410	+	1	1	1	1
1-Octen-3-ol	1445	1445	+	1	1	1	1
Benzaldehyd	1491	1492	+	Sp.	2	1	2
5-Methyl-2-furaldehyd	1551	1563		–	–	Sp.	–
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1601	1618	+	1	1	1	1
γ-Butyrolacton	1611	1632	+	1	1	1	1
Phenylacetaldehyd	1619	1618	+	–	–	4	1
2-Phenyl-1-ethanol	1883	1883	+	–	–	4	1
Octansäure	2034	2056		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Nonansäure	2140	2163	+	1	1	1	1
Decansäure	2253	2244		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2469	2410	+	1	–	1	–
Tetradecansäure	2677			Sp.	Sp.	Sp.	Sp.

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Nach Zusatz von L-Phenylalanin wurden bei Kultivierung unter Lichtausschluß Phenylacetaldehyd und 2-Phenyl-1-ethanol in Konzentrationen von etwa 2 bzw. 5 mg L⁻¹ detektiert. Aufgrund der hohen Wachstumsgeschwindigkeit des Pilzes erfolgte der Zusatz bereits am 2. Kulturtag.

- Belichtungsabhängige Produktbildung: In dunkel geführten Kulturen wurden die vierfachen Konzentrationen von Phenylacetaldehyd und 2-Phenyl-1-ethanol gemessen.

Tabelle 2-21: Sensorische Beurteilung von *Hypomyces odoratus*, CBS 553.80

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
3	–	–	–	–
4	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig
5	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig
6	muffig	muffig	muffig	muffig
7	–	–	–	–

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: kampherartig

Der Biomassezuwachs war sehr hoch. Die Glucose war bereits am 7. Kulturtag verbraucht. Der pH-Wert lag bis zum 5. Kulturtag konstant bei 4,0, bevor er schnell auf 7,5 am 7. Tag anstieg. Die Pellets von *H. odoratus* waren sehr unregelmäßig in ihrer Form und erreichten nur einen geringen Durchmesser von etwa 4 mm.

2.1.15 *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68

Tabelle 2-22: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1120	1092	+	1	1	1	1
3-Methyl-1-butanol	1205	1215	+	1	1	3	2
1-Hexanol	1351	1331	+	1	1	8	10
Essigsäure	1443	1410	+	Sp.	Sp.	1	1
<i>Benzaldehyd</i>	1484	1492	+	–	–	1,5	1
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1612	1618	+	Sp.	Sp.	1	1
γ -Butyrolacton	1622	1632		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Phenylacetaldehyd</i>	1629	1618	+	–	–	1	1
<i>Phenylmethanol</i>	1852	1851	+	–	–	1	7
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1888	1883	+	1	1	20	20
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	2019	2020	+	–	–	2	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Durch den Zusatz von L-Phenylalanin kam es zur Bildung phenolischer Metabolite in geringen Konzentrationen. 2-Phenyl-1-ethanol wurde auch in Kulturen ohne Zusatz detektiert ($\sim 0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Nach Zusatz erhöhte sich die Konzentration auf etwa 2 mg L^{-1} .
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Die Konzentration von Phenylmethanol war bei UV-A-Belichtung um den Faktor 7 auf ca. 2 mg L^{-1} erhöht.

Tabelle 2-23: Sensorische Beurteilung von *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	frisch, blumig	frisch, blumig	frisch, blumig	frisch, blumig
7	schwach frisch	schwach frisch	schwach frisch	frisch
9	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig
11	leicht pilzig	leicht pilzig	pilzig, frisch	pilzig, frisch
13	schwach frisch	muffig	schwach frisch	schwach frisch
15	–	muffig	kampherähnlich	kampherähnlich
17	leicht muffig	stark muffig	frisch, zitrus	frisch, zitrus
20	schwach frisch	schwach frisch	schwach frisch	schwach frisch
22	muffig	muffig	muffig	muffig
24	–	muffig	schwach frisch	verbrannt
27	muffig	muffig	süßlich	süßlich
29	muffig, pilzig	muffig	leicht blumig	leicht blumig
31	muffig	muffig	schwach frisch	schwach frisch

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: Kampher

Im Gegensatz zu Stamm 553.80 (2.1.14) waren Biomassezuwachs und Wachstumsgeschwindigkeit von *H. odoratus*, CBS 764.68 gering. Erst nach mehr als 30 Tagen war die Glucose restlos verbraucht. Wurde den Kulturen L-Phenylalanin zugesetzt, stellte sich ein pH-Wert von 4,5 ein. In den un-supplementierten Kulturen lag er etwa eine Einheit darüber. In allen Ansätzen kam es nach dem 27. Kulturtag zu einem sprunghaften pH-Anstieg. Die kleinen Pellets sowie das Medium blieben blaßgelb.

2.1.16 *Ischnoderma benzoinum*, CBS 211.29

Tabelle 2-24: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Ischnoderma benzoinum*, CBS 211.29

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
3-Methyl-1-butanol	1220	1215	+	2	1	1	2
Octanal	1267	1278	+	–	–	1	3
1-Hexanol	1362	1359	+	–	1	2	2
1-Heptanol	1158	1462	+	1	1	1,5	1
<i>Benzaldehyd</i>	1492	1492	+++	1,5	1	2	2
1-Octanol	1524	1535	++	1	1	2	1
<i>Benzoessäuremethylester</i>	1590	1601	+	–	1	2	3
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1622	1618	+	–	1	2	2
<i>Phenylmethanol</i>	1862	1852	+	1	1	3	3
p-Anisaldehyd	1991	1982	++++	1	1	1	1
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	2031	2020	+++	1	1	3	3
<i>p-Anisalkohol</i>	2219	2210	+	–	1	2	2
<i>2-Hydroxy-1,2-diphenylethanon</i>	2293		++	–	–	1	1
<i>Benzoessäure</i>	2413	2409	+	1	–	–	1
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2415	2410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Spektrum wie Phenylmethanol</i>	2461		+	1	4	4	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Auch ohne den Zusatz von L-Phenylalanin synthetisierte *I. benzoinum* eine Reihe phenolischer Substanzen, darunter Benzaldehyd (ca. 8 mg L⁻¹), p-Anisaldehyd (>10 mg L⁻¹) und 3-Phenyl-1-propanol (ca. 6 mg L⁻¹). Mit Ausnahme von p-Anisaldehyd wurden die Konzentrationen der phenolischen Substanzen etwa um den Faktor 2-3 erhöht, wenn L-Phenylalanin zugesetzt wurde.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: UV-A-Belichtung hatte keinen Einfluß auf die Bildung flüchtiger Metabolite.

Tabelle 2-25: Sensorische Beurteilung von *Ischnoderma benzoinum*, CBS 211.29

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	–	–	–	–
7	Bittermandel	–	Bittermandel	Bittermandel
10	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel
12	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel
15	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel
18	leicht pilzig	–	Bittermandel	Bittermandel
20	–	–	–	–
beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: Bittermandel				

I. benzoinum zeichnete sich durch einen hohen Biomassezuwachs aus. Die amorphen Pellets bildeten lange Ausläufer aus. Während der Fruchtkörper als kastanienbraun beschrieben wird, blieben Pellets und Medium der Submerskulturen blaßgelblich. Glucose wurde in belichteten Kulturen bereits am 12. Kulturtag nicht mehr nachgewiesen. In den dunkel geführten Kulturen hingegen war sie erst am 17. Kulturtag verbraucht. Der pH-Wert stabilisierte sich in allen Kulturen innerhalb von 7 Kulturtagen bei etwa 4,2. Nach Verbrauch der Glucose kam es zu einem raschen Anstieg bis auf pH 6,0 in Kulturen mit L-Phenylalaninzusatz und pH 7,0 ohne Zusatz.

2.1.17 *Lactarius deliciosus*, CBS 581.63

Tabelle 2-26: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Lactarius deliciosus*, CBS 581.63

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
Essigsäure	1434	1410	+	1	1	1	1
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1594	1618	+	–	–	1	1
Phenylmethanol	1863	1851		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
2-Phenyl-1-ethanol	1884	1883	+++	Sp.	Sp.	1	2,5
3-Phenyl-1-propanol	2004	2020		Sp.	–	–	–
Nerolidol	2012	2030		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Octansäure	2030	2056	+	Sp.	3	1	2
Nonansäure	2133	2163	+	1	1,5	1	1
Decansäure	2239	2244	+	1	1	1	1
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2451	2410	+	1	1,5	1,5	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Einzig 2-Phenyl-1-ethanol wurde in den supplementierten Kulturen in größeren Konzentrationen (bis zu 15 mg L⁻¹ in der belichteten Kultur) detektiert. Aufgrund der sehr langsamen Wachstumsgeschwindigkeit wurde das Phenylalanin erst am 6. Kulturtag zugesetzt
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Nach UV-A-Belichtung und L-Phenylalaninzusatz wurde eine erhöhte Konzentration von 2-Phenyl-1-ethanol detektiert.

Tabelle 2-27: Sensorische Beurteilung von *Lactarius deliciosus*, CBS 581.63

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
9	–	–	–	süß-säuerlich
12	–	–	süß, blumig	süß-säuerlich
15	–	–	süßlich	süßlich
19	–	–	pilzig	süß, pilzig
22	–	–	leicht pilzig	leicht pilzig
26	–	–	süß-fruchtig	süß-fruchtig
29	–	–	süß-säuerlich	süß-säuerlich
33	–	–	säuerlich	süß-säuerlich
36	leicht pilzig	leicht pilzig	süßlich	süß-säuerlich
40	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht obstig	leicht obstig
43	–	–	süßlich	süßlich
46	–	–	–	–

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: obstartig, säuerlich

L. deliciosus wies einen sehr geringen Biomassezuwachs auf. Bei Abbruch der Probenahme am 46. Kulturtag war lediglich die Hälfte der Glucose im Medium verbraucht. Damit gehörte dieser Pilz zu den am langsamsten wachsenden Pilzen dieser Versuchsreihe. Der pH-Wert lag konstant bei 5,4. Entsprechend der als orangerot beschriebenen Farbe des Fruchtkörpers verfärbten sich Kulturmedien und Pellets fuchsig-braun.

2.1.18 *Lactarius rufus*, CBS 181.57

Unter allen Bedingungen bildeten die Submerskulturen von *L. rufus* ein kaum wahrnehmbares Aroma aus, das einen meist mehligem oder holzigen Geruchseindruck hinterließ. Die gaschromatographische Analytik ergab lediglich Hinweise auf Spurenkonzentrationen von flüchtigen Metaboliten, so daß von einer genaueren massenspektrometrischen Untersuchung Abstand genommen wurde.

Der Pilz wuchs sehr schnell, so daß innerhalb von 9 Tagen keine Glucose mehr im Medium festgestellt wurde. Das lockere Mycel bildete kleine, amorphe Pellets. Während die Pellets blaßgelb blieben, färbte sich das Medium zitronengelb. Der Fruchtkörper von *L. rufus* wird in der Literatur als rotbraun beschrieben.

2.1.19 *Lentinus lepideus*, CBS 450.79

Tabelle 2-28: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1090	1092	+	1	1	1	1
Σ 2- und 3-Methyl-1-butanol	1205	1215	+	16	7	1	2
3-Octanon	1240	1242	+	1	1	1	1
Essigsäure	1445	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
1-Octen-3-ol	1447	1445	+	1	3	4	1
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1603	1618	+	1	1	1	1
<i>Phenylacetaldehyd</i>	1614	1618	+	–	–	1	1
Phenylelessigsäuremethylester	1732	1726	++	1	1	1,5	1
<i>Phenylpropansäuremethylester</i>	1812	1833	++	1,5	1	7	5
<i>Phenylmethanol</i>	1850	1851	+	2	Sp.	4	2
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1883	1883	++	–	1	1	3
<i>cis-Zimtsäuremethylester</i>	1932	1930	+	1,5	30	1	50
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	1982	2020	+	2	1	2	1
<i>trans-Zimtsäuremethylester</i>	2019	2050	+	1	40	50	50
<i>p-Anissäuremethylester</i>	2060	2080	++++	1	1	2	2
<i>trans-Zimtsäureethylester</i>	2121	2081	+	1	Sp.	Sp.	5,5
<i>p-Anissäureethylester</i>	2124			Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Dihydrocoumarin	2255	2286	+	1	1	1	1
<i>trans-Zimtalkohol</i>	2240	2252	+	1	1	2	2
<i>cis-4-Methoxyzimtsäuremethylester</i>	2390	2420	+	1	70	2	13
<i>trans-4-Methoxyzimtsäuremethylester</i>	2535	2567	++	1	10	2	1
Isovanillinsäuremethylester	2717	2717	+	2	–	1	–

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Bereits ohne Zusatz von L-Phenylalanin wurden von *L. lepideus* zahlreiche phenolische Metabolite synthetisiert, darunter viele

Zimtsäurederivate. Eine weitere Konzentrationserhöhung durch den Zusatz von L-Phenylalanin wurde nur in wenigen Fällen beobachtet.

- Belichtungsabhängige Produktbildung: Es war ein deutlicher Einfluß der Belichtung auf die Konzentrationsverhältnisse zu erkennen. Besonders ausgeprägt war der Effekt bei den Zimtsäurederivaten cis- und trans-Zimtsäuremethylester (bis zu Faktor 50) sowie cis- und trans-4-Methoxyzimtsäuremethylester (bis zu Faktor 70 in den un-supplementierten Kulturen).

Tabelle 2-29: Sensorische Beurteilung von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	käsigt, süßlich	käsigt, süßlich	käsigt, süßlich	käsigt, süßlich
7	zimtähnlich	zimtähnlich	Zimt, verbrannt	Zimt, verbrannt
9	schwach Zimt	schwach Zimt	Zimt, verbrannt	Zimt, verbrannt
11	Zimt, süßlich	Zimt, süßlich	süß	süß, verbrannt
14	Zimt, würzig	Zimt, würzig	süß, balsamisch	süß, balsamisch
16	süßlich, würzig	süßlich, würzig	süß, balsamisch	süß, balsamisch
18	süß, balsamisch	süß, balsamisch	süß, balsamisch	süß, balsamisch
21	süßlich	süßlich	süßlich, käsigt	süßlich, käsigt

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: Anis, fruchtig, Perubalsam

Mit einer Kultivierungsdauer von etwa 20 Tagen bis zum Verbrauch der Glucose wies *L. lepideus* eine moderate Wachstumsgeschwindigkeit auf. Das lockere Mycel bildete Pellets mit langen Ausläufern. Pellets und Medium verfärbten sich von gelb über fuchsigbraun bis hin zu dunkelbraun, während der Fruchtkörper nach Literaturangaben gelblichweiß ist. *L. lepideus* säuerte das Medium langsam bis zum 9. Kulturtag auf pH 3,8 an. Nach dem 18. Kulturtag kam es zu einem raschen pH-Anstieg.

2.1.20 *Lepista irina*, CBS 366.47

Tabelle 2-30: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Lepista irina*, CBS 366.47

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
Essigsäure	1436	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Benzaldehyd	1479	1492	+	–	–	1	1
5-Methyl-2-furaldehyd	1548	1563		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Benzooesäuremethylester	1573	1601	+	–	–	1	1
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1583	1618	+	–	1	1	1
Phenylacetaldehyd	1585	1618		–	–	Sp.	Sp.
3-Phenyl-1-propanol	1991	2020		–	–	Sp.	Sp.
trans-Zimtsäuremethylester	2014	2050	+	2	3	5	5
Octansäure	2023	2065	+	1	1	2	1,5
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2490	2410	+	1	2,5	2	2

Die Konzentration von flüchtigen Metaboliten in Kulturfiltraten von *L. irina* war in allen Ansätzen sehr gering (max. 0,5 mg L⁻¹).

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Nach Applikation konnten geringe Mengen an L-Phenylalaninderivaten detektiert werden. Die Konzentration des trans-Zimtsäuremethylesters, der bereits ohne Zusatz gebildet wurde (ca. 0,2 mg L⁻¹), wurde etwa verdoppelt.
- belichtungsabhängige Produktbildung: Belichtungsbedingte Konzentrationserhöhungen wurden nicht festgestellt.

Tabelle 2-31: Sensorische Beurteilung von *Lepista irina*, CBS 366.47

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
3	–	–	–	–
5	–	–	–	–
7	leicht parfümiert	leicht parfümiert	leicht parfümiert	leicht parfümiert
9	leicht parfümiert	leicht parfümiert	leicht parfümiert	leicht parfümiert
11	leicht parfümiert	leicht parfümiert	leicht parfümiert	leicht parfümiert
13	leicht frisch	leicht frisch	leicht verbrannt	leicht verbrannt
15	leicht frisch	leicht frisch	leicht verbrannt	leicht verbrannt

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: aromatisch, Veilchenwurzel

Das schnellwachsende Mycel bildete große, lockere Pellets mit sehr langen Ausläufern. Es wurde eine starke Viskositätszunahme festgestellt, die zum Abbruch der Kultivierung am 15. Kulturtag führte. Der Glucoseverbrauch in den Ansätzen ohne L-Phenylalaninzusatz war geringfügig höher als in den Ansätzen mit Zusatz. Bei Abbruch der Kultivierung wurde noch Restglucose von 5 bzw. 10 g L⁻¹ detektiert. Der pH-Wert lag konstant bei 5,0. Bei keinem der Ansätze stellte sich die für den Fruchtkörper beschriebene fleischrötliche Färbung ein. Alle Kulturen blieben blaßgelblich.

2.1.21 *Lepista nuda*, CBS 300.58, DSM 8620

L. nuda, DSM 8620, ließ eine sehr geringe Wachstumsrate erkennen. Weder wiederholte Homogenisierung noch Umsetzen in frisches Kulturmedium führten zu einer Wachstumssteigerung. Auch der zweite eingesetzte Stamm dieser Art, CBS 300.58, zeigte keine höhere Wachstumsgeschwindigkeit. Der für den bräunlich-violetten Fruchtkörper beschriebene parfümartige Geruchseindruck stellte sich zu keinem Zeitpunkt ein. Infolge der zu geringen Wachstumsgeschwindigkeit und des fehlenden Aromas wurden keine Versuche mit dieser Species durchgeführt.

2.1.22 *Marasmius scorodonius*, CBS 137.86

Tabelle 2-32: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Marasmius scorodonius*, CBS 137.86

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				DO	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1075	1092		–	Sp.	–	–
3-Methyl-1-butanol	1198	1215		Sp.	Sp.	–	–
Essigsäure	1462	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1597	1618	+	1	1	1	1
Dihydrocarveol	1709	1713	+	1	1,5	2	1,5
trans-Carveol	1823	1820	++	1	2,5	2	2
Phenylmethanol	1852	1851	++	1	1	2	1
4-Phenyl-2-butanol	1980	1956	+	3	5	1	1
trans-Zimtalkohol	2292	2252	++	1	1,5	1,5	1
Undecansäure	2362	2366	++	1	1,5	2	1
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2472	2410	+	1,5	1,5	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Der Zusatz von L-Phenylalanin hatte keinen Einfluß auf die Bildung phenolischer Komponenten.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Ein Einfluß der Belichtungsverhältnisse konnte aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden.
- Sensorische Beurteilung: Während der gesamten Kultivierungsperiode entwickelten alle Ansätze ein nur sehr schwaches Aroma, das an den Geruch von Konserven-champignons erinnerte. Das Aroma des Fruchtkörpers wird als knoblauchartig beschrieben.

In den Kulturen von *M. scorodonius* wurde ein sehr langsamer Biomassezuwachs beobachtet. Die Kultivierung wurde am 33. Kulturtag abgebrochen. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Glucosekonzentration noch 20 g L⁻¹. *M. scorodonius* säuerte das Kulturmedium sehr langsam bis auf einen pH-Wert von 4,0 (mit Zusatz von L-Phenylalanin) bzw. 4,5 (ohne Zusatz) an. Die kugelförmigen Pellets hatten eine glatte Oberfläche. Mycel sowie

Kulturmedium färbten sich gelb. Der Fruchtkörper von *M. scorodonius* ist Literaturangaben zufolge fleischrötlich bis fuchsig.

2.1.23 *Marasmius scorodonius*, CBS 850.87

Tabelle 2-33: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Marasmius scorodonius*, CBS 850.87

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1101	1092		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
3-Methyl-1-butanol	1220	1215		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Essigsäure	1490	1410	+	1	1	–	–
<i>Benzaldehyd</i>	1495	1492	+	–	–	1	1
<i>Phenylacetaldehyd</i>	1613	1618	+	–	–	1	1
Dihydrocarveol	1709	1713	+	1,5	1,5	1	1
trans-Carveol	1820	1820	+	1,5	1	1	1
4-Phenyl-2-butanon	1853	1849	+	1,5	1	1	1
<i>Phenylmethanol</i>	1859	1852	++	1	1	1,5	3
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1888	1883	++	–	–	Sp.	1
4-Phenyl-2-butanol	1978	1958	++	6,5	1,5	5	1
Spektrum wie Phenylmethanol	2058		+++	1,5	1	1,5	1,5
trans-Zimtalkohol	2292	2252	+	1,5	1,5	1	2
Undecansäure	2365	2366	++	1,5	1	1,5	1,5
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2470	2410	+	1,5	1,5	1	1
<i>Spektrum wie Phenylmethanol</i>	2542		+	–	–	1	1,5

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Der Zusatz von L-Phenylalanin führte zu einem verstärkten Auftreten phenolischer Komponenten. Auffällig waren dabei mehrere nicht identifizierte Verbindungen, die ein Massenspektrum identisch mit dem von Phenylmethanol aufwiesen.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Im Falle von 4-Phenyl-2-butanol war die Konzentration in unbelichteten Kulturen um den Faktor 5 höher als in belichteten Kulturen (4 mg L⁻¹).
- Sensorische Beurteilung: Die 4 Ansätze entwickelten ein nur sehr schwaches Aroma, das an den Geruch von Konservenchampignons erinnerte. Das Aroma des Fruchtkörpers wird als knoblauchartig beschrieben.

Wie bereits bei Stamm CBS 137.86 (2.1.22) wurde die Kultivierung am 33. Kulturtag wegen der geringen Wachstumsgeschwindigkeit abgebrochen. Während der pH-Wert bei L-Phenylalaninzusatz langsam bis auf 6,0 bei Beendigung der Kultivierung anstieg, wurde in Kulturen ohne Zusatz bereits am 20. Kulturtag ein Wert von 6,0 erreicht, bevor im weiteren wieder eine langsame Abnahme zu verzeichnen war.

2.1.24 *Meripilus giganteus*, CBS 561.86

Tabelle 2-34: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Meripilus giganteus*, CBS 561.86

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1099	1092		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
2-Octenal	1426	1423	+	–	–	–	1
2-Octanol	1437	1427	+	–	–	+	–
Decanal	1490	1494	+	2	1	2	2
Benzaldehyd	1494	1492	+	1	1	2	1
1-Octanol	1519	1535	+	Sp.	–	1	2
γ-Butyrolacton	1640	1632		Sp.	Sp.	–	–
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1610	1618	+	1	1	1	–
Phenylacetaldehyd	1620	1618		Sp.	Sp.	–	Sp.
1-Decanol	1726	1723	+	1	1	1	–
<i>Phenylmethanol</i>	1855	1851	+	–	–	1	1
2-Phenyl-1-ethanol	1890	1883	+	–	–	1	15
1-Dodecanol	1937	1925	+	–	–	1	1
p-Anisaldehyd	1980	1982	+	Sp.	1	20	–
3-Phenyl-1-propanol	2033	2020		–	Sp.	–	–
Decansäure	2245	2244	+	1	–	1	2
Dodecansäure	2460	2480	+	–	–	1	1
Phenylelessigsäure	2584	2569	+	–	1	Sp.	5

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Die Metabolisierung des zugesetzten L-Phenylalanins wurde durch die Bildung von Phenylmethanol, 2-Phenyl-1-ethanol, p-Anisaldehyd sowie Phenylelessigsäure deutlich.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: In den supplementierten Ansätzen wurden Effekte durch die UV-A-Belichtung sichtbar. Während in der belichteten Kultur die Konzentrationen von 2-Phenyl-1-ethanol und Phenylelessigsäure anstiegen (Faktor 15 bzw. Faktor 5), wurde kein p-Anisaldehyd detektiert. Dessen Konzentration betrug in der unbelichteten Kultur etwa 4 mg L⁻¹.

Tabelle 2-35: Sensorische Beurteilung von *Meripilus giganteus*, CBS 561.86

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	–	–	süßlich	süß
7	erdig	erdig	süß	obstig
10	leicht süß	leicht süß	süß, säuerlich	obstig, sauer
12	süßlich, erdig	süß, erdig	süß, säuerlich	obstig, sauer
14	süßlich, erdig	modrig	süß, obstig	obstig
17	erdig	pilzig	süßlich	–
19	pilzig	pilzig	süßlich, erdig	–
21	–	–	–	–
beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: obstig, sauer				

Bei UV-A-Belichtung und L-Phenylalaninzusatz war ein hoher Biomassezuwachs zu erkennen. Die Glucose war am 12. Kulturtag verbraucht. Nach dem 12. Kulturtag stieg der pH-Wert innerhalb von 5 Tagen von 4,5 auf 8,0. Die großen Pellets bildeten lange Ausläufer und prägten eine rotbraune Farbe aus. Das Medium färbte sich ebenfalls rotbraun und wurde hochviskos.

Unter den übrigen Bedingungen war die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich geringer, Glucose wurde bis zum 20. Kulturtag detektiert. Der pH-Wert begann von diesem Tag an zu steigen. Die Pellets wiesen einen nur leicht bräunlichen Farbton auf. Auch das Medium blieb blaßgelb und niederviskos. Der Fruchtkörper von *M. giganteus* wird als braunrot beschrieben.

2.1.25 *Paxillus involutus*, CBS 591.89

Tabelle 2-36: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Paxillus involutus*, CBS 591.89

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
Essigsäure	1435	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
1-Octen-3-ol	1445	1420	++	1,	1,5	3	1
Benzaldehyd	1487	1492	+	Sp.	2	1	10
5-Methyl-2-furaldehyd	1549	1549		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
1-Octanol	1559	1570	+	Sp.	Sp.	2	1
γ-Butyrolacton	1594	1632		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1595	1589		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Phenylacetaldehyd	1601	1618	+	–	–	1	1
Phenylmethanol	1847	1851	+++	–	–	1	2
2-Phenyl-1-ethanol	1880	1883	++	–	–	2	1
Phenylpropylacetat	1905	1930		–	–	Sp.	Sp.
trans-Zimtaldehyd	1993	2001	+	–	–	2	1
3-Phenyl-1-propanol	2016	2020	++	–	–	10	1
cis-Zimtalkohol	2137	2152	++	–	–	–	1
trans-Zimtalkohol	2247	2252	++++	–	–	3	1
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2462	2410	+	1	1	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Zugewetztes L-Phenylalanin wurde in hohem Maße zu flüchtigen phenolischen Metaboliten umgesetzt. Die Konzentrationen von trans-Zimtalkohol und 3-Phenyl-1-propanol erreichten Werte von >10 mg L⁻¹.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Bei sechs dieser aromatischen Substanzen konnten deutliche Konzentrationsunterschiede zwischen belichteten und unbelichteten Kulturen festgestellt werden. Im Falle von Benzaldehyd und Phenylmethanol war der Effekt durch die Lichteinwirkung positiv.

Tabelle 2-37: Sensorische Beurteilung von *Paxillus involutus*, CBS 591.89

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
6	würzig, pilzig	würzig, pilzig	würzig, pilzig	würzig, pilzig
8	würzig, pilzig	würzig, pilzig	würzig, pilzig	würzig, pilzig
10	würzig	würzig	würzig	würzig
12	würzig	würzig	würzig	würzig
14	schwach würzig	schwach würzig	schwach würzig	schwach würzig
18	–	–	–	–
20	schwach würzig	schwach würzig	schwach würzig	schwach würzig
22	würzig	würzig	obstig, würzig	obstig, würzig
25	Pflaume	schwach würzig	süß, Pflaume	süß
27	–	–	leicht obstig	leicht obstig
30	pilzig, würzig	pilzig würzig	obstig	obstig
32	–	–	leicht obstig	leicht obstig

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: säuerlich

In allen Ansätzen zeigte *P. involutus* über den gesamten Kultivierungszeitraum von 32 Tagen ein heterogenes Erscheinungsbild. Gesetzmäßigkeiten waren nicht erkennbar. Anfangs wuchs der Pilz in lockeren Pellets mit langen Ausläufern, die schnell zerfielen. Nach etwa 10 Kulturtagen wurde eine Zusammenballung von Pellets beobachtet. Die entstandenen amorphen Mycelklumpen ließen kaum Wachstum erkennen. Ab dem 22. Kulturtag bildeten sich erneut lange Ausläufer, die ein verstärktes Wachstum anzeigten. Mycel sowie Medium färbten sich innerhalb der ersten 7 Kulturtage tief dunkelbraun. Der Fruchtkörper wird in der Literatur als braun-gelblich beschrieben. Unter Lichtausschluß konnte eine langsame, stetige Abnahme der Glucosekonzentration beobachtet werden. Bei L-Phenylalaninzusatz war die Konzentrationsabnahme verzögert. Der pH-Wert lag über den gesamten Kulturverlauf bei etwa 5,0.

2.1.26 *Polyporus tuberaster*, CBS 786.84

Tabelle 2-38: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Polyporus tuberaster*, CBS 786.84

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
3-Methyl-1-butanol	1201	1215	+	10	1	10	3
4-Methyl-1-pentanol	1298	1298	+	1	1	1	1
Essigsäure	1428	1410	+	1	1	1	1
<i>Benzaldehyd</i>	1476	1492	++	2	1	20	15
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1605	1618	+	1	1	1	1
Phenylecetaldehyd	1615	1618	+	1	–	1	1
Acetophenon	1620	1618		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Spektrum wie Benzaldehyd	1663		+	50	1	5	–
Spektrum wie Benzaldehyd	1721		+	35	Sp.	1	Sp.
<i>Phenylmethanol</i>	1835	1851	++++	Sp.	Sp.	1,5	1
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1863	1883	+	Sp.	Sp.	1	2,5
Spektrum wie Phenylmethanol	1960		+	5	Sp.	2	1
Spektrum wie Phenylmethanol	1992		+	60	–	2	1
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	2001	2020	+	Sp.	Sp.	2	1
Octansäure	2030	2056	+	1	1	1	1
<i>α-Isopropylphenylmethanol</i>	2036		+	1	Sp.	5	3
Nonansäure	2153	2163	+	Sp.	Sp.	1	1
Decansäure	2225	2244	+	1	1	1	1
Spektrum wie Phenylmethanol	2358		+	Sp.	Sp.	2,5	1
<i>Spektrum wie Phenylmethanol</i>	2393		+	2	1	20	12
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2443	2410	+	1	1	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Auch ohne L-Phenylalaninzusatz wurden in den Kulturfiltraten von *P. tuberaster* zahlreiche phenolische Verbindungen detektiert. Der Zusatz der Aminosäure führte insbesondere zu einer Konzentrationserhöhung von Phenylmethanol (>20 mg L⁻¹). Auffällig waren mehrere unidentifizierte Verbindungen, die in der Massenspektrometrie das gleiche Fragmentierungsmuster aufwiesen wie Benzaldehyd bzw. Phenylmethanol.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Belichtung mit UV-A-Licht hatte eine verminderte Bildung von Phenylmethanol sowie zwei der unidentifizierten Verbindungen zur Folge.

Tabelle 2-39: Sensorische Beurteilung von *Polyporus tuberaster*, CBS 786.84

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
5	–	–	–	–
7	schwach Bittermandel	schwach Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel
9	schwach Bittermandel	schwach Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel
12	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel	Bittermandel
14	–	–	Bittermandel	Bittermandel
17	leicht pilzig	leicht pilzig	Bittermandel	Bittermandel
19	schwach blumig	schwach blumig	Bittermandel	Bittermandel
21	leicht pilzig	leicht pilzig	Bittermandel	Bittermandel
24	–	–	Bittermandel	Bittermandel

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: fruchtig, Bittermandel

P. tuberaster wuchs mäßig schnell und verbrauchte innerhalb von 21 Tagen die Glucose. Der pH-Wert lag bei 4,5. Das Mycel bildete sehr lockere Pellets mit langen Ausläufern. Die Farbe von Medium und Mycel blieb hellgelblich, während für den Fruchtkörper eine hell- bis ockerbraune Färbung beschrieben wird. Im Medium kam es innerhalb der ersten 5 Kulturtage zu einer starken Viskositätssteigerung, die bis zum Ende der Kultivierung die Probenahme erschwerte.

2.1.27 *Pycnoporus cinnabarinus*, CBS 353.63

Tabelle 2-40: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Pycnoporus cinnabarinus*, CBS 353.63

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
3-Methyl-1-butanol	1201	1215	+	1	1,5	1,5	1,5
Benzaldehyd	1484	1492	+	1	1	2	2
Methyl-2-furoat	1561	1567	+	5	2	3	1
Benzoessäuremethylester	1590	1600	+++	1	1	3	3
Benzoessäureethylester	1640	1649	+	–	–	1	–
trans-Zimtsäuremethylester	2051	2050	+	–	–	1	1,5
Octansäure	2045	2056	+	1	–	–	–
Anthranilsäuremethylester	2192	2209	+	8	9	3	1
Vanillinsäuremethylester	2642	2601	+	1	1	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Die Applikation von L-Phenylalanin führte zu einer verstärkten Bildung von Benzaldehyd, Benzoessäuremethyl- und -ethylester sowie trans-Zimtsäuremethylester. Mit Ausnahme des Benzoessäuremethylesters (ca. 15 mg L⁻¹) betragen die Konzentrationen weniger als 1 mg L⁻¹.

- Belichtungsabhängige Produktbildung: Ein Effekt der Belichtung auf die Konzentrationen einzelner Metabolite im Medium wurde nicht ersichtlich.
 - sensorische Beurteilung: Von allen Kulturen ging nach kurzer Zeit ein sehr angenehmer fruchtig-süßer Geruch aus, der sich im Laufe der Kultivierung weiter intensivierte.
- Der Biomassezuwachs von *P. cinnabarinus* war in allen Ansätzen moderat. Nach stetiger Konzentrationsabnahme wurde nach 15 Kulturtagen keine Glucose mehr im Medium nachgewiesen. *P. cinnabarinus* säuerte das Medium bis zum 15. Kulturtag auf pH 3,9 an. Die großen, lockeren Pellets blieben beige, während das Medium mit zunehmender Kultivierungsdauer eine fuchsigere Farbe annahm.

2.1.28 *Rhodotus palmatus*, CBS 275.33

In den Kulturfiltraten von *R. palmatus* wurde eine geringe Anzahl flüchtiger Komponenten in sehr geringen Konzentrationen detektiert. Neben verschiedenen organischen Säuren traten cis-Dihydrocarvon sowie Dihydrocarveol in Spuren auf. Metabolite aus dem Umsatz von L-Phenylalanin wurden nicht erfaßt. Es gab keine Anzeichen für einen Einfluß der Belichtungsverhältnisse auf die Bildung flüchtiger Verbindungen. Der Geruchseindruck war unspezifisch. Das für den Fruchtkörper beschriebene starke Mirabellenaroma wurde in den Submerskulturen zu keinem Zeitpunkt festgestellt.

Die Kulturen von *R. palmatus* wiesen eine sehr geringe Wachstumsrate auf. Es konnte lediglich eine geringe Zunahme der Biomasse beobachtet werden. Nach 45 Tagen wurde die Kultivierung abgebrochen. In diesem Zeitraum wurde in den unbelichteten Kulturen kein Glucoseverbrauch festgestellt, während die Glucosekonzentration in den belichteten Kulturen ab dem 25. Kulturtag langsam meßbar abnahm. In allen Ansätzen stieg der pH-Wert langsam bis auf 8,0 am 10. Tag an.

Der Fruchtkörper von *R. palmatus* ist der Literatur zufolge orangerötlich. Die sehr kleinen Pellets der Submerskulturen färbten sich langsam blaß bräunlich.

2.1.29 *Sparassis crispa*, CBS 408.71

Tabelle 2-41: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Sparassis crispa*, CBS 408.71

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
3-Methyl-1-butanol	1215	1215	+	1	1	Sp.	6
3-Octanon	1242	1242	+	3	1	1,5	1
3-Octanol	1392	1398	+	4	1	1	1
Essigsäure	1423	1410	+	1	1	1	1
Benzaldehyd	1485	1492	+	–	–	1	4
5-Methyl-2-furaldehyd	1523	1549		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Acetophenon	1609	1611		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>1-Phenyl-1-propanon</i>	1683		++	–	–	1	1
3-Phenylpropanal	1742		++	–	–	1	3
<i>1-Phenylethanol</i>	1788	1762		–	–	Sp.	Sp.
Phenylmethanol	1862	1851	++	1	1	10	15
trans-Zimtaldehyd	2007	2001	++	–	–	1	1,5
3-Phenyl-1-propanol	2041	2020	++++	–	–	1	1,5
Octansäure	2062	2056	+	1	1	1	2
<i>cis-Zimtalkohol</i>	2150	2152	+	–	–	–	1
<i>trans-Zimtalkohol</i>	2283	2252	++++	–	–	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Es konnte eine deutliche Precursorwirkung beobachtet werden. Neben den aufgeführten Metaboliten wurden weitere nicht identifizierte L-Phenylalaninderivate in Spurenkonzentrationen detektiert
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Unter UV-A-Einfluß wurden erhöhte Metabolitenkonzentrationen festgestellt (maximal Faktor 4 bei Benzaldehyd).

Tabelle 2-42: Sensorische Beurteilung von *Sparassis crispa*, CBS 408.71

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
7	schwach süß	schwach süß	leicht verbrannt	leicht verbrannt
9	–	–	verbrannt	verbrannt
11	süßlich	süßlich	verbrannt, Bittermandel	verbrannt, Bittermandel
14	süßlich	süßlich	verbrannt	verbrannt
16	leicht blumig	leicht blumig	verbrannt, süß	verbrannt, süß
18	süßlich	süßlich	stark verbrannt	stark verbrannt
21	süßlich	süßlich	verbrannt	verbrannt
24	süßlich	süßlich	verbrannt	verbrannt
26	–	–	süß	süß

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: teeähnlich

Der Biomassezuwachs des in lockeren Pellets wachsenden Pilzes war während der 26tägigen Kultivierung moderat. Bis zum 14. Kulturtag war eine rasche Abnahme der Glucosekonzentration zu verzeichnen. Insbesondere bei Kulturen ohne L-Phenylalaninzusatz verringerte sich anschließend der Glucoseverbrauch. Der pH-Wert sank bis zum 10. Kul-

turtag auf 4,0 ab und blieb anschließend konstant. Die Farbe war analog zur Beschreibung des Fruchtkörpers weiß-bräunlich.

2.1.30 *Suillus granulatus*, CBS 114.42

Tabelle 2-43: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Suillus granulatus*, CBS 114.42

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1099	1092		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
3-Methyl-1-butanol	1218	1215		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Essigsäure	1423	1410		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
1-Octen-3-ol	1444	1445		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Benzaldehyd</i>	1492	1492	+	–	–	2	1
<i>Benzoessäuremethylester</i>	1592	1601	++	–	–	1	1
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1610	1618		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
<i>Phenylacetaldehyd</i>	1615	1618	+	–	–	1	1
<i>Benzoessäureethylester</i>	1640	1649	+	–	–	Sp.	1
<i>3-Methylbutansäure</i>	1669	1678	+	Sp.	Sp.	1	1
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1885	1883	++	–	–	1	1
Octansäure	2048	2056	+	Sp.	Sp.	1	1
Nonansäure	2153	2163		Sp.	Sp.	Sp.	Sp.
Decansäure	2262	2244	+	Sp.	Sp.	1	1
<i>Benzoessäure</i>	2389	2409	+	–	–	2	1
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyd	2476	2410	+	Sp.	Sp.	1	1
<i>Phenyllessigsäure</i>	2523	2569	+	–	–	2	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Nach Zusatz von L-Phenylalanin wurden entsprechende Derivate in den Kulturfiltraten detektiert. Die Konzentrationen lagen mit Ausnahme von Benzoessäuremethylester (bis 2 mg L⁻¹) und 2-Phenyl-1-ethanol (bis 3 mg L⁻¹) unter 1 mg L⁻¹.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: Die Belichtung mit UV-A-Licht hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Metabolitenkonzentrationen in den Sammelproben.

Tabelle 2-44: Sensorische Beurteilung von *Suillus granulatus*, CBS 114.42

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
7	–	–	–	–
9	nasses Holz	–	süßlich	süßlich
11	honigartig	honigartig	süßlich	süßlich
13	–	honigartig	säuerlich	–
15	süß-säuerlich	süß-säuerlich	süß-säuerlich	süß-säuerlich
17	–	–	–	–
19	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig	leicht pilzig
22	süßlich	süßlich	leicht fruchtig	leicht fruchtig
24	nasses Holz	nasses Holz	nasses Holz	nasses Holz
26	–	–	honigartig	honigartig
28	–	–	–	–
30	süßlich	süßlich	leicht stechend	leicht stechend

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: obstartig

- Die Wachstumsgeschwindigkeit war sehr gering. Die Konzentration der Glucose nahm langsam bis auf 10 g L^{-1} bei Abbruch der Kultivierung am 30. Tag ab. Der pH-Wert lag über den gesamten Kultivierungszeitraum bei ca. 4,6. Im Gegensatz zum als rötlich-gelb beschriebenen Fruchtkörper verfärbten sich Mycel und Medium der Submerskulturen schmutzigbraun. Die großen Pellets hatten eine glatte Oberfläche

2.1.31 *Trametes hirsuta*, CBS 282.74

Tabelle 2-45: Identifizierte Metabolite im Kulturfiltrat (Sammelprobe) von *Trametes hirsuta*, CBS 282.74

Substanz	KI _{best}	KI _{Ref}	Konz	Konz.-Verhältnis			
				D0	H0	DP	HP
2-Methyl-1-propanol	1101	1092	+	1	1	1	2
3-Methyl-1-butanol	1220	1215	+	Sp.	1	1	1
1-Octen-3-ol	1457	1445	+	Sp.	Sp.	1	3
<i>Benzaldehyd</i>	1492	1492	+	Sp.	Sp.	1	1
1-Octanol	1552	1535	+	Sp.	Sp.	1	2
<i>Acetophenon</i>	1612	1611	+	–	–	1	1
2-Octen-1-ol	1614	1612	+	–	1	–	–
2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol	1622	1618	+	1	1	1	1
<i>Phenylmethanol</i>	1872	1851	++	1	Sp.	2,5	15
<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	1896	1883	+	1	2	2	4
<i>p-Anisaldehyd</i>	1952	1982	++	1	Sp.	3	1,5
<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	2032	2020	+	1	1	5	25
<i>p-Anisalkohol</i>	2234	2210	++	1	Sp.	3	3,5
Decansäure	2257	2244	+	1	1	2	2
<i>3-Chlor-p-anisaldehyd</i>	2307		+	Sp.	Sp.	1	1
Dodecansäure	2499	2480	+	–	–	1	1

- Precursorfunktion des L-Phenylalanins: Der Zusatz von L-Phenylalanin führte zu erhöhten Konzentrationen phenolischer Komponenten in den Kulturmedien.
- Belichtungsabhängige Produktbildung: In mit L-Phenylalanin supplementierten Kulturen wurden durch Belichtung mit UV-A-Licht die Konzentrationen von Phenylmethanol und 3-Phenyl-1-propanol um den Faktor 5 auf ca. 30 bzw. 12,5 mg L⁻¹ gesteigert.

Tabelle 2-46: Sensorische Beurteilung von *Trametes hirsuta*, CBS 282.74

Kulturtag	D0	H0	DP	HP
3	–	–	–	–
5	–	–	süßlich	süßlich
7	süß	süß	süß, blumig	süß, blumig
10	süß	süß	süß, stechend	süß, stechend
12	süß	süß	süß, blumig	süß, blumig
14	süß	schwach süß	süß, blumig	süß, blumig
17	schwach süß	pilzig	schwach süß	schwach süß
19	pilzig	pilzig	süß, pilzig	süß, pilzig

beschriebener Geruchseindruck für den Fruchtkörper: anisartig

Der Biomassezuwachs war sehr hoch. Bereits am 10. Kulturtag wurde keine Glucose mehr in den Medien detektiert. Nach diesem Tag stieg der pH-Wert von 4,0 auf konstant 7,5 ab dem 12. Kulturtag. Das lockere Mycel bildete große Pellets mit langen Ausläufern. Der Fruchtkörper von *T. hirsuta* wird als gelblich-fuchsig beschrieben. In Submerskultur konnte keine Pigmentierung beobachtet werden. Bis zum 12. Kulturtag war eine starke Zunahme der Medienviskosität zu beobachten, die sich erschwerend auf die Probenahme auswirkte.

2.1.32 Teilzusammenfassung 2.1

In Tabelle 2-47 wurden alle Fälle aufgelistet, bei denen ein Einfluß der UV-A-Belichtung – im positiven wie auch negativen Sinn – auf die Bildung flüchtiger Metabolite beobachtet wurde. Positive Effekte wurden fett hervorgehoben. Substanzen, deren Bildung durch den Zusatz von L-Phenylalanin als Precursor positiv beeinflusst wurde, wurden kursiv hervorgehoben.

Tabelle 2-47: Effekte von UV-A-Belichtung und L-Phenylalanin auf die Produktbildung, fett: positiver Belichtungseffekt, kursiv: Precursorwirkung des L-Phenylalanins, weitere Angaben: vgl. 2.1.1, S. 4

Pilz	Substanz	Konz	Konz.-Verhältnis			
			D0	H0	DP	HP
<i>A. praecox</i>	1-Octen-3-ol	+	1	4	2	9
<i>B. adusta</i>	<i>Phenylmethanol</i>	++	–	–	1	2
	3,5-Dichloranisaldehyd	++	1	1,5	1,5	4
	3,5-Dichloranisalkohol	++	–	–	1	4
<i>C. geotropa</i>	Benzaldehyd	++++	Sp.	Sp.	1	1,5
	<i>Phenylmethanol</i>	++++	–	–	2	1
	<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	++	–	–	2,5	1
<i>C. odora</i>	<i>Benzaldehyd</i>	+	1	1	15	10
	<i>Phenylmethanol</i>	++	–	–	4	1
	<i>p-Anisaldehyd</i>	+	–	–	2,5	1
	<i>p-Anisalkohol</i>	+	–	–	3	1
	<i>3-Chlor-p-Anisaldehyd</i>	+	Sp.	–	3	1
	<i>Benzoessäure</i>	+	–	–	3	1
<i>C. fusipes</i>	<i>cis-Carveol</i>	+	12	1	7	1
	<i>3-Phenyl-1-propanol</i>	+++	Sp.	1	1	2
	<i>trans-Zimtsäuremethylester</i>	+	1	2	10	3
	cis-Zimtalkohol	+	1	5	2	8
<i>C. percomis</i>	<i>Phenylmethanol</i>	++++	1	1	5	4
	<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	+++	1	1	5	4
	<i>trans-Zimtalkohol</i>	++	Sp.	1	6	3
<i>G. odoratum</i>	3-Octanon	+	1	1,5	–	–
	3-Octanol	+	1	1,5	–	–
	1-Octen-3-ol	++	1	4	1,5	3
	Benzaldehyd	++	–	–	1	2,5
	1-Octanol	+	1	2	1	2
	trans-Zimtaldehyd	+++	–	–	1	1,5
	cis-Zimtalkohol	+	–	–	1	10
<i>H. odoratus</i> CBS 553.80	<i>Phenylacetaldehyd</i>	+	–	–	4	1
	<i>2-Phenyl-1-ethanol</i>	+	–	–	4	1
<i>H. odoratus</i> CBS 764.68	Phenylmethanol	+	–	–	1	7
<i>L. deliciosus</i>	2-Phenyl-1-ethanol	+++	Sp.	Sp.	1	2,5
<i>L. lepideus</i>	Phenylmethanol	+	2	Sp.	4	1
	2-Phenyl-1-ethanol	++	–	–	1	3
	cis-Zimtsäuremethylester	+	1,5	30	1	50
	<i>Phenylpropanol</i>	+	2	1	2	1
	trans-Zimtsäuremethylester	+	1	40	50	50
	cis-p-Methoxyzimtsäuremethylester	+	1	70	2	13
	trans-p-Methoxyzimtsäuremethylester	++	1	10	2	1

Fortsetzung Tabelle 2-47

Pilz	Substanz	Konz	Konz.-Verhältnis			
			D0	H0	DP	HP
<i>M. scorodonius</i> CBS 850.87	4-Phenyl-2-butanol	+++	6,5	1,5	5	1
<i>M. giganteus</i>	2-Phenyl-1-ethanol	+	–	–	1	15
	<i>p</i> -Anisaldehyd	+	Sp.	1	20	–
	Phenyllessigsäure	+	–	1	Sp.	5
<i>P. involutus</i>	Benzaldehyd	+	Sp.	2	1	10
	Phenylmethanol	+++	–	–	1	2
	2-Phenyl-1-ethanol	++	–	–	2	1
	3-Phenyl-1-propanol	++	–	–	10	1
	<i>cis</i> -Zimtalkohol	++	–	–	–	1
	<i>trans</i> -Zimtalkohol	++++	–	–	3	1
<i>P. tuberaster</i>	Spektrum wie Benzaldehyd	+	50	1	5	–
	Spektrum wie Benzaldehyd	+	35	Sp.	1	Sp.
	Phenylmethanol	++++	Sp.	Sp.	1,5	1
<i>S. crispa</i>	Benzaldehyd	+	–	–	1	4
	3-Phenylpropanal	++	–	–	1	3
	Phenylmethanol	++	1	1	10	15
	<i>trans</i>-Zimtaldehyd	++	–	–	1	1,5
	3-Phenyl-1-propanol	++++	–	–	1	1,5
<i>T. hirsuta</i>	Phenylmethanol	++	1	Sp.	2,5	15
	3-Phenyl-1-propanol	+	1	1	5	25

- Bei 17 der 30 untersuchten Pilze wurde ein Einfluß der Belichtung mit UV-A-Licht bezüglich der Bildung flüchtiger Metabolite beobachtet. Etwa die Hälfte dieser Effekte war mit einer Konzentrationsverminderung verbunden. Die stimulierenden Effekte waren quantitativer Art. Zumeist wurde die Konzentration um den Faktor 2 bis 5 erhöht. Stärker ausgeprägte Effekte wurden nur in wenigen Fällen beobachtet: (z. B. bei *L. lepideus*, *P. involutus*, *M. giganteus*)
- Die Bildung von Substanzen ausnahmslos in belichteten Kulturen wurde nicht beobachtet. Das Vorkommen von *cis*-Isomeren der Zimtsäurederivate ist auf lichtinduzierte *trans-cis*-Isomerisierung zurückzuführen [TOWERS UND YAMAMOTO, 1985].
- Mit Ausnahme von C₈-Verbindungen bei *A. praecox* und *G. odoratum* waren die stimulierenden Effekte ausschließlich bei Metaboliten des Phenylalanin-Zimtsäurestoffwechsels zu beobachten.
- Durch fast alle untersuchten Pilze wurde zugesetztes L-Phenylalanin umgesetzt. Die Auswirkungen auf das Spektrum der flüchtigen Metabolite waren sehr unterschiedlich: *G. odoratum* synthetisierte ohne zugesetztes L-Phenylalanin lediglich Spuren phenolischer Komponenten. Nach Zusatz wurden im Medium zahlreiche dieser Substanzen in Konzentrationen von bis zu 10 mg L⁻¹ detektiert (Tabelle 2-18, S. 16). *L. lepideus* dagegen synthetisierte bereits ohne Applikation des Precursors zahlreiche phenolische

Substanzen, deren Konzentrationen durch dessen Zusatz in einigen Fällen gesteigert wurden (Tabelle 2-28, S. 22).

- Die Kultivierungsdauer variierte zwischen etwa 8 Tagen bei sehr schnell wachsenden Pilzen bis zu über 30 Tagen bei langsam wachsenden. Die Wachstumsrate weniger Pilze war so gering, daß nach ca. 30 Tagen die Kultivierung abgebrochen wurde. Meist führte eine moderate Wachstumsgeschwindigkeit zu Kultivierungszeiten von etwa 25 Tagen.
- Die beschriebenen Aromaeindrücke und Pigmentierungen für die Fruchtkörper wurden bei Submerskultivierung der Pilze nur selten festgestellt (*I. benzoinum*, *L. lepideus*, *M. giganteus*, *P. tuberaster*).
- Für detailliertere Untersuchungen wurden drei Pilzstämme ausgewählt, die sich in der Art der gebildeten Metabolite unterschieden (s. 2.2, S. 39 ff):
 - *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48. Im Medium des schnell wachsenden Pilzes wurden halogensubstituierte Anisylverbindungen nachgewiesen. Belichtung führte zu einer um den Faktor 4 erhöhten Konzentration.
 - *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61: In belichteten Kulturen dieses Pilzes wurden C₈-Verbindungen in bis zu 4fach erhöhten Konzentrationen gegenüber dunkel geführten Kulturen detektiert. Darunter befand sich 1-Octen-3-ol, das den typischen Pilzgeruch hervorruft.
 - *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Der intensiv riechende Pilz (balsamisch, zimtartig, süß) gab auch ohne Zusatz von L-Phenylalanin zahlreiche phenolische Metabolite ins Medium ab. Insbesondere bei Zimtsäurederivaten wurde ein Belichtungseffekt erkennbar.

2.2 Untersuchungen an ausgewählten Pilzstämmen

2.2.1 *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61

Bei der Untersuchung der Sammelproben im Screening wurden im Medium von *G. odoratum* vergleichsweise viele C₈-Verbindungen festgestellt (2.1.13, S. 16). Darunter befand sich 1-Octen-3-ol (bis zu 10 mg L⁻¹), welches das typische Pilzaroma verkörpert. Insbesondere für die Bildung dieser Verbindung zeichnete sich ein positiver Effekt durch UV-A-Belichtung ab (Faktor 4 gegenüber der dunkel geführten Kultur).

2.2.1.1 Aktivitätsbestimmung von Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase

1-Octen-3-ol wird auf enzymatischem Weg aus Linolsäure generiert. Die Spaltung wird durch das Zusammenwirken von Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase katalysiert. Eine mögliche Photoregulation auf Enzymebene sollte durch die gemeinsame Bestimmung der Aktivitäten ermittelt werden.

Die Kultivierung erfolgte in SNL-Hefe unter Lichtausschluß sowie unter UV-A-Belichtung (14 h d^{-1}). In Vorversuchen wurde der Zellaufschluß in einem Potter auf seine Eignung für diese Anwendung überprüft. Die mikroskopische Untersuchung der Zellhomogenate erbrachte, daß bei einer Mahldauer von mehr als 3 min der vollständige Aufschluß des eingesetzten Pilzmycels erzielt wurde.

Der enzymatische Umsatz von Linolsäure zu 1-Octen-3-ol erfolgt sehr schnell. Die Reaktion wurde bei der Zerstörung der Zellen während des Zellaufschlusses im Potter durch das Zusammentreffen von Substrat und Enzymen gestartet. Vor der Aktivitätsbestimmung vorhandenes Produkt im Mycel konnte vollständig durch wiederholtes Waschen der Biomasse entfernt werden.

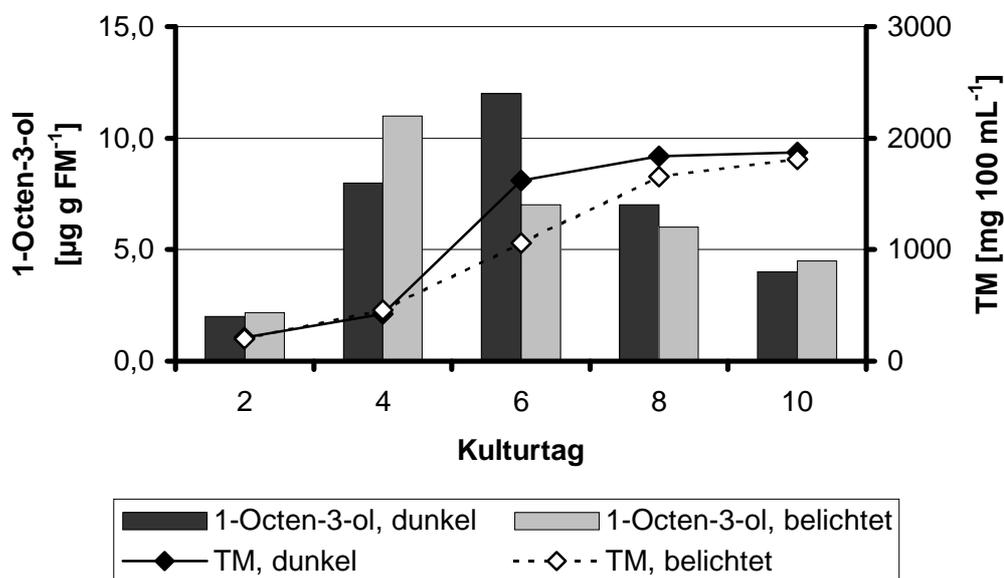


Abbildung 2-1: *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61: Bildung von 1-Octen-3-ol im Enzymassay

Im Verlauf der Kultivierung kam es zu einem Anstieg der Medienviskosität, was sich erschwerend auf die Gewinnung der Biomasse auswirkte. Das Mycel war von einer Gallertscheide umschlossen, die sich auch durch mehrfaches Waschen nicht vollständig entfernen ließ. Der durch die Gallerthülle bedingte höhere Wassergehalt manifestierte sich

durch streuende Werte in der auf Feuchtmasse bezogenen Bildung von 1-Octen-3-ol. Unabhängig von dieser Streuung ergaben sich keine deutlichen Hinweise auf eine belichtungsabhängige Stimulation von Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase. Es wurde lediglich eine Verzögerung des Aktivitätsverlaufes in der dunkel geführten Kultur festgestellt. Um den in 2.1.13 beobachteten positiven Belichtungseinfluß erklären zu können, hätten die Enzymaktivitäten bei Belichtung längerfristig deutlich über den Aktivitäten bei Lichtausschluß liegen müssen. Die erhöhte Konzentration von 1-Octen-3-ol und der daraus abgeleiteten C₈-Verbindungen war offensichtlich nicht auf eine Photoregulation von Enzymaktivitäten zurückzuführen.

2.2.1.2 Extraktion flüchtiger Metabolite

Durch die Extraktion von Proben aus Submerskulturen von *G. odoratum* über den gesamten Kulturverlauf sollte die Bildung der C₈-Verbindungen verfolgt werden. Der Vergleich der Konzentrationsverläufe in belichteten und unbelichteten Kulturen sollte Hinweise über einen Einfluß der Lichtverhältnisse liefern. Es wurden sowohl die Flüssig/flüssig-Extraktion als auch die Festphasenmikroextraktion angewandt.

Flüssig/flüssig-Extraktion

Die Flüssig/flüssig-Extraktion mit einem azeotropen Pentan/Ether-Gemisch wurde durch die hohe Viskosität des zu extrahierenden Kulturmediums stark gestört. Im Scheidetrichter kam es zur Bildung einer gelatinösen Emulsion. Eine Phasentrennung trat nicht ein. Daher wurde die Extraktion in Zentrifugenbechern durchgeführt und die Phasentrennung durch Zentrifugation herbeigeführt.

Auch nach scharfem Einengen der Extrakte auf ein Volumen von etwa 1 mL lieferten die gaschromatographischen Untersuchungen keine für eine Quantifizierung verwertbaren Daten.

Festphasenmikroextraktion (SPME)

Als Alternative wurde, wie bereits in den Screening-Versuchen, die SPME eingesetzt. Bereits am 4. Kulturtag zeichnete sich der negative Einfluß der Probenmatrix auf dieses Extraktionsverfahren ab. Durch die erhöhte Viskosität wurde die Durchmischung der Probe während der Adsorption erschwert und war ab dem 6. Kulturtag nicht mehr gegeben. Die Ermittlung verwertbarer Daten für die Quantifizierung war mit dieser Extraktionsmethode nicht möglich.

2.2.1.3 Verminderung der Medienviskosität

Über den gesamten Kulturverlauf wurde eine stetige Erhöhung der Medienviskosität beobachtet, wenn *G. odoratum* in SNL-Hefe kultiviert wurde. Bei der Submerskultivierung vieler Pilze wird eine solche Viskositätserhöhung beobachtet und ist somit von grundsätzlicher Bedeutung für die Arbeit mit diesen Organismen. Aus dem gegebenen Anlaß erschien es an dieser Stelle geboten, verschiedene Maßnahmen auf ihre Eignung zu untersuchen, die Viskositätserhöhung des Mediums zu verhindern.

Medienzusammensetzung

Die Viskositätserhöhung wird durch Exopolysaccharide ausgelöst, die vom Pilz ins Medium abgegeben werden. Eine Veränderung der Medienzusammensetzung sollte die Exkretion dieser Exopolysaccharide vermindern. Auf Basis der SNL wurden verschiedene Medienvariationen untersucht. Insbesondere durch den Austausch der C-Quelle sollte dem Pilz der Zugang zur Glucose als Grundbaustein der Exopolysaccharide erschwert werden. Das Verhalten des Basidiomyceten wurde in den folgenden Medien verfolgt:

Tabelle 2-48: *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61: Variation der Medienzusammensetzung

Nr.	Variation
1	SNL-B ₁
2	SNL-B ₁ mit erhöhtem Stickstoffgehalt
3	SNL- Hefe
4	SNL-B ₁ , Ersatz der Glucose durch Malzextrakt
5	SNL-B ₁ , Ersatz der Glucose durch Stärke
6	SNL-B ₁ , Ersatz der Glucose durch Saccharose
7	SNL-B ₁ , Ersatz der Glucose durch Lactose

G. odoratum wurde 7 Tage submers sowohl im Dunkeln als auch unter UV-A-Belichtung (14 h d⁻¹) kultiviert. Das Wachstumsverhalten wurde visuell beurteilt. Die Bestimmung der Medienviskosität erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 2431 über die Auslaufgeschwindigkeit eines definierten Medievolumens aus einem Meßtrichter.

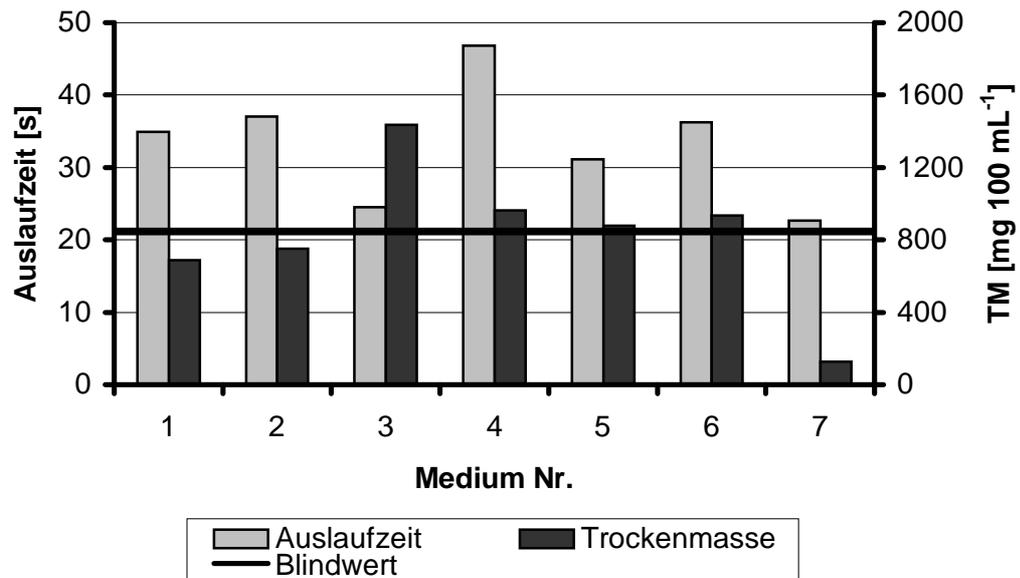


Abbildung 2-2: *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61: Medienviskosität und Biomassebildung bei unterschiedlicher Medienzusammensetzung, Kultivierung unter Lichtausschluß

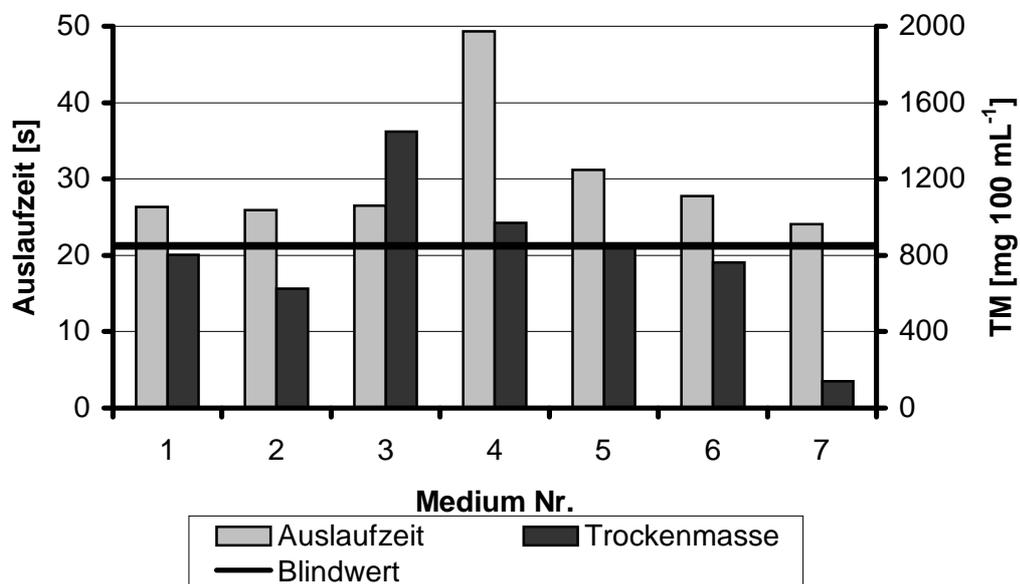


Abbildung 2-3: *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61: Medienviskosität und Biomassebildung bei unterschiedlicher Medienzusammensetzung, Kultivierung unter UV-A-Belichtung

Tabelle 2-49: *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61: Wachstumsverhalten bei Variation der Medienzusammensetzung

Nr.	Wachstumsverhalten	Geruchseindruck
1	langsam, kleine feste Pellets, farbloses Medium	frisch
2	langsam, kleine feste Pellets, farbloses Medium	frisch
3	sehr schnell, große lockere Pellets, hellgelbes Medium	frisch
4	sehr schnell, große lockere Pellets, braunes Medium	frisch
5	sehr schnell, kleine feste Pellets, farbloses Medium	–
6	schnell, kleine lockere Pellets, farbloses Medium	–
7	sehr langsam, kleine lockere Pellets, gelbliches Medium	–

Bei der Bestimmung der Biomasse wurden keine Unterschiede zwischen belichteten und unbelichteten Kulturen beobachtet. Im lactosehaltigen Medium war kaum ein Biomassezuwachs zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu wurde in der SNL-Hefe nahezu die doppelte Masse an Mycel gebildet wie in den restlichen Medien. Trotz vergleichsweise hohem Biomassezuwachs blieb die Medienviskosität gering. Dieses Medium wurde somit auch weiterhin eingesetzt. Im Malzextraktmedium wurde die höchste Viskositätszunahme verzeichnet. In den glucosehaltigen Medien auf Basis der SNL-B₁ wurde bei Kultivierung in Dunkelheit ein deutlich stärkerer Viskositätsanstieg festgestellt als bei Belichtung (36 s gegenüber 26 s Auslaufzeit).

Da die Bildung der Exopolysaccharide durch Variation der Medienzusammensetzung nicht vermindert werden konnte, wurde angestrebt, diese nach Beendigung der Kultivierung aus dem Medium zu entfernen.

Zusatz hydrolytischer Enzyme zum Kulturfiltrat

Fünf technische Enzympräparate (Kombinationen nicht genau spezifizierter Enzyme, Hauptaktivitäten: Pectinasen, Cellulasen, Hemicellulasen) wurden nach Beendigung der Kultivierung und nach Separation von Kulturmedium und Biomasse eingesetzt. *G. odoratum* wurde für 7 Tage submers in SNL-Hefe unter Lichtausschluß sowie unter UV-A-Belichtung (14 h d⁻¹) kultiviert.

Durch die hydrolytischen Aktivitäten der Enzyme sollten Bindungen in den vom Pilz exkretierten Exopolysacchariden gespalten und somit die Viskosität des Mediums gesenkt werden. Die Viskositätsmessungen erfolgten nach 7 und nach 20 h Inkubation.

Die Auslaufzeit betrug direkt nach Separation des Mediums 27,3 s (dunkel) bzw. 29,7 s (belichtet). Für den Blindwert mit Wasser wurden 21,2 s ermittelt.

Bei keinem der eingesetzten Enzympräparate wurde eine Wirkung in bezug auf die Medienviskosität festgestellt. Die Messung der Auslaufzeiten nach 7 sowie nach 20 h

Inkubation ergaben keine Veränderungen. Beim Kontrollansatz ohne Enzymzusatz wurde nach Ablauf der Inkubationszeiten ebenfalls keine abweichende Auslaufzeit ermittelt.

Ausfrieren

Beim Auftauen eingefroren gelagerter Kulturfiltrate verschiedener Pilze (Sammelproben im Screening, 2.1) wurde häufig eine gallertartige Masse festgestellt, die gänzlich aus der Flüssigkeit entfernt werden konnte.

Versuche mit den Filtraten 7 Tage alter unbelichteter und belichteter Kulturen von *G. odoratum* in SNL-Hefe führten zur Bildung einer Gallerte durch Einfrieren. Es konnte jedoch keine Aggregation festgestellt werden, die eine Entfernung aus der Flüssigkeit ermöglicht hätte. Entgegen der Intention hatte das Einfrieren sogar eine weitere Viskositätssteigerung zur Folge. Die Auslaufzeiten verlängerten sich von 27,3 s auf 36,8 s (unbelichtete Kultur) und von 29,7 s auf 39,4 s (belichtete Kultur).

2.2.1.4 Teilzusammenfassung 2.2.1

- Auf der Ebene von Enzymaktivitäten wurden keine photoregulativen Effekte in bezug auf die Bildung von 1-Octen-3-ol festgestellt.
- Extraktionsverfahren wurden durch eine hohe Viskosität des Mediums stark beeinträchtigt. Die Datenerhebung zur Quantifizierung über den gesamten Kulturzeitraum wurde dadurch verhindert.
- *G. odoratum* schied Exopolysaccharide ab, welche die starke Viskositätszunahme des Mediums hervorriefen. Bei Variation der Medienzusammensetzung ergab sich die geringste Viskositätszunahme bei Kultivierung in SNL-Hefe. Der Kultivierung nachgeschaltete Verfahren hatten keinen Einfluß auf die Konsistenz des Mediums. Offensichtlich wurden die Bindungen in den Polymeren durch keines der eingesetzten Enzyme angegriffen.

2.2.2 *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48

Im Rahmen der Screeningversuche wurden in Kulturfiltraten von *B. adusta* halogenierte Anisyl-derivate in vergleichsweise hohen Konzentrationen (bis zu 8 mg L⁻¹) detektiert (Tabelle 2-3, S. 6). Es deutete sich ein Belichtungseffekt in bezug auf die Bildung dieser

Metabolite an. Bei UV-A-Belichtung wurden bis zu 4fach höhere Konzentrationen gemessen als in dunkel geführten Kulturen. Die folgenden Untersuchungen sollten diesen Effekt verifizieren. Durch Zusatz von Halogeniden und L-Phenylalanin sowie L-Tyrosin als Precursoren sollte die Synthese von weiteren Organohalogenverbindungen begünstigt werden.

Der Einsatz eines Atomemissionsdetektors (AED) ermöglichte die selektive Detektion der halogenierten Substanzen und bot damit einen entscheidenden Vorteil gegenüber einem ECD. Die Identifizierung mittels Massenspektrometrie wurde dadurch wesentlich vereinfacht.

2.2.2.1 Halogensubstituierte Metabolite

In Pentan/Ether-Extrakten aus den durchgeführten Untersuchungen (2.2.2.3-2.2.2.5) wurden folgende halogensubstituierte Anisyllderivate identifiziert:

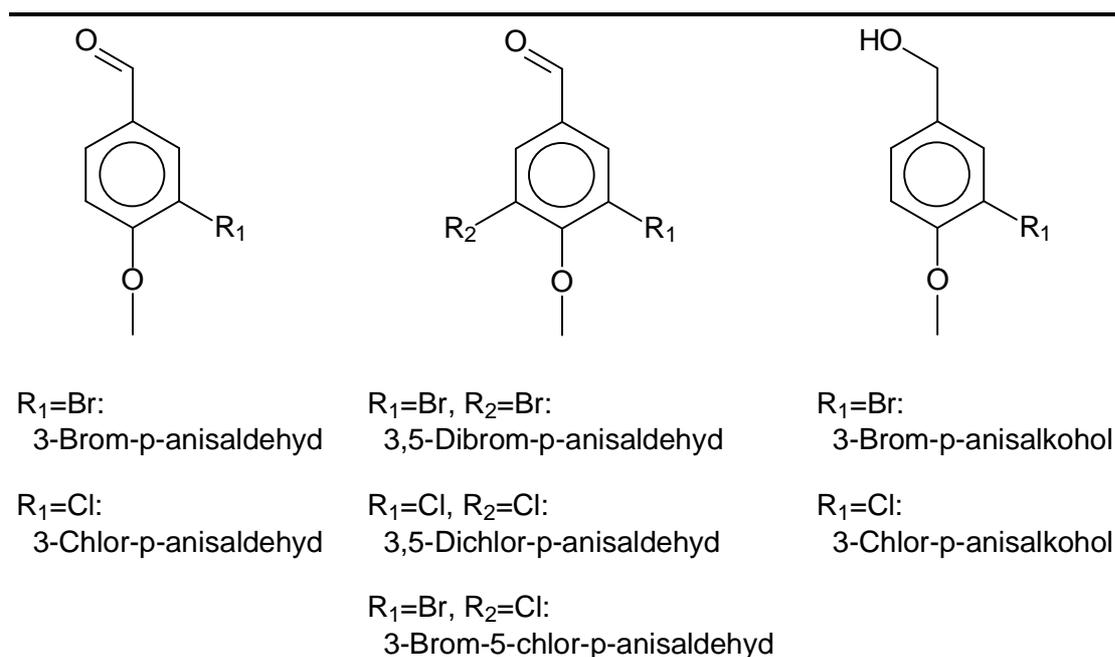


Abbildung 2-4: Von *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48 synthetisierte Organohalogenverbindungen

2.2.2.2 Medienzusätze

Um zu gewährleisten, daß die Bildung der Organohalogenverbindungen nicht durch die Verfügbarkeit der Halogenide limitiert wurde, wurden den Kulturen die jeweiligen Kaliumsalze zugesetzt. Die Kombination der einzelnen Salze sollte heterogene Mehrfachsubsti-

tutionen begünstigen. KCl, KBr und KI wurden jeweils in einer Konzentration von 20 mmol L^{-1} , KF in einer Konzentration von 10 mmol L^{-1} 24 h nach Inokulation zugefügt. Bei Kombination der Salze wurden die eingesetzten Stoffmengen halbiert.

Aufgrund der aromatischen Struktur der im Screening identifizierten halogenierten Metabolite (vgl. 2.1.3, S. 6) wurden L-Phenylalanin und L-Tyrosin auf ihre Precursorwirkung untersucht. Zusätzlich zu den Halogeniden wurden 24 h nach Inokulation 10 mmol L^{-1} L-Phenylalanin bzw. 5 mmol L^{-1} L-Tyrosin zugesetzt.

2.2.2.3 Submerskultivierung im Schüttelkolben

B. adusta wurde in SNL-Hefe auf einem Rundschüttler unter Lichtausschluß sowie unter UV-A-Belichtung (14 h d^{-1}) kultiviert. Die Halogenide wurden sowohl einzeln als auch in einer Kombination aller Salze zugesetzt. Nach 8 Tagen wurde das Medium vom Mycel durch Vakuumfiltration separiert und mit einem Pentan/Ether-Gemisch extrahiert.

Zusatz von Halogeniden

Sowohl Halogenidzusatz als auch Belichtungsverhältnisse hatten keinerlei Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Kulturen. In allen Ansätzen wurde die Biotrockenmasse jeweils mit etwa $1200 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ bestimmt.

Während ohne Zusatz der Salze keine Halogenierungen beobachtet wurden, führte deren Zusatz zu geringen Mengen ($<0,01 \text{ mg L}^{-1}$) chlorierter und bromierter Metabolite in den Kulturfiltraten. Aufgrund der geringen Konzentrationen wurde eine Quantifizierung nicht durchgeführt. Die Substanzen wurden als die in Abbildung 2-4 aufgeführten chlorierten und bromierten Anisyl-derivate identifiziert.

Zusatz von Halogeniden und L-Phenylalanin

Wurden die Halogenide zusätzlich zu L-Phenylalanin appliziert, kam es zu einer etwa 60%igen Wachstumshemmung. Zusätzlich war ein negativer Einfluß der UV-A-Belichtung auf das Wachstumsverhalten von *B. adusta* zu erkennen. Mit Ausnahme der Kultivierung in fluoridhaltigen Medien bildete *B. adusta* bei Belichtung weniger Biotrockenmasse (Abbildung 2-5).

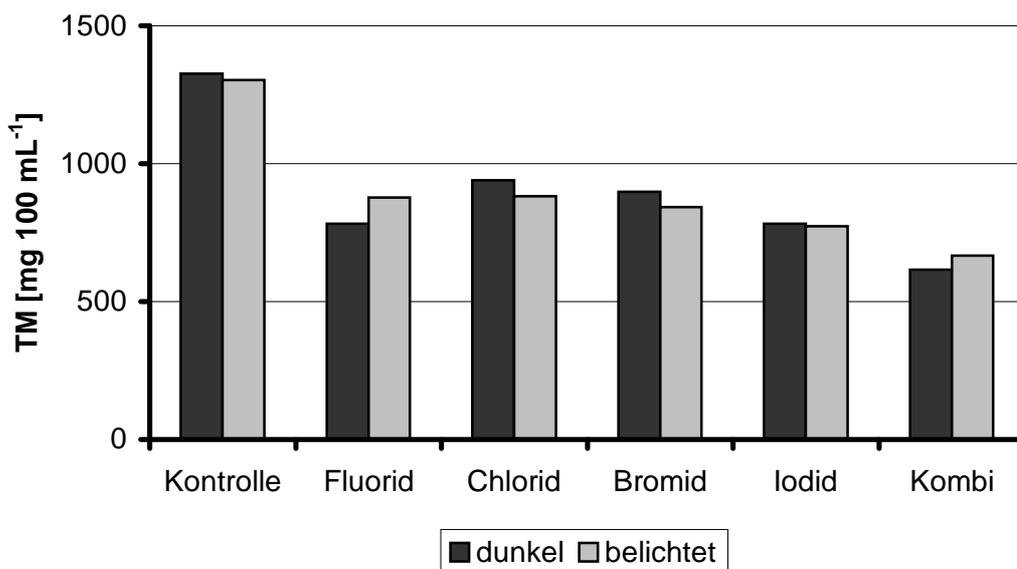


Abbildung 2-5: *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48 in Submerskultur: Einfluß zugesetzter Halogenide auf die Biomassebildung in L-phenylalaninhaltigem Medium, Bestimmung am 8. Kulturtag

Wie die Analyse der Extrakte zeigte, hatte der Zusatz von L-Phenylalanin nur geringe Auswirkungen auf die Bildung halogensubstituierter Aromaten. In den AED-Untersuchungen wurden lediglich geringe Mengen ($<0,05 \text{ mg L}^{-1}$) bromierter und chlorierter Anisylderivate detektiert.

Es zeigte sich eine deutliche Precursorwirkung von L-Phenylalanin besonders für Phenylmethanol (bis zu 10 mg L^{-1}) sowie Benzaldehyd (bis zu 1 mg L^{-1}) und Phenylelessigsäure (bis zu $1,5 \text{ mg L}^{-1}$), die in allen Ansätzen festgestellt wurden. Eine Hydroxylierung in 4-Stellung des aromatischen Rings fand offensichtlich nicht statt, was durch das Fehlen entsprechender Anisylderivate dokumentiert wurde.

Zusatz von Halogeniden und L-Tyrosin

Die negativen Einflüsse auf das Wachstum waren beim kombinierten Zusatz von Halogeniden und L-Tyrosin sehr ausgeprägt. Insbesondere die Kombination mit Fluorid hatte eine stark wachstumshemmende Wirkung. Während die Belichtung mit UV-A für Kulturen mit L-Phenylalaninzusatz nahezu ohne Folgen blieb, bedingte der Zusatz von L-Tyrosin eine hochgradige Störung des Wachstums (Abbildung 2-6). Diese Störung war offensichtlich in erster Linie auf L-Tyrosin zurückzuführen. Bereits im Kontrollansatz ohne Zusatz von Halogeniden wurde ein 50%iger Hemmeffekt ausgelöst.

In den Pentan/Ether-Extrakten wurden geringe Konzentrationen ($<0,05 \text{ mg L}^{-1}$) chlorierter und bromierter Anisylderivate (Abbildung 2-4) festgestellt. Ein Einfluß der Belichtungsver-

hältnisse auf das Vorkommen dieser Substanzen wurde nicht ersichtlich. Iod- oder fluorhaltige Metabolite wurden nicht detektiert.

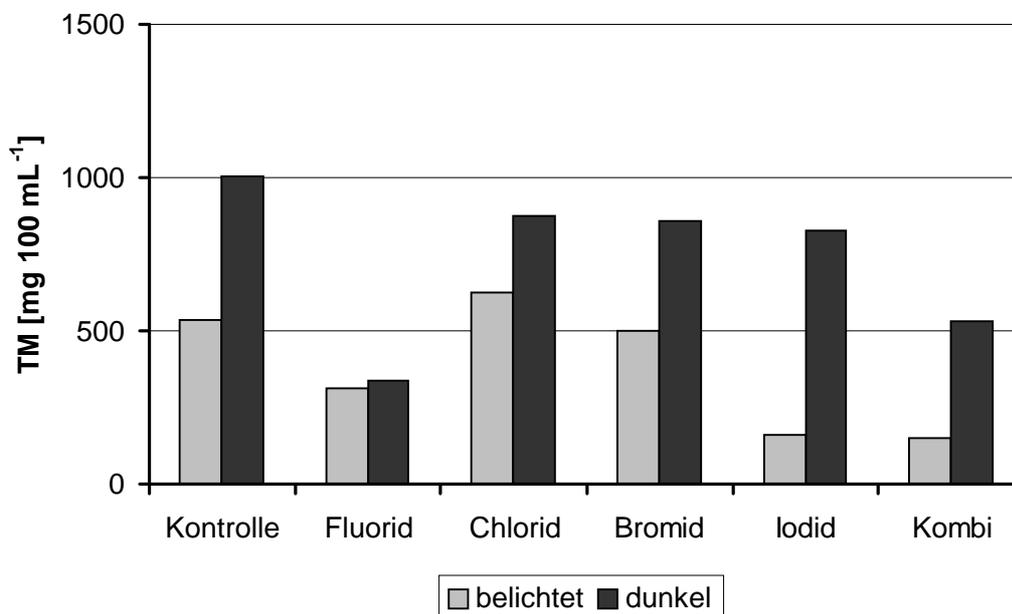


Abbildung 2-6: *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48 in Submerskultur: Einfluß zugesetzter Halogenide auf die Biomassebildung in L-Tyrosin-haltigem Medium, Bestimmung am 8. Kulturtag

2.2.2.4 Submerskultivierung im Rührkesselbioreaktor

Die Maßstabsvergrößerung der Kultivierung sollte zu erhöhten Produktmengen führen mit dem Ziel, weitere, sehr gering konzentrierte Metabolite zu identifizieren. Das Upscaling der Submerskultivierung erfolgte in einem 2,5 L Rührkesselbioreaktor. *B. adusta* wurde bei Umgebungslicht in SNL-Hefe kultiviert. 24 h nach Inokulation wurden L-Tyrosin (5 mmol L⁻¹) sowie KBr (5 mmol L⁻¹) und KCl (10 mmol L⁻¹) zugesetzt. Am 7. Kulturtag wurden 10 g L⁻¹ Glucose aus einer sterilfiltrierten Stammlösung nachdosiert.

Nach Abtrennung der Biomasse durch Filtration am 10. Kulturtag wurde 1 L des Filtrates auf pH 7,0 und 1 L auf pH 1,5 eingestellt. Die Medien wurden für 22 h einer kontinuierlichen Flüssig/flüssig-Extraktion mit einem Pentan/Ether-Gemisch unterzogen. Die getrockneten Extrakte wurden auf ca. 3 mL eingeeengt und mittels GC-AED und GC-MS untersucht.

Sowohl im neutralen als auch im sauren Extrakt wurden keine halogenierten Metabolite detektiert, während nichthalogenierte Verbindungen, insbesondere Anisyl-derivate, in höheren Konzentrationen vorlagen.

2.2.2.5 Statische Oberflächenkultur

Aus der Literatur geht hervor, daß Untersuchungen zur biologischen Halogenierung durch Pilze meist in statischen Oberflächenkulturen durchgeführt wurden.

Daher wurde in weiteren Versuchsreihen auch diese Kultivierungsart angewendet. In diesen statischen Oberflächenkulturen wurden chlorierte und bromierte Anisylderivate in deutlich höheren Konzentrationen gebildet als in Submerskulturen. Die Identifizierung der bereits bei Submerskultivierung in geringen Mengen gefundenen Halometabolite wurde hierdurch stark erleichtert. Der Einfluß der eingesetzten Halogenide auf das Produktspektrum konnte verdeutlicht werden.

Die Kulturen wurden in 500 mL Erlenmeyerkolben mit 150 mL SNL-Hefe angesetzt. Daraus ergab sich eine Oberfläche von 175 cm². Die Kolben wurden unter Lichtausschluß im Brutschrank inkubiert. Halogenide sowie L-Phenylalanin bzw. L-Tyrosin als Precursoren wurden 48 h nach Inokulation appliziert. Nachdem das lockere Submersmycel die Oberfläche erreicht hatte, kam es dort meist schnell zur Bildung einer dicken, geschlossenen Mycelschicht. Am 21. Kulturtag wurden die Kulturen aufgearbeitet.

Zusatz von Halogeniden und L-Phenylalanin

Bereits früh im Kulturverlauf zeichneten sich Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Ansätze ab. In Anwesenheit von Chlorid und Bromid entsprach das Wachstum dem einer Kontrollkultur, der lediglich L-Phenylalanin zugesetzt wurde. Eine Hemmung wurde in den iodid- und fluoridhaltigen Kulturansätzen beobachtet. Die Bildung von Submers- und Oberflächenmycel war hier deutlich verzögert, was sich deutlich bei der Bestimmung der Trockenmassen widerspiegelte (Abbildung 2-7).

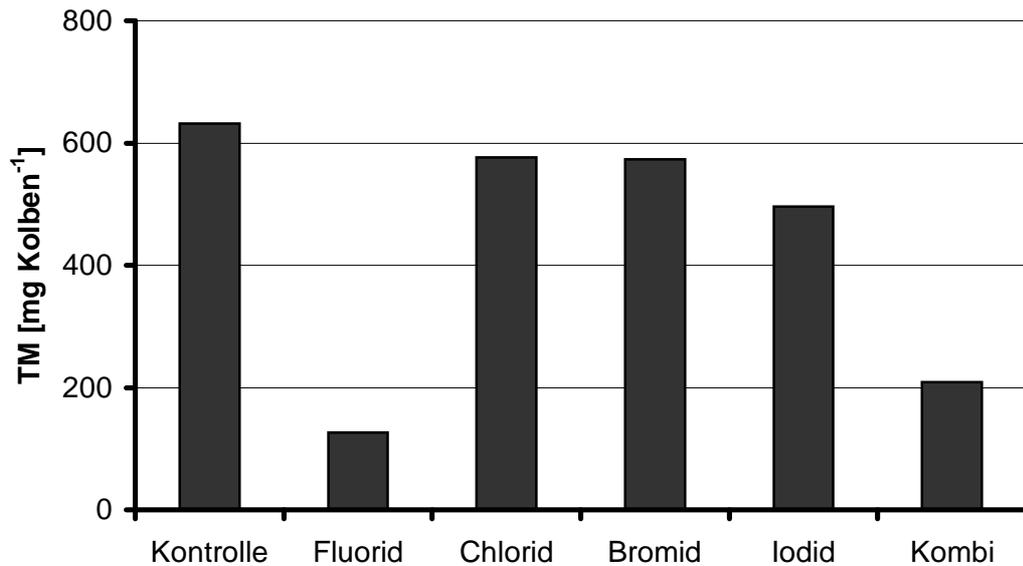


Abbildung 2-7: *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48 in statischer Oberflächenkultur: Einfluß zugesetzter Halogenide auf die Biomassebildung in L-phenylalaninhaltigem Medium, Bestimmung am 21. Kulturtag

Während in den entsprechenden Submerskulturen lediglich geringe Mengen halogensubstituierter Metabolite gefunden wurden, lagen die Konzentrationen chlorierter und bromierter Verbindungen bei der statischen Kultivierung von *B. adusta* deutlich höher (Tabelle 2-50). Iodhaltige Metabolite wurden bei AED-Detektion in sehr geringen Spuren angezeigt. Weitere Maßnahmen zur Identifizierung wurden nicht ergriffen, da der hohe technische und zeitliche Aufwand hier nicht angemessen erschien. Es gab keine Hinweise auf die Inkorporation von Fluor.

Tabelle 2-50: *Bjerkandera adusta* in statischer Oberflächenkultur: Vorkommen von Metaboliten in L-phenylalaninhaltigem Medium bei Zusatz von Halogeniden, Bestimmung am 21. Kulturtag, Konzentrationsangaben in mg L⁻¹, – = nicht detektiert

	Kontr	F	Cl	Br	I	Kombi
3-Chlor-p-anisaldehyd	0,05	–	0,31	–	–	–
3,5-Dichlor-p-anisaldehyd	0,27	–	1,25	–	–	–
3-Chlor-p-anisalkohol	–	–	0,11	–	–	–
3-Brom-p-anisaldehyd	–	–	–	0,18	–	–
3,5-Dibrom-p-anisaldehyd	–	–	–	0,38	–	–
3-Brom-p-anisalkohol	–	–	–	0,73	–	–
3-Brom-5-chlor-p-anisaldehyd	–	–	–	0,03	–	–
Benzaldehyd	–	0,02	0,10	0,05	0,05	0,06
Phenylmethanol	–	0,58	4,96	9,04	1,35	2,91
Phenylessigsäure	–	0,21	0,45	0,91	0,19	0,23

Zusatz von Halogeniden und L-Tyrosin

Bei statischer Kultivierung in L-tyrosinhaltigem Medium wurden keine hemmenden Einflüsse durch zugesetzte Halogenide mit Ausnahme von Fluorid auf das Wachstum von *B. adusta* beobachtet. Die Biotrockenmasse im Kontrollansatz mit L-Tyrosin sowie in den Ansätzen mit zusätzlichem Chlorid- und Bromidzusatz wurde mit jeweils etwa 800, bei Anwesenheit von Fluorid mit 300 mg Kolben⁻¹ bestimmt.

Chlorierte und bromierte Anisylderivate wurden in höheren Konzentrationen detektiert (Tabelle 2-51). Fluor- und Iodsubstitutionen wurden nicht registriert.

Anisylderivate ohne Halogensubstituenten lagen lediglich in geringen Konzentrationen vor.

Tabelle 2-51: *Bjerkandera adusta*, CBS 414.48 in statischer Oberflächenkultur: Vorkommen von Metaboliten in L-tyrosinhaltigem Medium bei Zusatz von Halogeniden, Bestimmung am 21. Kulturtag, Konzentrationsangaben in mg L⁻¹, – = nicht detektiert

	Kontr	F	Cl	Br	I	Cl+Br
3-Chlor-p-anisaldehyd	0,31	–	0,59	–	–	0,19
3,5-Dichlor-p-anisaldehyd	2,83	–	3,77	–	–	0,14
3-Chlor-p-anisalkohol	0,24	–	0,46	–	–	0,04
3-Brom-p-anisaldehyd	–	–	–	1,55	–	1,24
3,5-Dibrom-p-anisaldehyd	–	–	–	0,61	–	0,41
3-Brom-p-anisalkohol	–	–	–	1,01	–	0,85
3-Brom-5-chlor-p-anisaldehyd	–	–	–	–	–	0,62
Benzaldehyd	–	–	–	<0,01	–	0,06
Phenylmethanol	0,38	0,14	0,36	0,25	0,17	2,91
Phenyllessigsäure	0,05	–	–	–	–	0,23

2.2.2.6 Teilzusammenfassung 2.2.2

- *B. adusta* synthetisierte chlor- und bromsubstituierte Anisylderivate. Die Bildung wurde durch Zusatz der entsprechenden Halogenide gefördert. L-Tyrosin und in geringerem Maße auch L-Phenylalanin zeigten deutliche Precursorwirkung.
- Ein Einfluß der Belichtungsbedingungen auf die Bildung halogener Metabolite konnte aus den Untersuchungen nicht abgeleitet werden. Der nach den Ergebnissen des Screeningversuches (2.1.3, S. 6) vermutete Lichteffect wurde nicht bestätigt.
- Die Kombination von Halogeniden und Precursoren hatte, insbesondere bei Belichtung mit UV-A-Licht, eine hemmende Wirkung auf das Pilzwachstum. Besonders ausgeprägt war der Effect bei Zusatz von Fluorid und Iodid.

2.2.3 *Lentinus lepideus*, CBS 450.79

In den Screeningversuchen (2.1.19, S. 22) fiel *L. lepideus* durch einen intensiv balsamischen, zimtartigen Geruchseindruck auf. Es zeigten sich diverse Unterschiede zwischen dunkel geführten und belichteten Kulturen. Insbesondere deutete sich ein stimulierender Effekt der UV-A-Belichtung auf den Zimtsäurestoffwechsel an. Die Konzentrationen phenolischer Komponenten wurden durch den Zusatz von L-Phenylalanin nicht wesentlich erhöht. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen auf die Applikation verzichtet.

2.2.3.1 Nährmedienscreening

Die durchschnittliche Kultivierungsperiode für *L. lepideus* betrug etwa 25 Tage. Vier unterschiedliche Nährmedien wurden auf ihr Potential untersucht, die Wachstumsrate des Pilzes zu erhöhen und somit die Kultivierungsdauer zu verkürzen. Die sensorischen Eigenschaften sollten dabei unverändert erhalten bleiben.

Es wurden SNL-B₁, SNL-B₁ mit erhöhtem Calcium-Gehalt, SNL-Hefe sowie ein spezielles Nährmedium nach LEATHAM [MILES UND CHANG, 1987] untersucht. *L. lepideus* wurde in den verschiedenen Nährmedien sowohl unter Lichtausschluß wie auch unter UV-A-Belichtung (14 h d⁻¹) kultiviert. Nach 10 Tagen wurden die Kulturen visuell und sensorisch beurteilt. Das Mycel wurde für die Trockenmassebestimmung durch Vakuumfiltration abgetrennt.

Tabelle 2-52: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Einfluß der Medienzusammensetzung auf das Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Belichtungsbedingungen

Medium		Sensorik	Wachstumsverhalten
SNL-B ₁	dunkel	balsamisch, schwach	kleine, helle Pellets, fuchsiges Medium
	UV-A	balsamisch, schwach	kleine, helle Pellets, fuchsiges Medium
SNL-B ₁ + Ca	dunkel	balsamisch, schwach	kleine, helle Pellets, fuchsiges Medium
	UV-A	balsamisch, schwach	kleine, helle Pellets, fuchsiges Medium
SNL-Hefe	dunkel	balsamisch, zimtartig	lockere, beige Pellets, braunes Medium
	UV-A	balsamisch, zimtartig	lockere, beige Pellets, braunes Medium
Leatham	dunkel	balsamisch, leicht terpenig	lockere, beige Pellets, braunes Medium, erhöhte Viskosität
	UV-A	balsamisch, leicht terpenig	lockere, beige Pellets, braunes Medium, erhöhte Viskosität

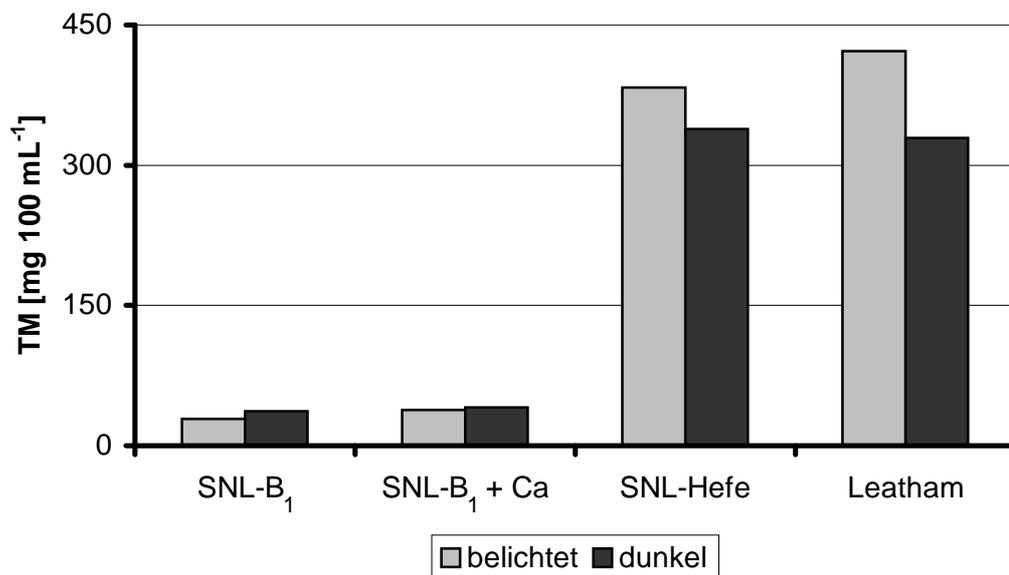


Abbildung 2-8: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Bildung von Biomasse bei unterschiedlichen Belichtungsbedingungen, Bestimmung am 10. Kulturtag

Wie auch in der SNL-Hefe wurde im vollsynthetischen Leatham-Medium ein gutes Wachstum erzielt. Allerdings kam es hier zu einer nicht unerheblichen Viskositätserhöhung, was sich nachteilig auf die Flüssig/flüssig-Extraktion auswirkte (vgl. Probleme mit *G. odoratum*, 2.2.1, S. 39). Der sensorische Eindruck der Kulturen war verändert. *L. lepideus* wurde daher weiterhin in der bis dahin verwendeten SNL-Hefe kultiviert.

2.2.3.2 Gesamtextrakt einer Kultivierungsperiode

Die Fragestellung der Screeningversuche (2.1) erforderte keine absolute Konzentrationsbestimmung. Auf die aufwendige Kalibrierung jeder Einzelsubstanz bei der Festphasenmikroextraktion wurde daher verzichtet. Der Gehalt der Metabolite im Medium wurde nur näherungsweise bestimmt. Zur exakten Konzentrationsbestimmung wurden über einen Kultivierungszeitraum von 24 Tagen 8 mL-Aliquots der von der Biomasse separierten Nährmedien zu Sammelproben vereinigt (Probenahme 48stündlich ab dem 4. Kulturtag), angesäuert und mit einem Pentan/Ether-Gemisch extrahiert (Tabelle 2-53).

Der Vergleich mit den Ergebnissen der Festphasenmikroextraktion (Tabelle 2-28, S.22) ergab eine weitgehende Übereinstimmung sowohl in qualitativer wie auch in quantitativer Hinsicht. Die vergleichsweise niedrige Konzentration des trans-Zimtsäuremethylesters in der dunkel geführten Kultur beim Screening wurde nicht bestätigt. In allen weiteren Versuchsreihen (2.2.3, S. 53 ff) zeigte sich, daß die Konzentration unter Lichtausschluß stets über der bei UV-A-Belichtung erzielten lag.

Wachstumsrate und Wachstumsverhalten der in Dunkelheit und unter Belichtung geführten Kulturen waren gleich.

Tabelle 2-53: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Hauptkomponenten in Pentan/Ether-Extrakten von Sammelproben aus dunkel und belichtet geführten Kulturen. Konzentrationsangaben in mg L⁻¹, positive Effekte durch Belichtung sind fett hervorgehoben

Substanz	dunkel	belichtet
2-Methylpropanol	5,10	5,00
Σ 2- und 3-Methylbutanol	25,27	16,30
3-Hydroxy-2-butanon	0,28	0,30
2-Methylbutansäure	0,80	–
Phenyllessigsäuremethylester	0,78	0,59
Phenylmethanol	0,73	0,38
2-Phenyl-1-ethanol	0,03	0,21
cis-Zimtsäuremethylester	–	10,94
3-Phenyl-1-propanol	0,54	0,03
trans-Zimtsäuremethylester	32,59	17,22
p-Anissäuremethylester	21,30	15,40
trans-Zimtsäureethylester	0,24	0,17
p-Anissäureethylester	0,23	0,42
Phenylmilchsäuremethylester	0,23	0,07
cis-p-Methoxyzimtsäuremethylester	–	4,43
trans-p-Methoxyzimtsäuremethylester	0,21	1,82
Isovanillinsäuremethylester	1,01	0,53

2.2.3.3 Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)

Trans-Zimtsäure als Vorstufe zahlreicher Metabolite kam eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel von *L. lepideus* zu. Die PAL wurde bereits als Schlüsselenzym für die Verbindung des Primärstoffwechsels und des Phenylpropanoidstoffwechsels in Pflanzen und verschiedenen Pilzen beschrieben. Der Nachweis der PAL-Aktivität zeigte, daß auch in *L. lepideus* L-Phenylalanin als Vorstufe der Zimtsäure angesehen werden kann. Die Untersuchungen ergaben, daß die Belichtung mit UV-A-Licht einen deutlich positiven Effekt auf die PAL-Aktivität hatte. Über die gesamte Kultivierungsperiode war die Aktivität sowohl in dunkel geführten als auch in belichteten Kulturen rückläufig (Abbildung 2-9).

L. lepideus wurde in SNL-Hefe unter Ausschluß von Licht sowie unter UV-A-Belichtung (14 h d⁻¹) kultiviert. Vorversuche ergaben, daß die eingesetzte Biomasse im Potter bei einer Anwendungsdauer von 5 min vollständig aufgeschlossen wurde.

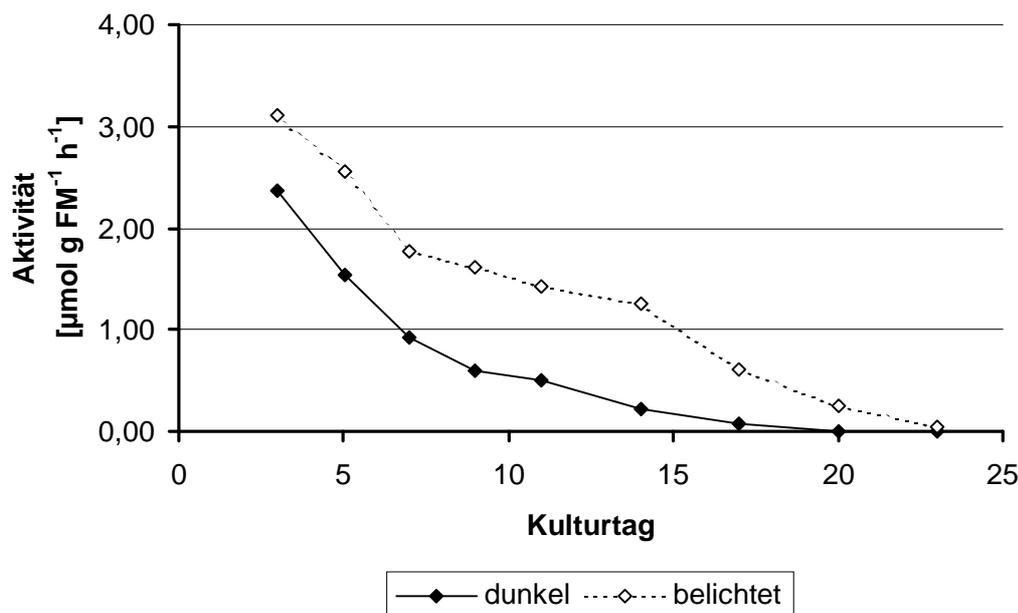
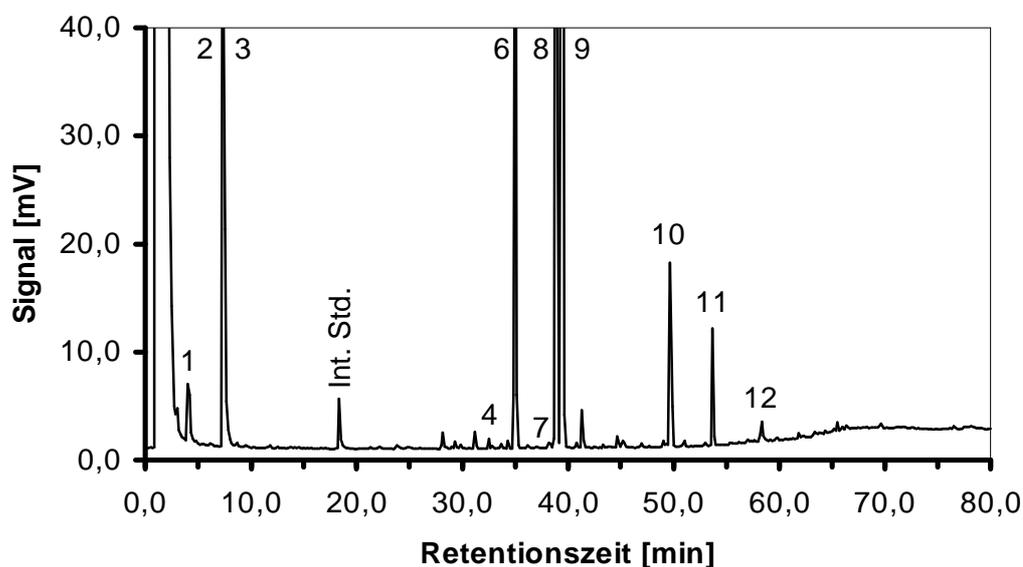
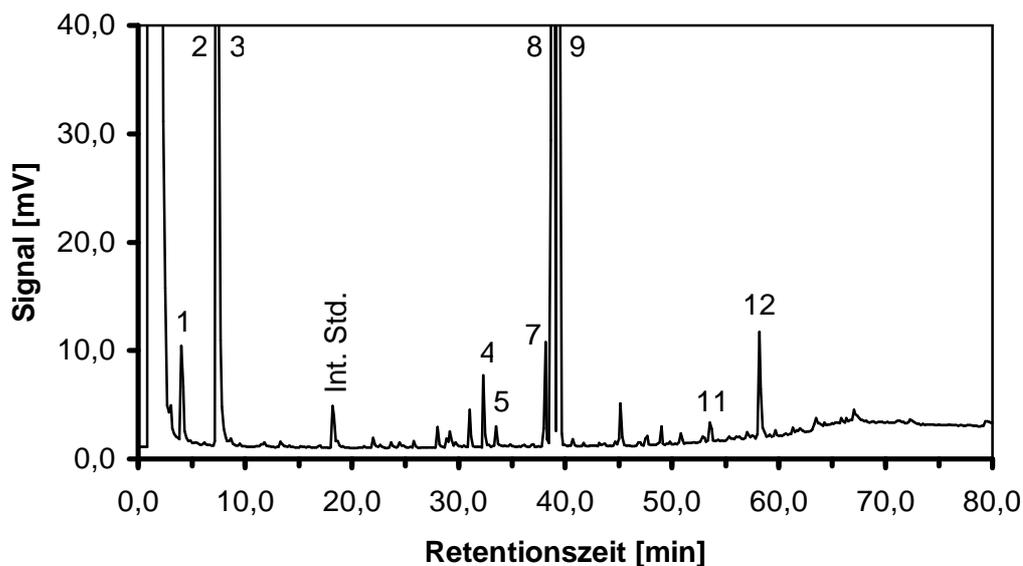


Abbildung 2-9: Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase in Zellhomogenaten von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79. Kultivierung in Dunkelheit und unter Belichtung mit UV-A

2.2.3.4 Konzentrationsverlauf ausgewählter Metabolite über eine Kultivierungsperiode

Die Analyse der Sammelproben erlaubte Aussagen über Effekte, die sich über den gesamten Kulturzeitraum aufsummierten. Sie manifestierten sich in den Konzentrationen der einzelnen Metabolite in den Sammelproben. Aufschluß über die Entwicklungen während der Kultivierung erbrachte die Analyse von Einzelproben, die in regelmäßigen Abständen genommen wurden.

L. lepideus wurde in SNL-Hefe in Dunkelheit sowie unter UV-A-Belichtung (14 h d⁻¹) kultiviert. Zum Probenahmezeitpunkt wurde jeweils ein gesamter Kulturkolben aufgearbeitet. Das separierte Medium wurde mit einem Pentan/Ether-Gemisch extrahiert. Die Konzentrationen der Metabolite (Abbildung 2-11) wurden mittels Gaschromatographie ermittelt. Im folgenden wurden neben den Kulturparametern (Biotrockenmasse und pH-Wert) die Konzentrationsverläufe der Hauptkomponenten dargestellt. Beim Zimtsäure- sowie 4-Methoxyzimtsäuremethylester wurden die Summen der jeweiligen trans- und cis-Isomere angegeben. Da 2- und 3-Methyl-1-butanol coeluierten, wurde auch hier die Summe beider Konzentrationen dargestellt.



- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1 2-Methyl-1-propanol | 2 2-Methyl-1-butanol |
| 3 3-Methyl-1-butanol | 4 Phenylmethanol |
| 5 2-Phenyl-1-ethanol | 6 cis-Zimtsäuremethylester |
| 7 3-Phenyl-1-propanol | 8 trans-Zimtsäuremethylester |
| 9 p-Anissäuremethylester | 10 cis-4-Methoxyzimtsäuremethylester |
| 11 trans-4-Methoxyzimtsäuremethylester | 12 Isovanillinsäuremethylester |

Abbildung 2-10: Retention der beobachteten Metabolite in der Gaschromatographie. Medienextrakte von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79, 15. Kulturtag (dunkel geführt oben, belichtet mit UV-A unten)

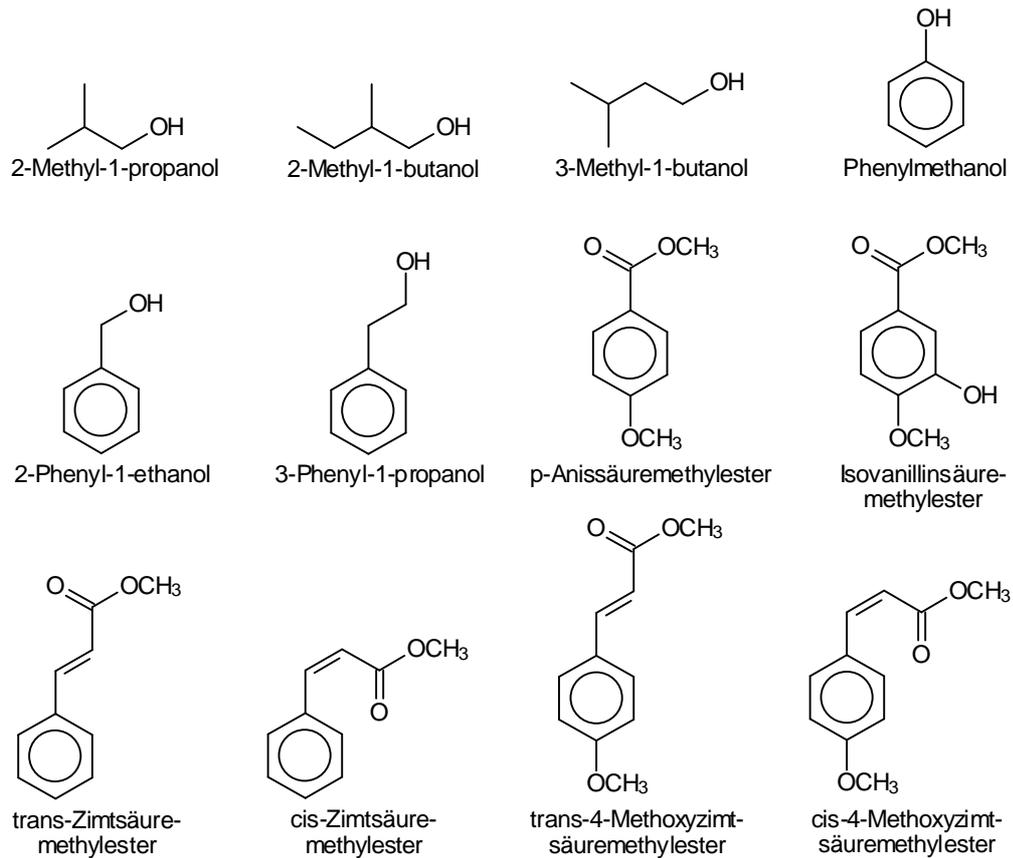


Abbildung 2-11: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Über den Kulturverlauf beobachtete Metabolite im Medium

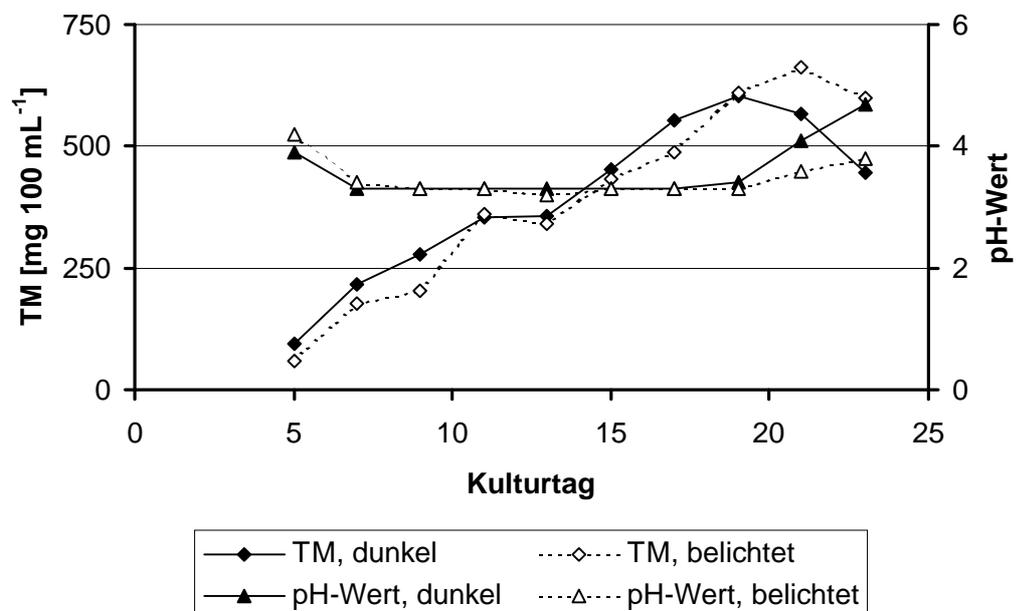


Abbildung 2-12: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Entwicklung von Biotrockenmasse und pH-Wert im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung

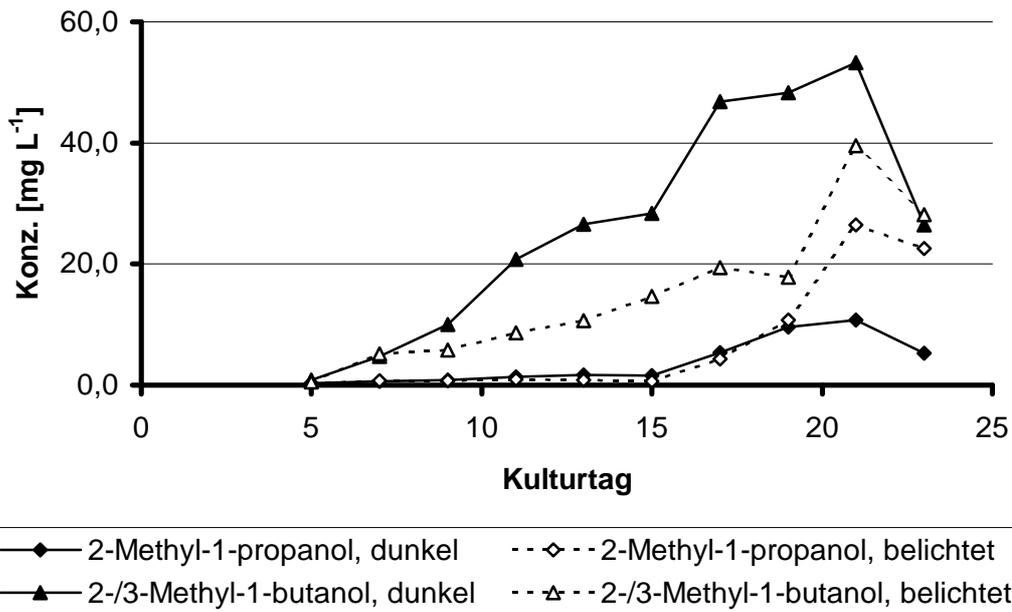


Abbildung 2-13: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung verzweigter aliphatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung

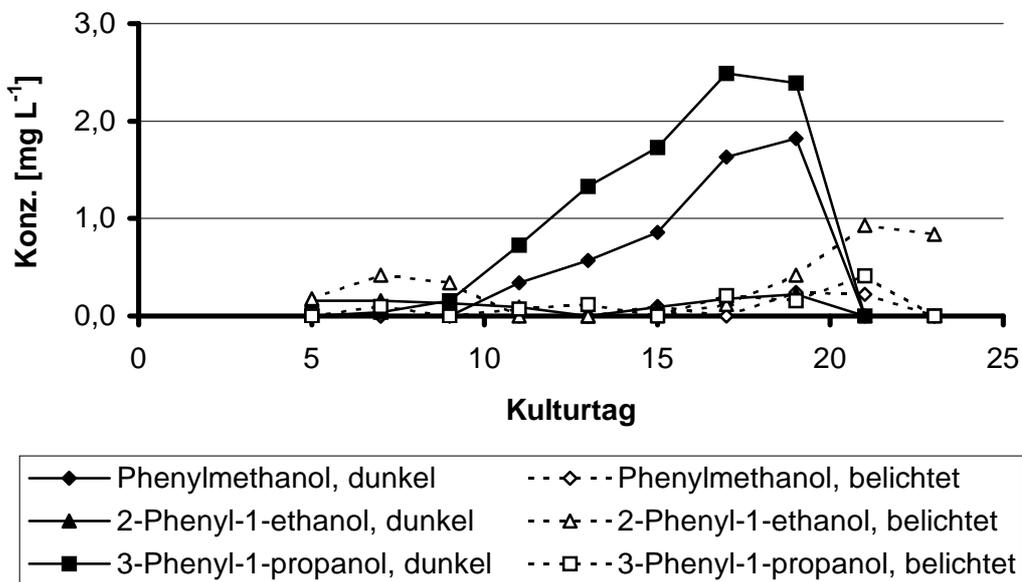


Abbildung 2-14: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung aromatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung

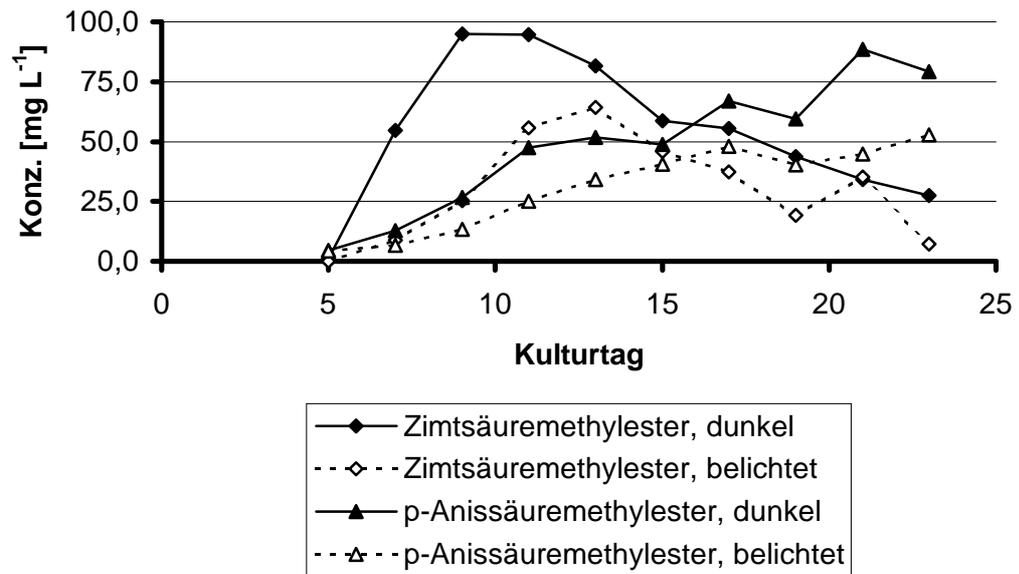


Abbildung 2-15: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Zimt- und p-Anissäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung

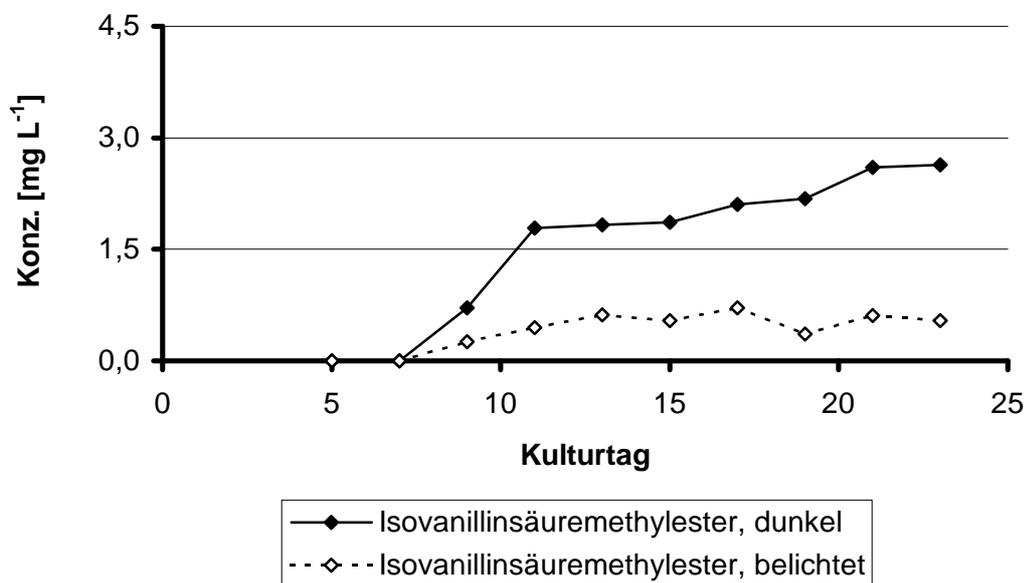


Abbildung 2-16: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Isovanillinsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung

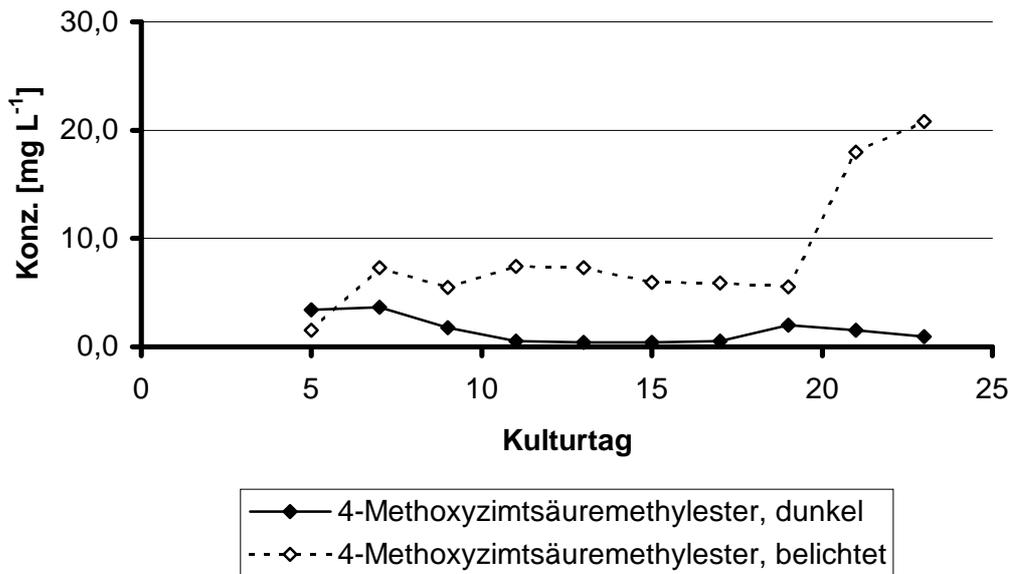


Abbildung 2-17: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von 4-Methoxycinnamsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und UV-A-Belichtung

Die Belichtungsbedingungen hatten keinen Einfluß auf Wachstumsgeschwindigkeit und -verhalten des Pilzes. Unterschiedliche Metabolitenkonzentrationen resultierten somit nicht aus einer unterschiedlichen Zelldichte der Kulturen.

Während in dunkel geführten Kulturen generell eine höhere Produktbildung zu verzeichnen war, wurde durch Belichtung offensichtlich die Bildung des 4-Methoxycinnamsäuremethylesters deutlich positiv beeinflusst. Besonders auffällig war die rapide Konzentrationszunahme nach dem 19. Kulturtag (Abbildung 2-17) von 6 auf 20 mg L⁻¹.

Kam es gegen Ende der Kultivierungsperiode zu einer Konzentrationsabnahme, konnte auf eine weitere Metabolisierung der Substanzen geschlossen werden. Ausnahmen bildeten hier p-Anissäure- und Isovanillinsäuremethylester, die bis zum Ende des Kultivierungszeitraumes stetig akkumuliert wurden.

2.2.3.5 Variation des Lichtspektrums

Durch die Variation des Lichtspektrums bei der Belichtung sollte untersucht werden, ob die beobachteten Effekte auf UV-A-Licht beschränkt waren. Die bis dahin eingesetzten UV-A-Röhren (Emissionsmaximum bei 350 nm) wurden gegen „Fluora“-Pflanzenlampen ausgetauscht, die verstärkt im Blau- und Rotbereich emittieren (Emissionsmaxima bei 450 und 660 nm). UV-Strahlung wird bei diesem Leuchtstoffröhrentyp nicht emittiert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden beide Lampentypen kombiniert und damit ein dem Tageslicht nachempfundenes Lichtspektrum geschaffen. Sogenannte Tageslichtlampen kamen nicht zum Einsatz, da diese nicht im UV-Bereich emittieren.

Belichtung mit einer „Fluora“-Pflanzenleuchte

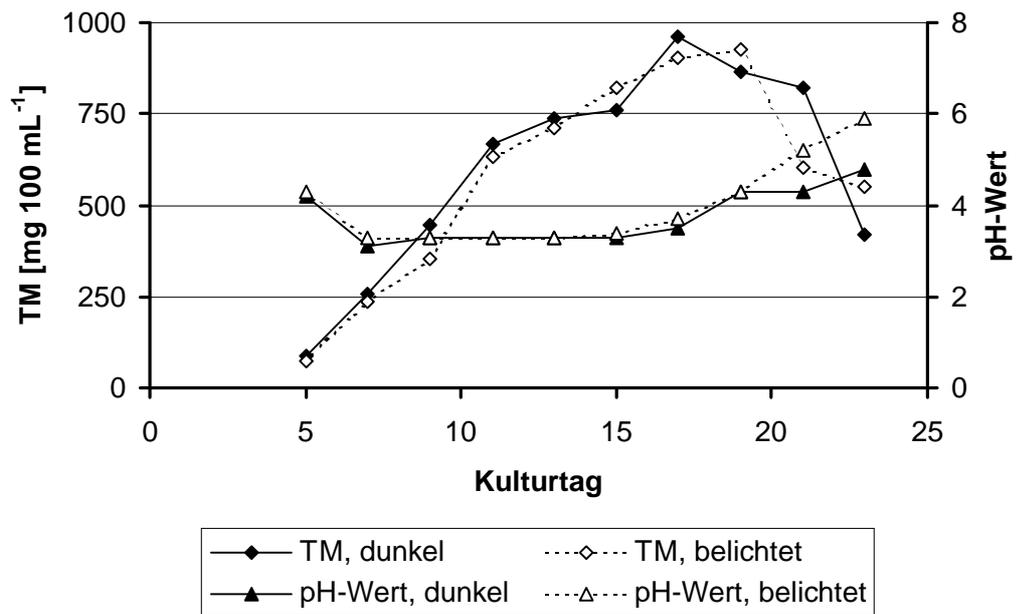


Abbildung 2-18: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Entwicklung von Biotrockenmasse und pH-Wert im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtabschluß und „Fluora“-Belichtung

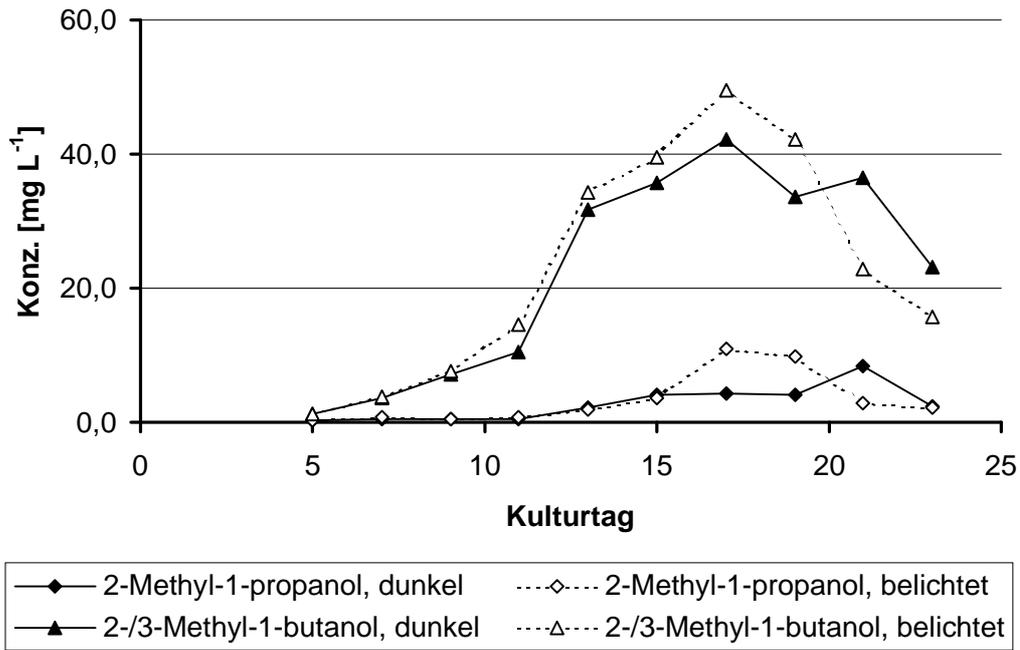


Abbildung 2-19: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung verzweigter aliphatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung

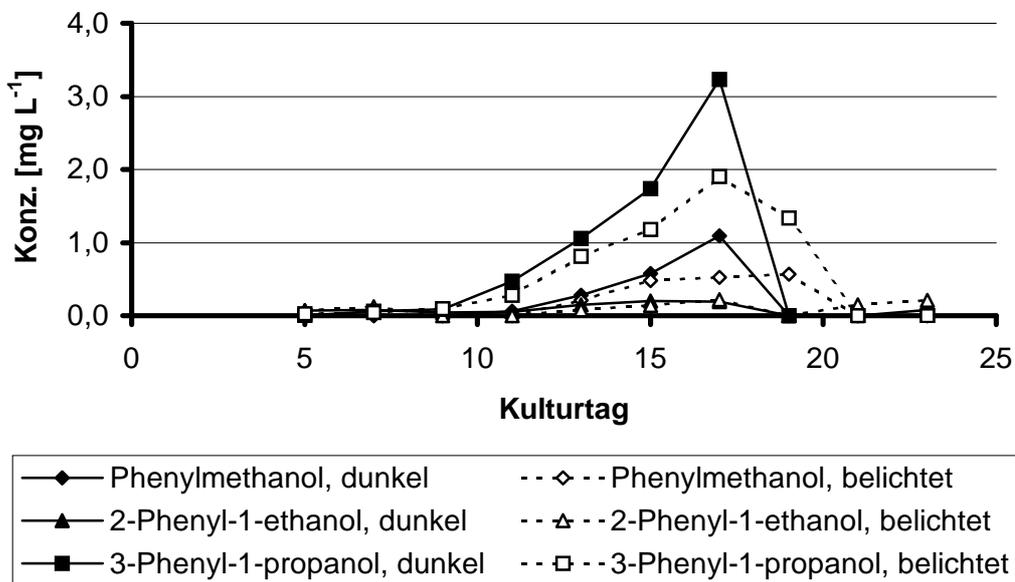


Abbildung 2-20: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung aromatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung

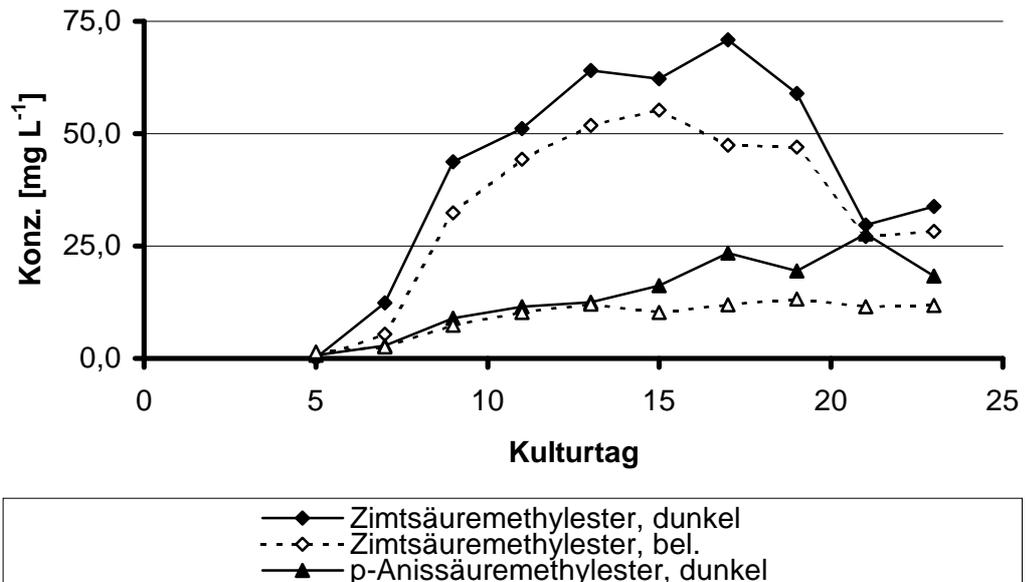


Abbildung 2-21: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Zimt- und p-Anissäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung

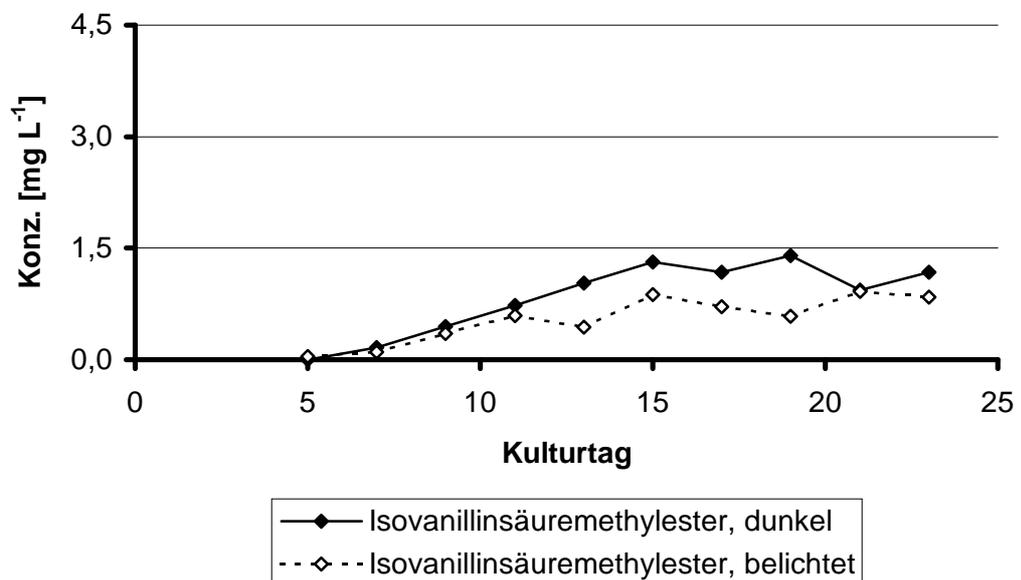


Abbildung 2-22: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Isovanillinsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung

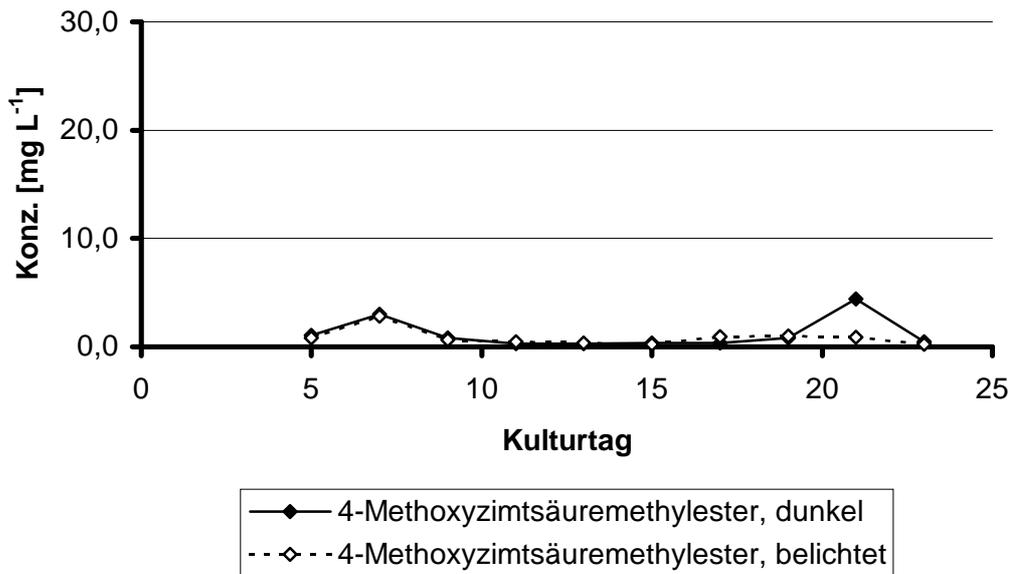


Abbildung 2-23: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von 4-Methoxycinnic acid methyl ester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und „Fluora“-Belichtung

In belichteten sowie dunkel geführten Kulturen nahmen die Konzentrationen der beobachteten Metabolite den gleichen Verlauf. Ähnlich wie bei der UV-A-Belichtung (2.2.3.4, S. 57) wurden in der Regel im Medium unbelichteter Kulturen etwas höhere Werte ermittelt. Während dort jedoch die Konzentration des 4-Methoxycinnic acid methyl esters erheblich über der in unbelichteten Kulturen bestimmten lag (Abbildung 2-17, S. 62), resultierte die Belichtung mit der „Fluora“-Leuchte nicht in einer Steigerung. Der selbst bei dunkel geführten Kulturen zu beobachtende Anstieg gegen Ende der Kultivierungsperiode blieb aus (Abbildung 2-23).

Unterschiedliche Medienkonzentrationen waren nicht die Folge unterschiedlicher Zelldichten. Unter den verschiedenen Belichtungsbedingungen zeigten die Kulturen von *L. lepideus* das gleiche Wachstumsverhalten (Abbildung 2-18).

Belichtung mit einer Kombination aus UV-A- und „Fluora“-Leuchten

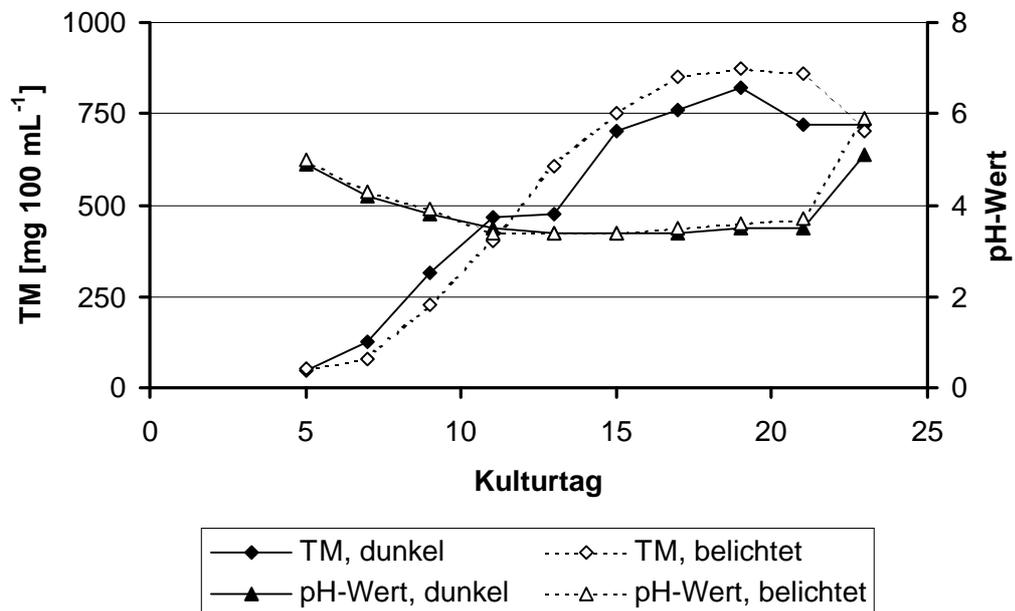


Abbildung 2-24: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Entwicklung von Biotrockenmasse und pH-Wert im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht

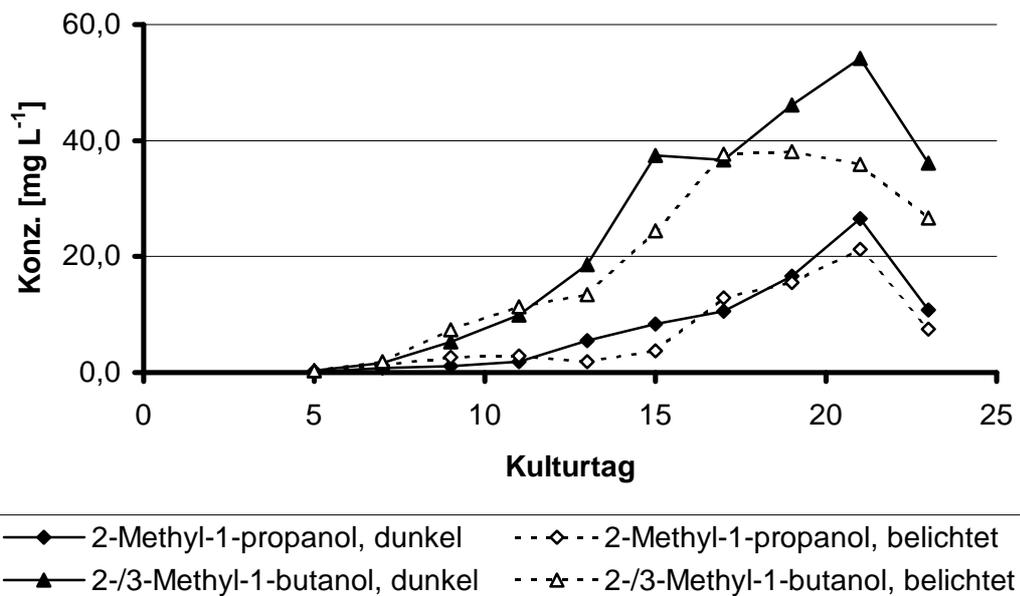


Abbildung 2-25: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung verzweigter aliphatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht

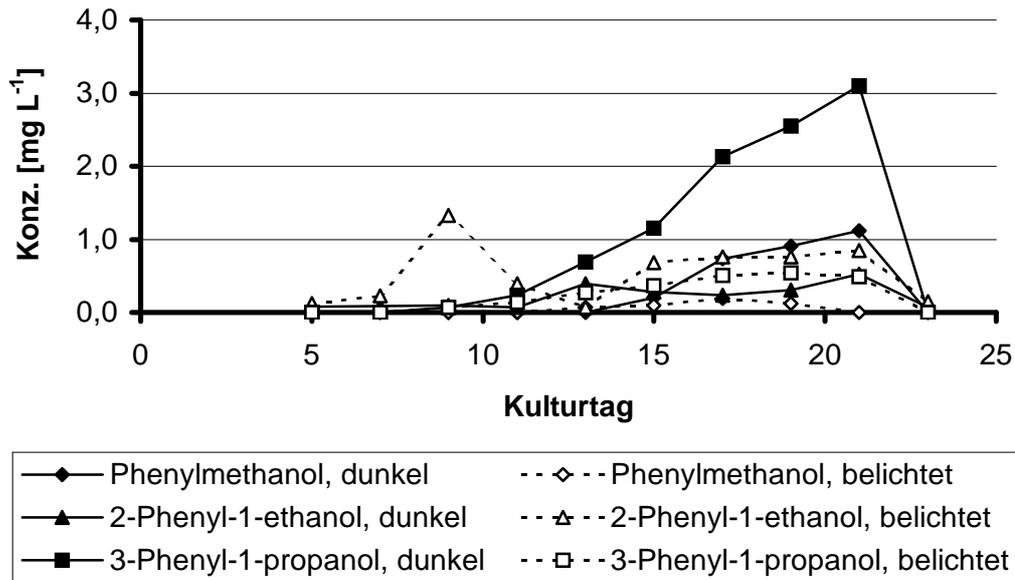


Abbildung 2-26: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung aromatischer Alkohole im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht

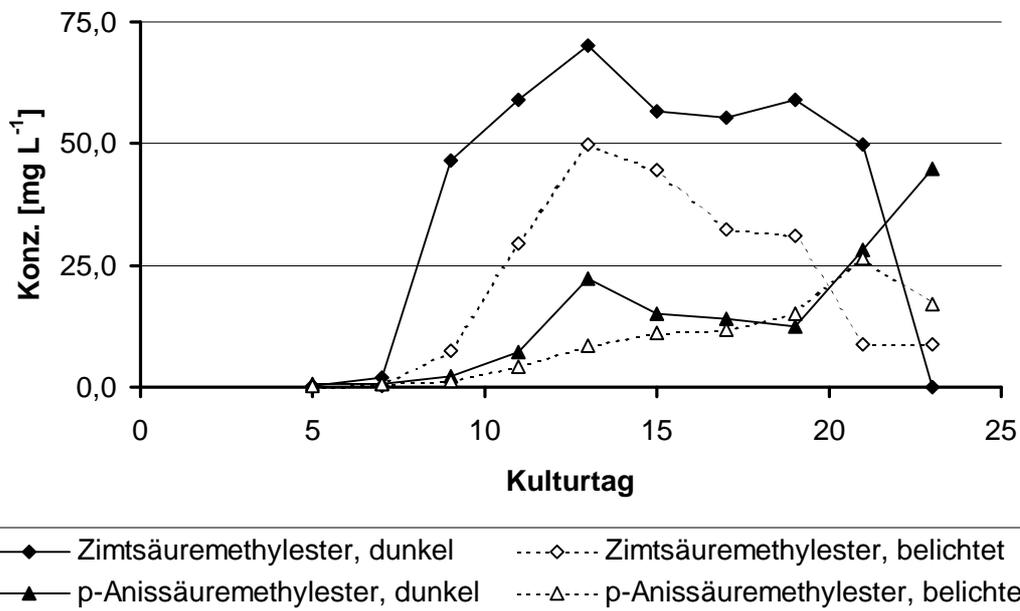


Abbildung 2-27: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Zimt- und p-Anissäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht

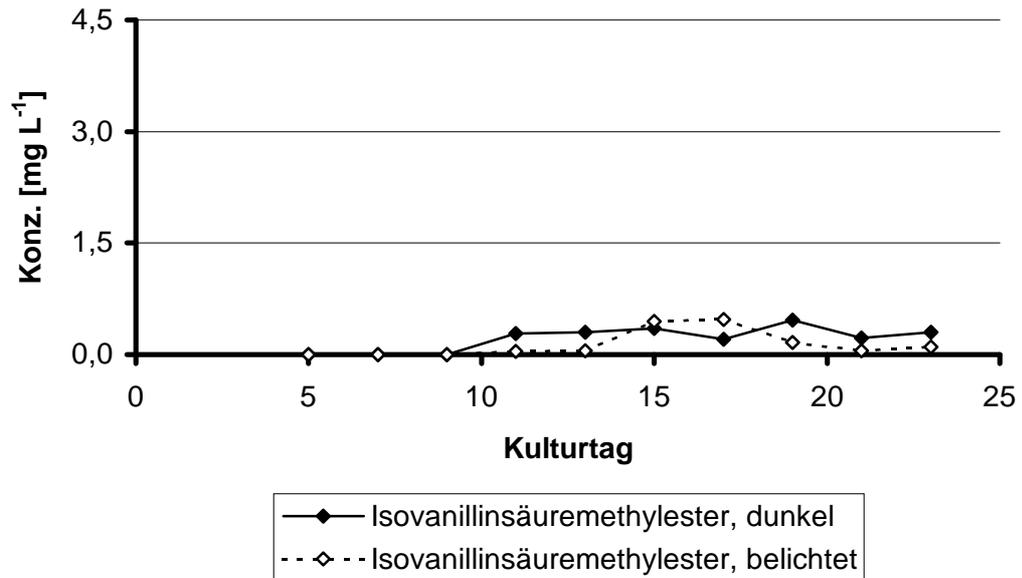


Abbildung 2-28: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von Isovanillinsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht

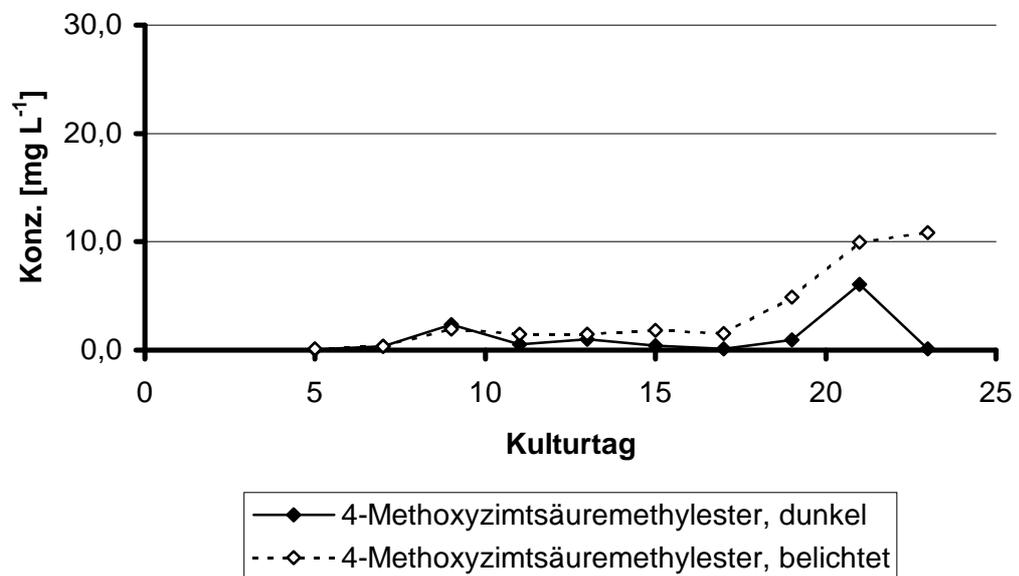


Abbildung 2-29: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Konzentrationsveränderung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester im Kulturverlauf. Kultivierung unter Lichtausschluß und Belichtung mit künstlichem Tageslicht

Die Ausweitung des Lichtspektrums hatte keinen Einfluß auf Biomassebildung und Wachstumsverhalten des Pilzes (Abbildung 2-24). Die belichteten Kulturen zeigten das

gleiche Erscheinungsbild wie in Dunkelheit geführte Kulturen. Wie schon in den vorausgegangenen Versuchsreihen (Belichtung mit UV-A- bzw. „Fluora“-Leuchten) wurden in den dunkel geführten Kulturen höhere Metabolitenkonzentrationen gemessen. Die Ausnahme stellte 4-Methoxyzimtsäuremethylester dar (Abbildung 2-29). Wie schon bei alleiniger UV-A-Belichtung lag das Konzentrationsniveau über dem ohne Belichtung der Kulturen. Der Konzentrationsverlauf war ähnlich, jedoch waren die dort gemessenen Werte um den Faktor 2 höher (Abbildung 2-17).

2.2.3.6 Bestimmung freier aromatischer Säuren im Medium

In den Kulturextrakten von *L. lepidus* wurden aromatische Säuren ausschließlich als Methyl- und Ethylester detektiert. Es sollte geklärt werden, ob mit der Genese von 4-Methoxyzimtsäure- und Isovanillinsäuremethylester assoziierte Säuren gleichermaßen in nicht-veresterter Form im Medium auftreten. Es wurde eine HPLC-Methode zur Trennung ausgewählter aromatischer Säuren entwickelt. Als Referenzsubstanzen wurden die folgenden Säuren eingesetzt: p-Anissäure, p-Cumarsäure, Isoferulasäure, Isovanillinsäure, Kaffeesäure, p-Methoxyzimtsäure, Zimtsäure.

Die Kulturen von *L. lepidus* wurden in SNL-Hefe angesetzt und sowohl in Dunkelheit als auch unter UV-A-Belichtung (14 h d⁻¹) inkubiert. Die Probenahme erfolgte 48stündlich. Partikel wurden durch Zentrifugation entfernt.

Zu keinem Zeitpunkt der Kultivierungsperiode wurden in den dunkel bzw. belichtet geführten Kulturen freie aromatische Säuren in detektierbaren Konzentrationen festgestellt.

2.2.3.7 Enzymatische Untersuchungen zur Synthese von 4-Methoxyzimtsäuremethylester

An der Bildung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester aus L-Phenylalanin sind nach OHTA UND SHIMADA [1991] 4 Enzyme beteiligt. Während die Desaminierung durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) nicht auf Cofaktoren angewiesen ist, sind alle weiteren Schritte cofaktorabhängig. Die O-Methyltransferasen 1 und 2 (OMT 1 und 2) benötigen S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppdonor, die Hydroxylierung in 4-Stellung (4-Hydr.) wird nur bei Zusatz von FAD und NADPH katalysiert (Abbildung 2-30).

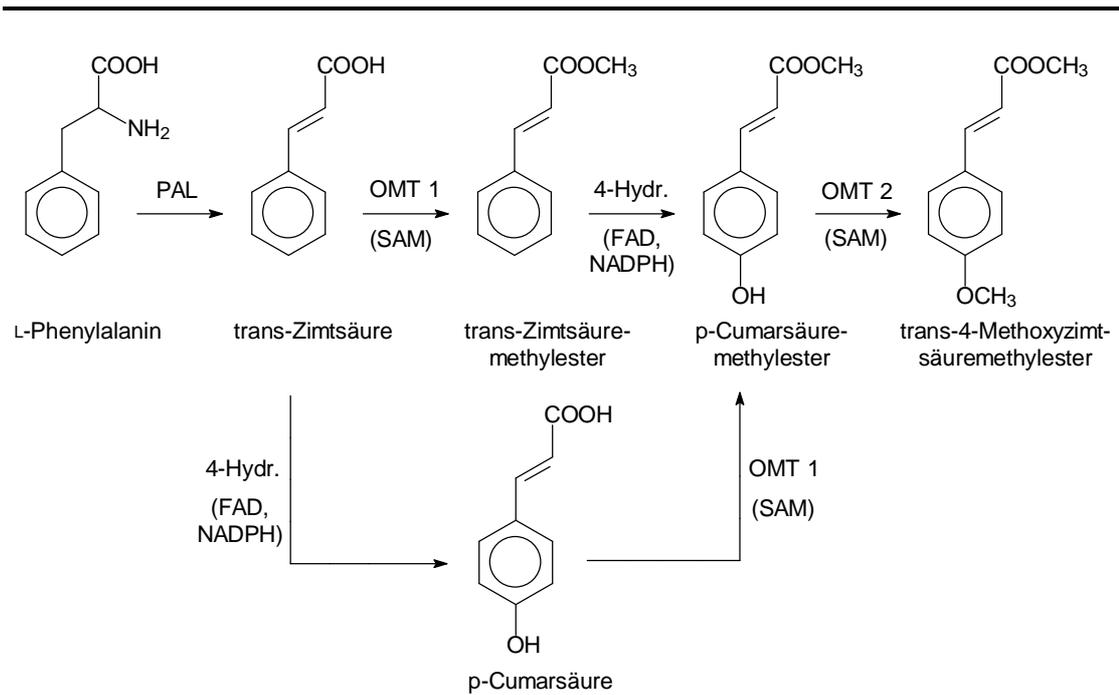


Abbildung 2-30: Biosynthese des trans-4-Methoxyzimtsäuremethylesters durch *Lentinus lepideus* [nach OHTA ET AL., 1991]

Supplementation einzelner Syntheseschritte bei Belichtung mit „Fluora“-Licht

Die Belichtung von *L. lepideus* mit der im Blau- und Rotbereich emittierenden „Fluora“-Leuchte hatte Konzentrationen des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters im Spurenbereich zur Folge (Abbildung 2-23). Kultivierung in Dunkelheit führte zu ebenfalls nur geringen Mengen, jedoch war wie bei UV-A-Belichtung (Abbildung 2-17) auch hier ein deutlicher Anstieg zu Anfang und am Ende der Kultivierungsperiode auf bis zu 6 mg L^{-1} zu verzeichnen (Abbildung 2-17, Abbildung 2-23, Abbildung 2-29).

Die Ergebnisse legten nahe, daß das Licht der „Fluora“-Leuchte negativ auf die Aktivität eines oder mehrere Enzyme wirkte. Trans-Zimtsäuremethylester wurde in hohen Konzentrationen gebildet (Abbildung 2-21). Dies deutete darauf hin, daß die Hydroxylierung in 4-Stellung betroffen war. Durch den Zusatz von p-Cumarsäure bzw. ihres Methylesters sowie L-Tyrosin in das Kulturmedium wurden Substrate angeboten, die bereits in 4-Stellung hydroxyliert sind. Somit bestand die Möglichkeit, den gehemmten Reaktionsschritt zu supplementieren.

Die Substanzen wurden am 3. Kulturtag appliziert, so daß die Medienkonzentrationen für p-Cumarsäure und ihren Methylester jeweils $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ und die von L-Tyrosin 5 mmol L^{-1} betragen. Die Ansätze wurden sowohl unter Lichtausschluß als auch unter Belichtung mit „Fluora“-Licht inkubiert. Kontrollansätze ohne entsprechende Zusätze wurden mitgeführt. Jeden dritten Tag wurde jeweils eine gesamte Kultur für die Analyse auf-

gearbeitet. Die Konzentrationsänderung von p-Cumarsäure und p-Cumarsäuremethylester wurde mittels HPLC bestimmt.

- **Zusatz von p-Cumarsäuremethylester:** Das Wachstum von *L. lepidus* wurde durch den Ester nahezu gestoppt. Die Biotrockenmasse stieg von 35 mg 100 mL⁻¹ am 5. Kulturtag lediglich um 20 mg 100 mL⁻¹ innerhalb von 9 Tagen. Im Kontrollansatz betrug der Zuwachs etwa 500 mg 100 mL⁻¹. Es wurden keine Unterschiede zwischen dunkel und belichtet geführten Kulturen beobachtet. In keinem der Kulturextrakte wurde 4-Methoxyzimtsäuremethylester detektiert. Die HPLC-Analyse des Mediums ergab keine Abnahme der Konzentration von p-Cumarsäuremethylester.
- **Zusatz von p-Cumarsäure:** Weder bei Belichtung noch in Dunkelheit waren Auswirkungen auf das Wachstum des Pilzes zu verzeichnen. Der Biomassezuwachs lag wie im Kontrollansatz bei etwa 500 mg 100 mL⁻¹ im beobachteten Zeitraum. Auch in bezug auf Farbe und Aussehen der Kulturen kam es nicht zu auffälligen Veränderungen. Die zugesetzte p-Cumarsäure wurde sehr schnell metabolisiert und wurde bereits am 8. Kulturtag nicht mehr im Medium detektiert. In den GC-Untersuchungen war die Entstehung mehrerer bis dahin nicht vom Pilz synthetisierter Substanzen zu erkennen. Mit der Bildung des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters in Zusammenhang stehende Verbindungen wurden nicht detektiert. Die Zielsubstanz selbst wurde ebenfalls nicht gefunden.
- **Zusatz von L-Tyrosin:** Auch der Zusatz von L-Tyrosin hatte keine Folgen für das Wachstumsverhalten von *L. lepidus*. Die Medienkonzentration des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters in den belichteten Kulturen wurde nicht erhöht. Dagegen war die Konzentration des trans-Zimtsäuremethylesters halbiert. Eine verstärkte Bildung von Derivaten des L-Tyrosins war nicht erkennbar.

Es wurde gezeigt, daß die möglicherweise durch die Einwirkung des Lichts der „Fluora“-Pflanzenlampe gehemmte Hydroxylierung in 4-Position des aromatischen Rings nicht durch den Zusatz von p-Cumarsäure, p-Cumarsäuremethylester bzw. L-Tyrosin in das Kulturmedium supplementiert werden konnte.

Bestimmung der Enzymaktivitäten bei UV-A-Belichtung

Die Extraktion der Kulturmedien von *L. lepidus* ließ lediglich den positiven Effekt der UV-A-Belichtung auf die Medienkonzentration des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters erkennen. Der Auslöser dieser Konzentrationssteigerung blieb jedoch unklar, zumal Zwi-

schenprodukte des Metabolismus nur zum Teil detektiert wurden. Durch die Bestimmung der beteiligten Enzymaktivitäten sollte geklärt werden, ob der beobachtete Effekt in einer Regulation dieser Enzyme begründet lag. Die Cofaktorabhängigkeit der Enzyme erlaubte es, nach Zellaufschluß die Enzymaktivitäten der einzelnen Schritte im Rohextrakt zu verfolgen.

Das Produkt der Methylierung von p-Cumarsäure durch OMT 1 (p-Cumarsäuremethylester) wurde nicht festgestellt. Die nachfolgende Methylierung der 4-ständigen OH-Gruppe durch die OMT 2 erfolgt sehr schnell, so daß der p-Cumarsäuremethylester augenblicklich weiter zum 4-Methoxyzimtsäuremethylester umgesetzt wird. Zur Berechnung der OMT 1-Aktivität wurde daher die Konzentration dieses Esters zugrunde gelegt.

Der mechanische Zellaufschluß erfolgte in einem Potter. In Vorversuchen wurde zunächst die Eignung dieses Verfahrens zum Aufschluß der Zellen von *L. lepideus* getestet. Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß bei einer Anwendungsdauer von 10 min ein vollständiger Zellaufschluß erreicht wurde. Bei einer Aufschlußdauer unter 7 min lagen noch zahlreiche intakte Zellen vor. Bei den gewählten Aufschlußparametern (5 g Biofeuchtmasse, 10 mL Puffer) wurden Proteinkonzentrationen von etwa $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ im Rohextrakt erzielt. Die Tendenz im Kulturverlauf war rückläufig. Um gleiche Ausgangsbedingungen in den Enzymassays zu schaffen, wurden die Rohextrakte auf eine Proteinkonzentration von $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ verdünnt.

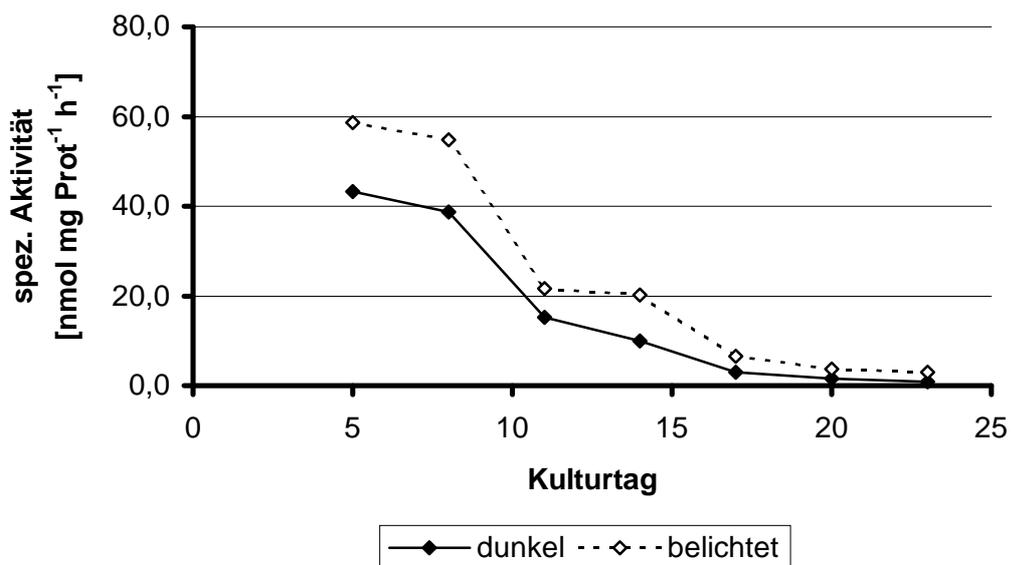


Abbildung 2-31: Aktivität der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase nach Zellaufschluß von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79. Substrat: L-Phenylalanin

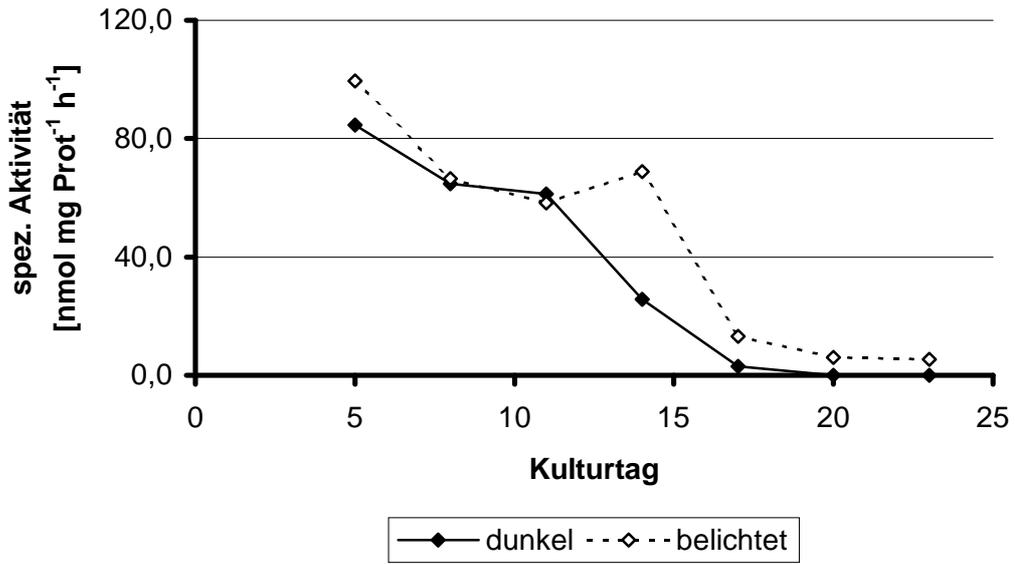


Abbildung 2-32: Aktivität der O-Methyltransferase 1 nach Zellaufschluß von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79. Substrat: trans-Zimtsäure

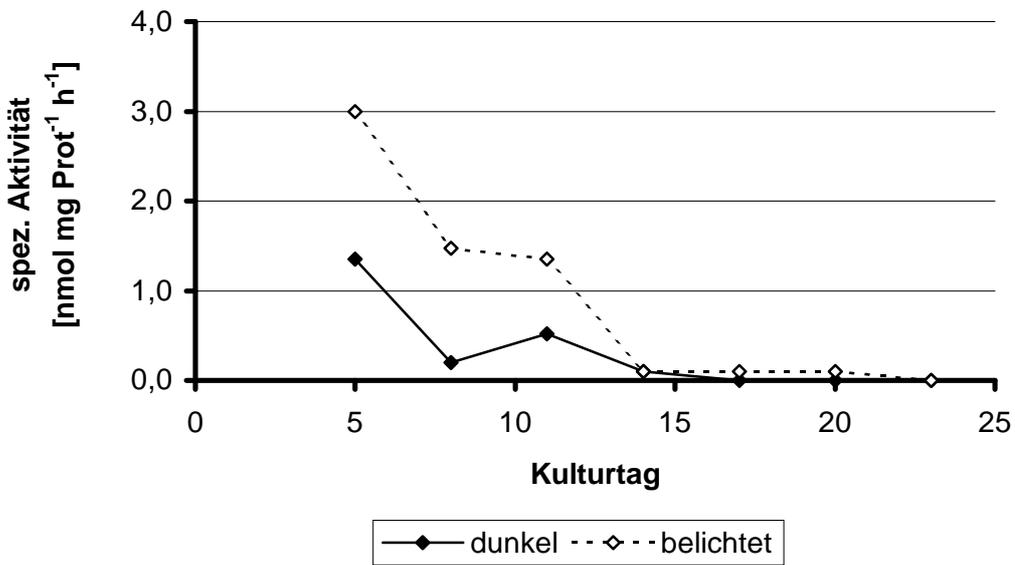


Abbildung 2-33: 4-Hydroxylaseaktivität nach Zellaufschluß von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79. Substrat: trans-Zimtsäuremethylester

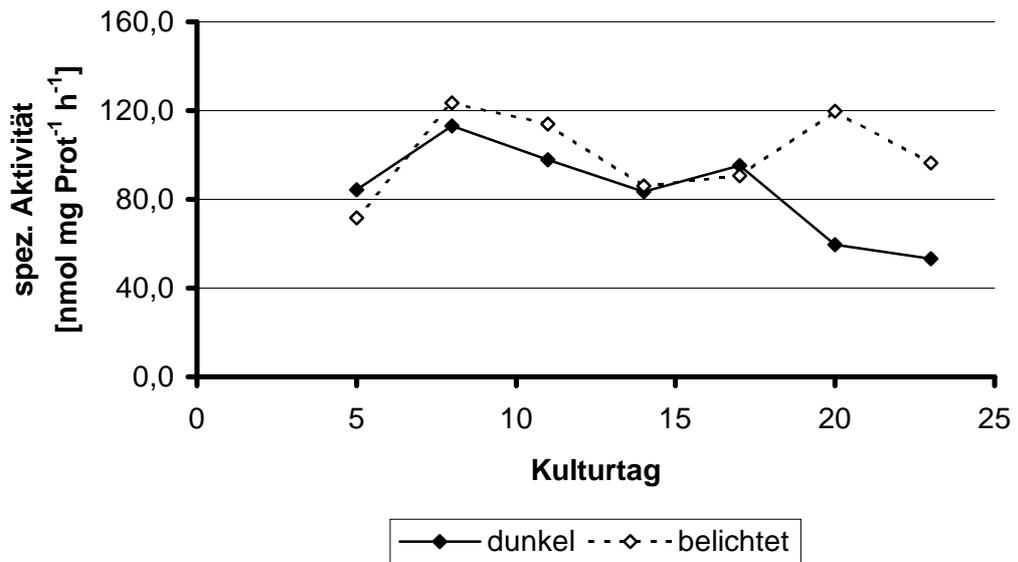


Abbildung 2-34: Aktivität der O-Methyltransferase 2 nach Zellaufschluß von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79. Substrat: p-Cumarsäuremethylester

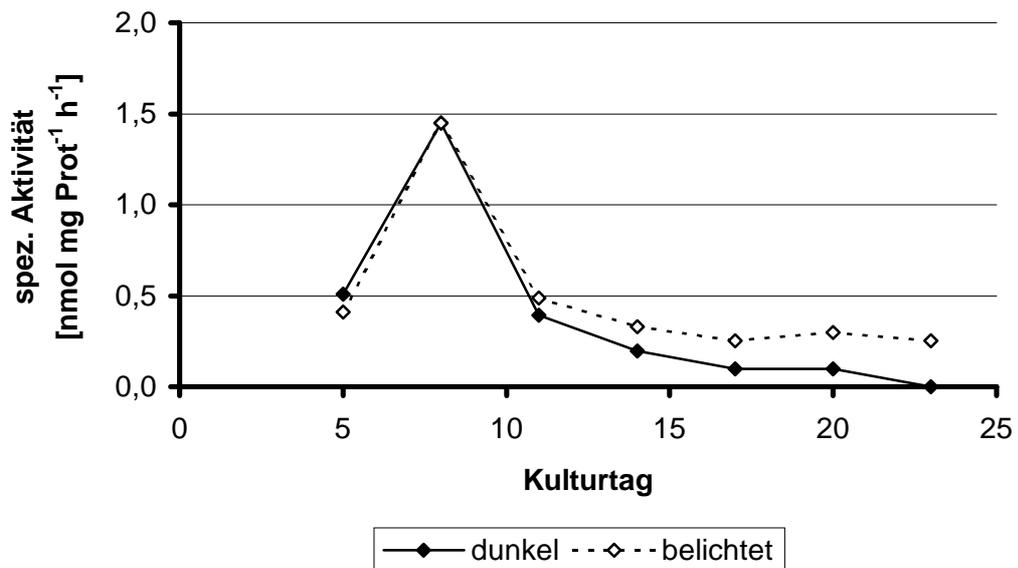


Abbildung 2-35: 4-Hydroxylaseaktivität nach Zellaufschluß von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79. Substrat: trans-Zimtsäure

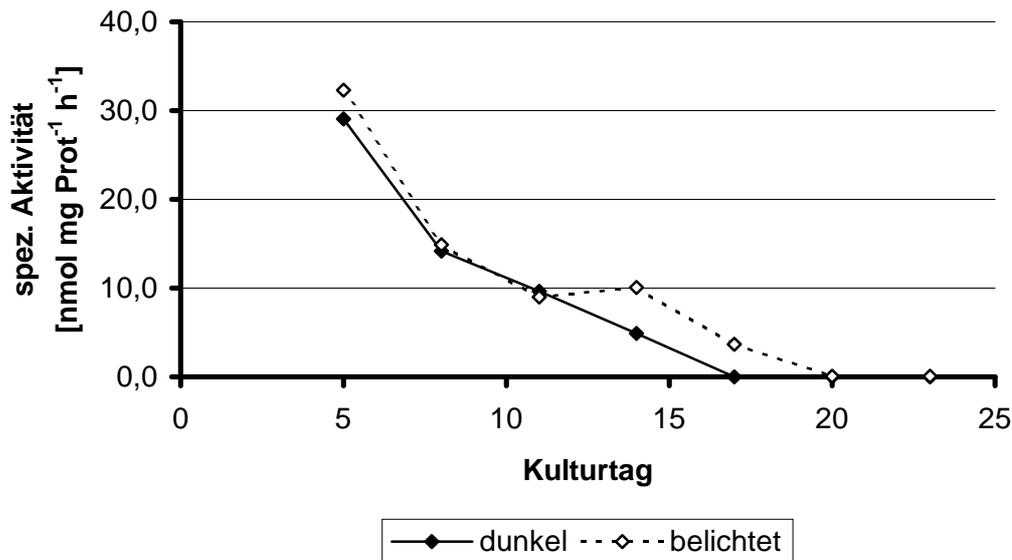


Abbildung 2-36: Aktivität der O-Methyltransferase 1 nach Zellaufschluß von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79. Substrat: p-Cumarsäure

Die Belichtung der Pilzkulturen mit UV-A-Licht führte in der Regel zu einer Erhöhung der spezifischen Enzymaktivitäten in den Zellhomogenaten.

Vom Beginn des Beobachtungszeitraumes an war die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase, des ersten Enzyms der Reaktionskette (Abbildung 2-30), rückläufig. Etwa am 14. Kulturtag war diese Entwicklung kurzfristig etwas abgeschwächt, die Aktivitätsabnahme stagnierte (Abbildung 2-31). Die Beobachtungen standen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer vorangegangenen – auf Biomasse bezogenen – PAL-Aktivitätsbestimmung (vgl. Abbildung 2-9, S. 57).

Einen ähnlichen Verlauf nahm die Aktivität der O-Methyltransferase 1. In den Homogenaten belichteter Kulturen war zwischen dem 11. und 17. Kulturtag sogar kurzfristig ein erneuter Anstieg der Enzymaktivität zu verzeichnen. In unbelichteten Kulturen war der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt. Trans-Zimtsäure wurde von dem Enzym erheblich besser als Substrat akzeptiert als p-Cumarsäure, was sich in dem um Faktor 4 höheren Umsatz widerspiegelte (Abbildung 2-32, Abbildung 2-36).

Die Hydroxylierung des trans-Zimtsäuremethylesters in 4-Stellung folgte dem gleichen Aktivitätsverlauf. Der rasche Rückgang wurde durch kurzzeitige Stagnation zwischen dem 9. und dem 11. Kulturtag unterbrochen. Dieser Effekt trat hier bereits früher ein als bei den oben beschriebenen Aktivitäten. Der beobachtete Umsatz der Hydroxylierung war nur gering (Abbildung 2-33).

Bei Hydroxylierung der trans-Zimtsäure zu p-Cumarsäure war zunächst eine Aktivitätssteigerung bis zum 7. Kulturtag zu verzeichnen. Nach raschem Rückgang stabilisierte sich

die Enzymaktivität auf einem niedrigem Niveau, das in belichteten Kulturen etwa doppelt so hoch war wie in unbelichteten (Abbildung 2-35). Dieser Aktivitätsverlauf gab Grund zur Annahme, daß die Hydroxylierung von trans-Zimtsäure und trans-Zimtsäuremethylester durch verschiedene Enzyme katalysiert wurde.

Auch bei der abschließenden Methylierung der 4-ständigen Hydroxygruppe der p-Cumar-säure war zunächst bis zum 7. Kulturtag ein Anstieg der Enzymaktivität zu beobachten. Nach einem zwischenzeitlichen leichten Rückgang setzte zwischen dem 14. und 17. Kulturtag eine erneute Aktivitätssteigerung ein. In dunkel geführten Kulturen war sie von kurzer Dauer, die Aktivitätskurve fiel nach einem Nebenmaximum weiter ab. UV-A-Belichtung hatte ein zweites Maximum am 20. Kulturtag auf dem Aktivitätsniveau des ersten Maximums zur Folge. Der Umsatz der O-Methyltransferase 2 war bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes vergleichsweise hoch (Abbildung 2-34). Der Aktivitätsverlauf dieses Enzyms stimmte mit dem Konzentrationsverlauf des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters im Medium überein (Abbildung 2-17, S. 62 und Abbildung 2-29).

2.2.3.8 Teilzusammenfassung 2.2.3

- Bei unbeeinflussten Wachstumseigenschaften wurden in belichteten Kulturen mit Ausnahme des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters meist geringere Metabolitenkonzentrationen im Medium als in dunkel geführten Kulturen festgestellt. Dies war sowohl bei UV-A-Belichtung als auch bei Belichtung mit einer verstärkt im Blau- und Rotbereich emittierenden Pflanzenleuchte zu beobachten.
- Der abweichende Effekt bezüglich des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters war augenfällig. Die Medienkonzentration erreichte bei UV-A-Belichtung bis zu 20 mg L^{-1} , während in dunkel geführten Kulturen der Maximalwert bei 6 mg L^{-1} lag. Belichtung mit einer Pflanzenleuchte hatte die geringsten Konzentrationen zur Folge.
- UV-A-Licht wirkte stimulierend auf die Enzymaktivitäten des Syntheseweges von L-Phenylalanin zu 4-Methoxyzimtsäuremethylester, insbesondere auf die O-Methyltransferasen.

2.3 Einflußnahme auf Wachstumsrate und Aromabildung

Während des Screenings von 30 filamentösen Pilzen (2.1, S. 4 ff) fielen mehrere Stämme durch ihre geringe Wachstumsgeschwindigkeit auf. Die langen Kultivierungszeiten beschränkten ihre Eignung als Untersuchungsobjekte. Auch schneller wachsende Pilze brachten nur in Einzelfällen die sensorischen Eigenschaften hervor, die in der Literatur für die Fruchtkörper beschrieben werden. Geeignete Medienzusätze sollten das Wachstum stimulieren und damit auch die langsam wachsenden Pilze für weitere Untersuchungen zugänglich machen. Ferner sollte die Bildung der typischen Aromastoffe induziert werden.

2.3.1 Zusatz von Phytoeffektoren

Der Effekt verschiedener, standardmäßig in Pflanzenzellkulturen eingesetzter Phytoeffektoren auf submers kultivierte Pilze wurde untersucht. Die Kultivierungen wurden bei Umgebungslicht in vollsynthetischer SNL-B₁ durchgeführt. Der Zusatz erfolgte 24 h nach Inokulation. Nach 14tägiger Inkubation wurden die Resultate im Vergleich zu entsprechenden Kontrollansätzen beurteilt.

Als Testorganismen wurden die folgenden Pilze gewählt:

1. *Clitocybe odora*, CBS 131.44. Die Wachstumsrate war moderat (Kulturdauer: 20 Tage), der schwache, uncharakteristische Geruchseindruck wich vom beschriebenen kräftigen Anisaroma des Fruchtkörpers ab (vgl. 2.1.6, S. 10).
2. *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68. Der Pilz wuchs langsam (Kulturdauer: 30 Tage). Der Geruch der Submerskultur war schwach und uncharakteristisch, während für den Fruchtkörper ein kampherartiges Aroma beschrieben wird (vgl. 2.1.15, S. 18).
3. *Marasmius scorodonius*, CBS 850.87. Der in Submerskultur langsam wachsende Pilz (Kulturdauer >30 Tage) bildete nicht den beschriebenen charakteristischen Knoblauchgeruch des Fruchtkörpers aus (vgl. 2.1.23, S. 26).

2.3.1.1 Polyamine

Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin wurden den Kulturen zunächst kombiniert in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 mmol L⁻¹ aus wässriger Stammlösung zugesetzt.

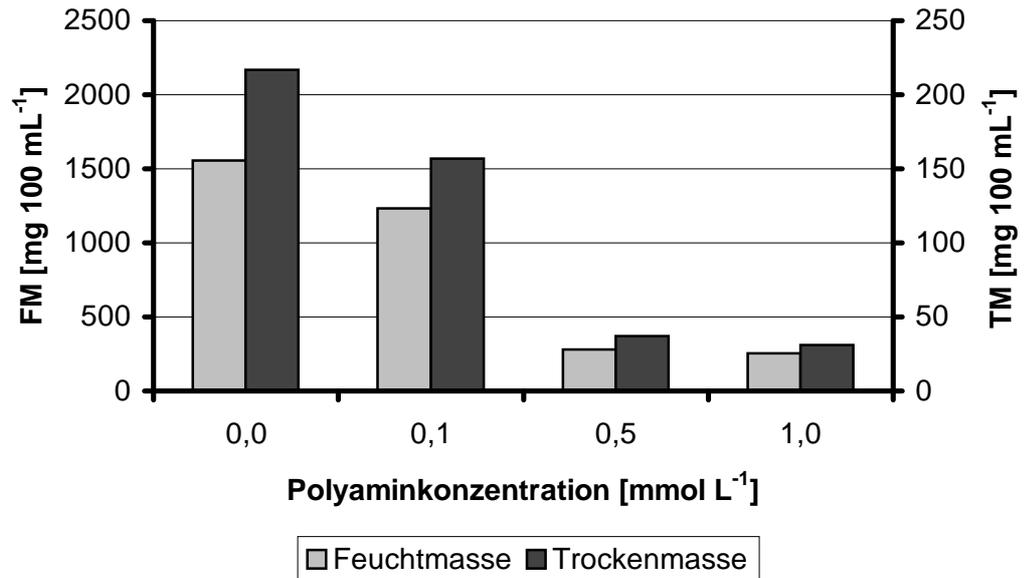


Abbildung 2-37: *Clitocybe odora*, CBS 131.44: Effekt kombinierter Polyamine in äquimolaren Konzentrationen auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

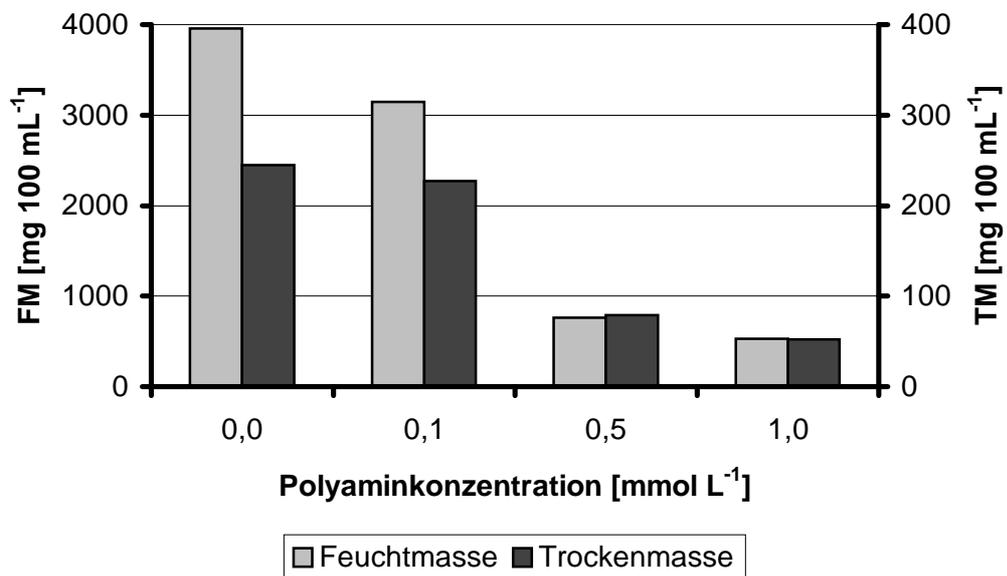


Abbildung 2-38: *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68: Effekt kombinierter Polyamine in äquimolaren Konzentrationen auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

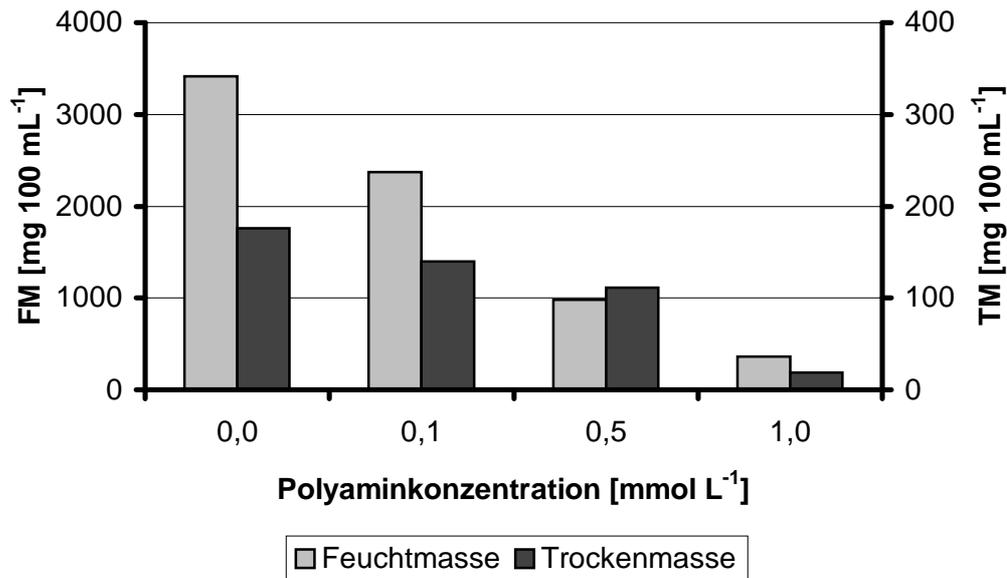


Abbildung 2-39: *Marasmius scorodonius*, CBS 850.87: Effekt kombinierter Polyamine in äquimolaren Konzentrationen auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

Die Polyamine wirkten sich in Kombination hemmend auf das Wachstum der drei Teststämme aus. Eine deutliche Dosisabhängigkeit wurde erkennbar.

Auf die sensorischen Eigenschaften der Pilze hatte der Zusatz der Polyamine keine Auswirkungen. In keiner Kultur konnte ein Unterschied zum jeweiligen Kontrollansatz ohne Polyaminzusatz festgestellt werden.

Sowohl makroskopisch wie auch mikroskopisch wurden keine morphologischen Veränderungen beobachtet.

Die Wirkung der Polyamine wurde in Konzentrationen von jeweils 0,3 mmol L⁻¹ separat untersucht, um eventuelle Einzeleffekte zu erfassen.

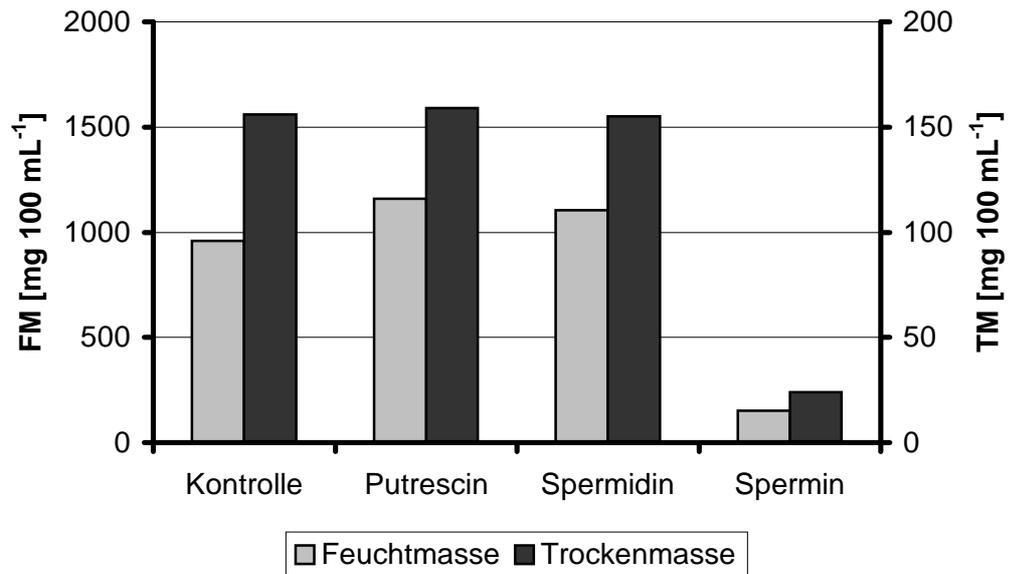


Abbildung 2-40: *Clitocybe odora*, CBS 131.44: Einzeleffekte von Polyaminen in einer Konzentration von $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

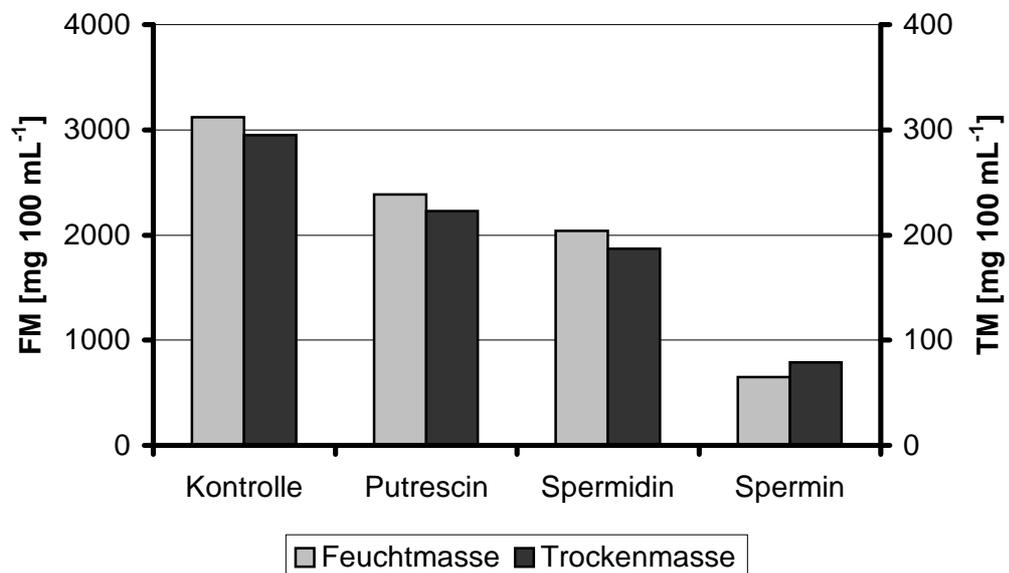


Abbildung 2-41: *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68: Einzeleffekte von Polyaminen in einer Konzentration von $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

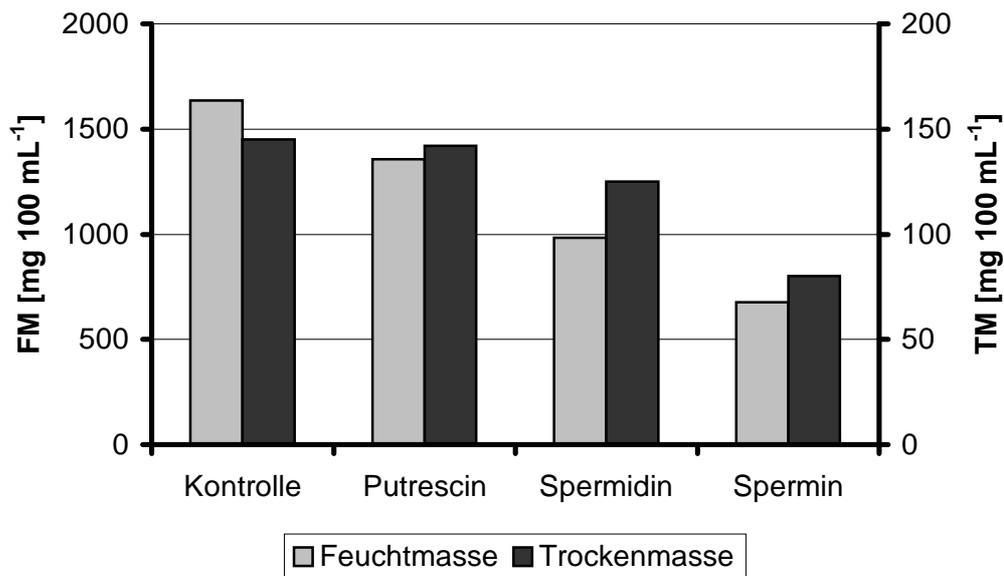


Abbildung 2-42: *Marasmius scorodonius*, CBS 850.87: Einzeleffekte von Polyaminen in einer Konzentration von $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

Der Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Wirkung der Polyamine wurde ersichtlich. Während Putrescin als kleinstes Molekül geringe bzw. keine Auswirkungen auf das Wachstum der Pilze hatte, hemmte Spermin bei den drei Teststämmen das Wachstum stark.

Wie bereits bei der Kombination der Polyamine wurden keine positiven Auswirkungen bezüglich der sensorischen Eigenschaften der drei Pilze festgestellt. Zu keinem Zeitpunkt des Kultivierungszeitraumes unterschieden sich die Geruchseindrücke der Testkulturen von denen der jeweiligen Kontrollansätzen ohne Zusätze.

2.3.1.2 Cytokinine und Auxine

In Submerskulturen der drei Teststämme wurden die Wirkungen des Cytokinins Kinetin und des Auxins Indoleessigsäure untersucht. Aufgrund des synergistischen Effekts in Pflanzenzellkulturen wurden die Substanzen in Kombination eingesetzt.

Zunächst wurden die Phytohormone in gleichen Konzentrationsverhältnissen (m/m) im Bereich von $0,1\text{-}1,0 \text{ mg L}^{-1}$ aus wässriger Stammlösung zugesetzt.

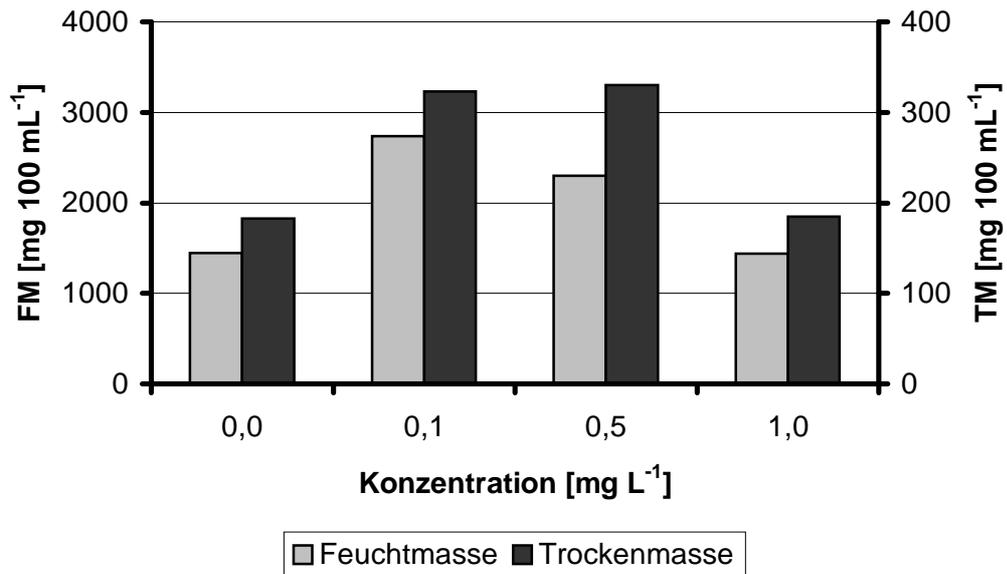


Abbildung 2-43: *Clitocybe odora*, CBS 131.44: Effekt von Kinetin und Indoleessigsäure im Konzentrationsverhältnis 1:1 (m/m) auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

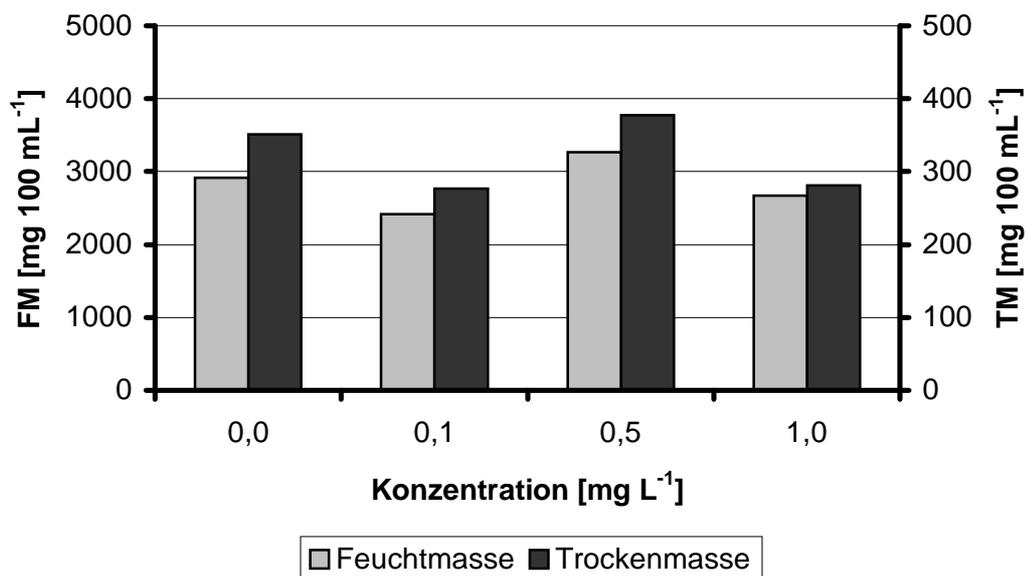


Abbildung 2-44: *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68: Effekt von Kinetin und Indoleessigsäure im Konzentrationsverhältnis 1:1 (m/m) auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

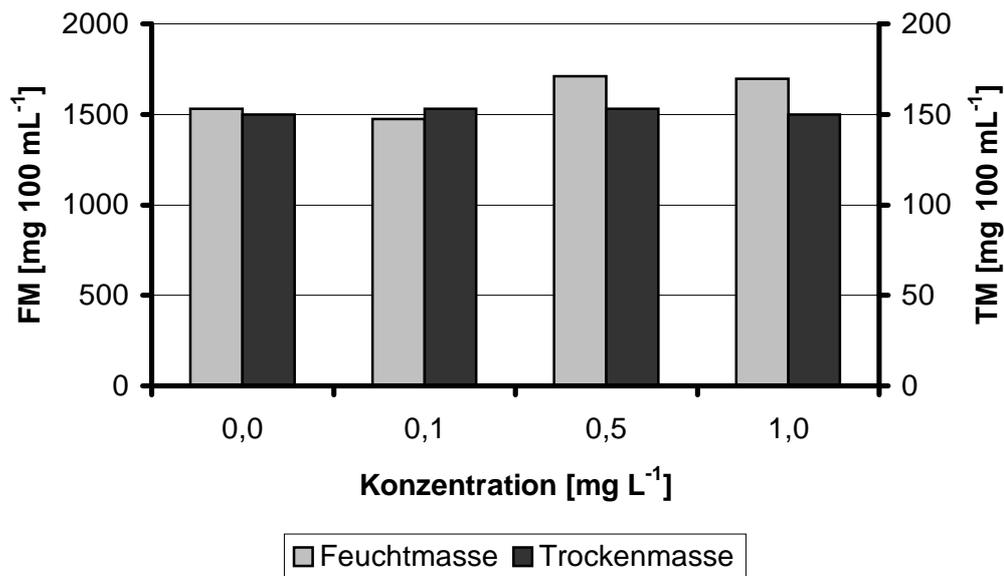


Abbildung 2-45: *Marasmius scorodonius*, CBS 850.87: Effekt von Kinetin und Indoleessigsäure im Konzentrationsverhältnis 1:1 (m/m) auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

Bei keinem der Teststämme wurde durch die Applikation der Phytohormone eine Veränderung der sensorischen Eigenschaften ausgelöst. Weder makroskopisch noch mikroskopisch wurden morphologische Unterschiede festgestellt.

Der Zusatz von Kinetin und Indoleessigsäure zu Submerskulturen von *H. odoratus* und *M. scorodonius* hatte geringe bzw. keine Auswirkungen auf die Bildung von Biomasse. Bei *C. odora* dagegen stimulierte der Zusatz der Phytoeffektoren in Konzentrationen von jeweils 0,1 bzw. 0,5 mg L⁻¹ das vegetative Wachstum. Die Biomasse wurde nahezu verdoppelt (Abbildung 2-43). Eine weitere Konzentrationserhöhung machte deutlich, daß die Wirksamkeit auf einen engen Konzentrationsbereich beschränkt ist.

Aufgrund des deutlichen positiven Effekts wurden an diesem Pilz weitere Untersuchungen durchgeführt. Den Kulturen wurden Kinetin und Indoleessigsäure in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (m/m) in einem Bereich von 0,1-1,0 mg L⁻¹ zugesetzt (Abbildung 2-46). Ein stimulierender Effekt auf das Pilzwachstum (Steigerung bis zu 30%) wurde in den Ansätzen deutlich, zu denen Kinetin in einer Konzentration von 0,5 mg L⁻¹ sowie Indoleessigsäure in Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,5 mg L⁻¹ zugesetzt wurden. Auch die Kombination Kinetin/Indoleessigsäure 0,1/0,5 mg L⁻¹ führte zu einer 30%igen Wachstumssteigerung. Auswirkungen auf sensorische und morphologische Eigenschaften blieben aus. Bei keiner Dosierung wurden Hemmeffekte beobachtet. Das Verhältnis von Trockenmasse zu Feuchtmasse war konstant und lag in allen Ansätzen bei 1:6 (m/m).

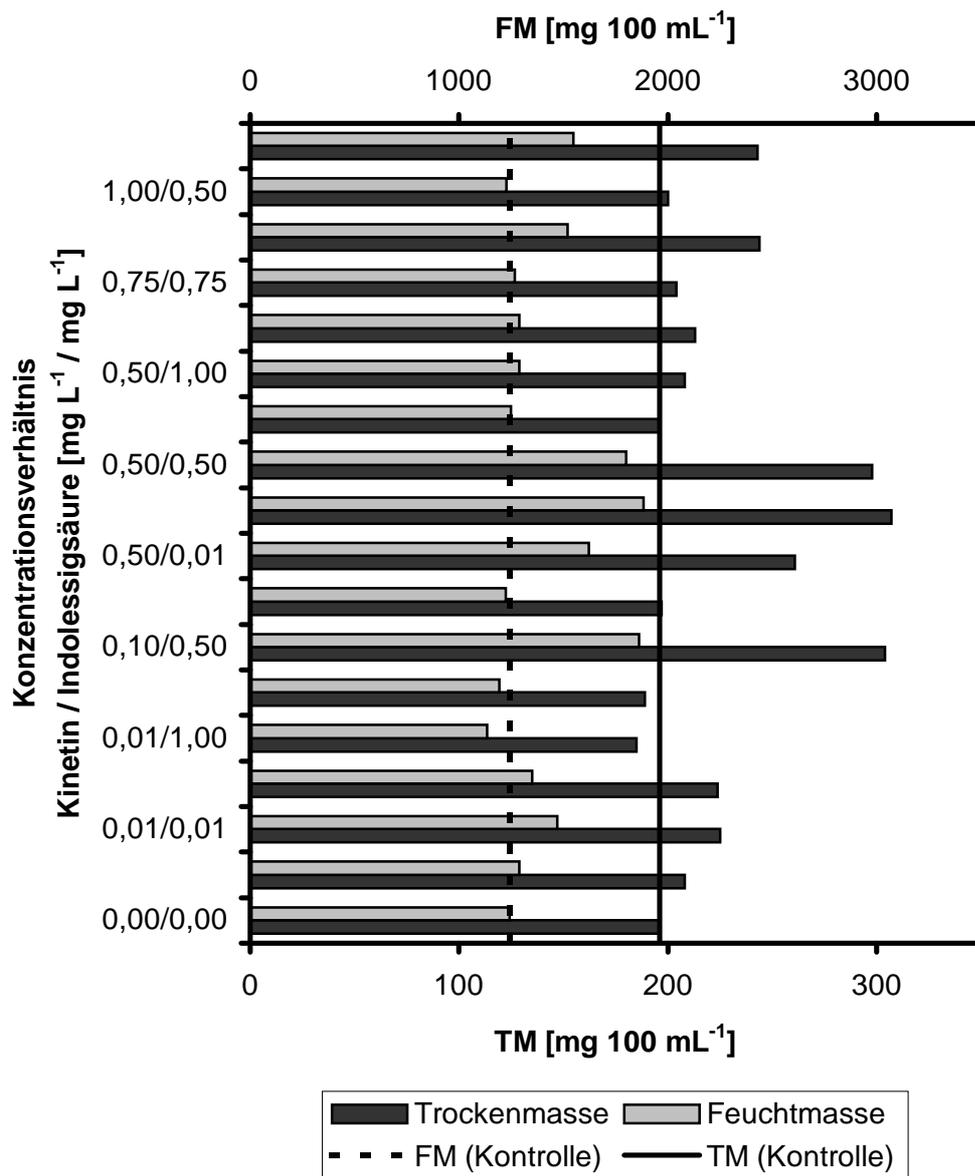


Abbildung 2-46: *Clitocybe odora*, CBS 131.44: Effekt von Kinetin und Indoleessigsäure in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen (m/m) auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

2.3.1.3 Brassinosteroide

Das Brassinosteroid 24-Epibrassinolid wurde den Pilzkulturen im Konzentrationsbereich von 1,0-100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ aus wässriger Stammlösung zugesetzt.

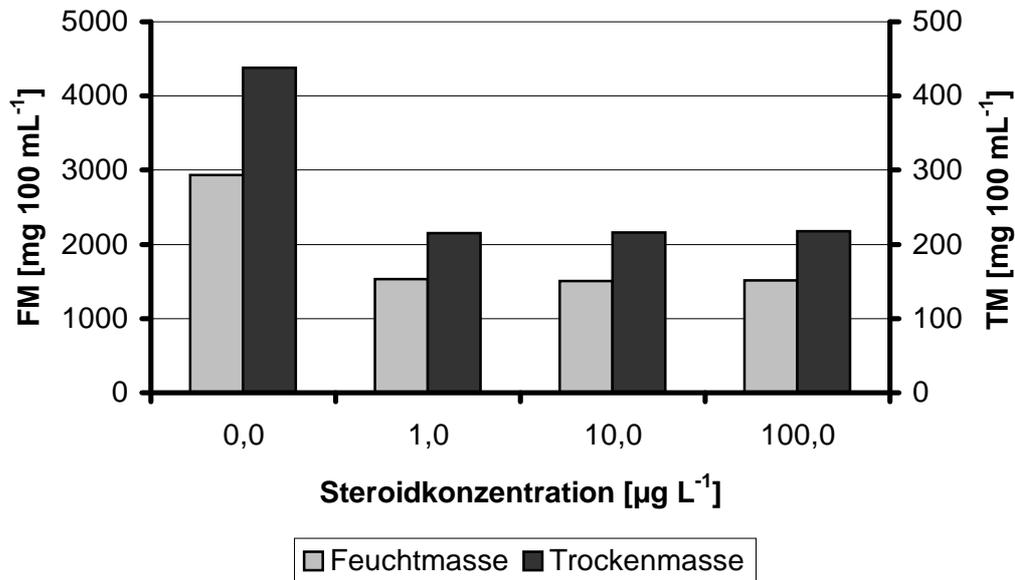


Abbildung 2-47: *Clitocybe odora*, CBS 131.44: Effekt von 24-Epibrassinolid auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

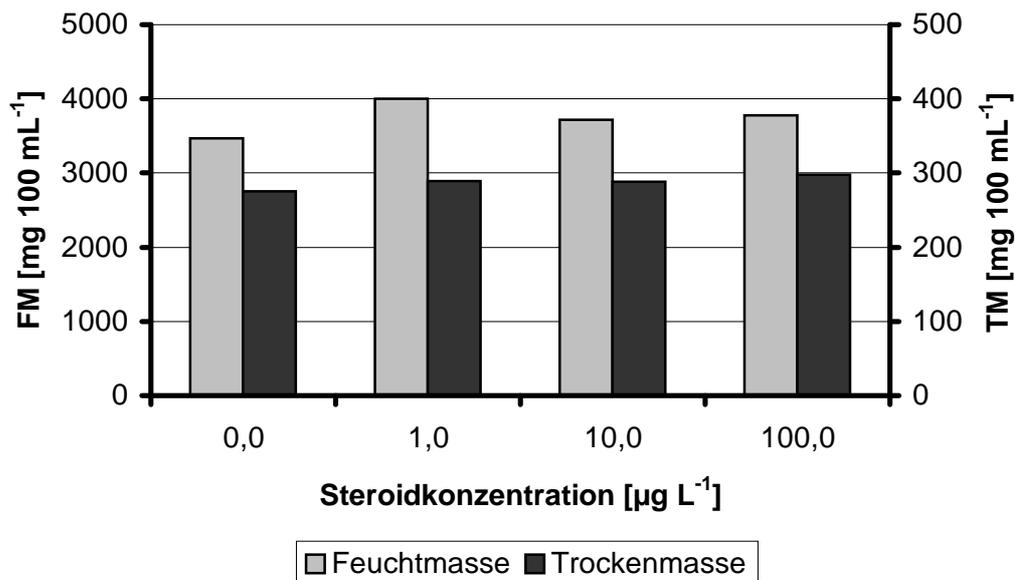


Abbildung 2-48: *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68: Effekt von 24-Epibrassinolid auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

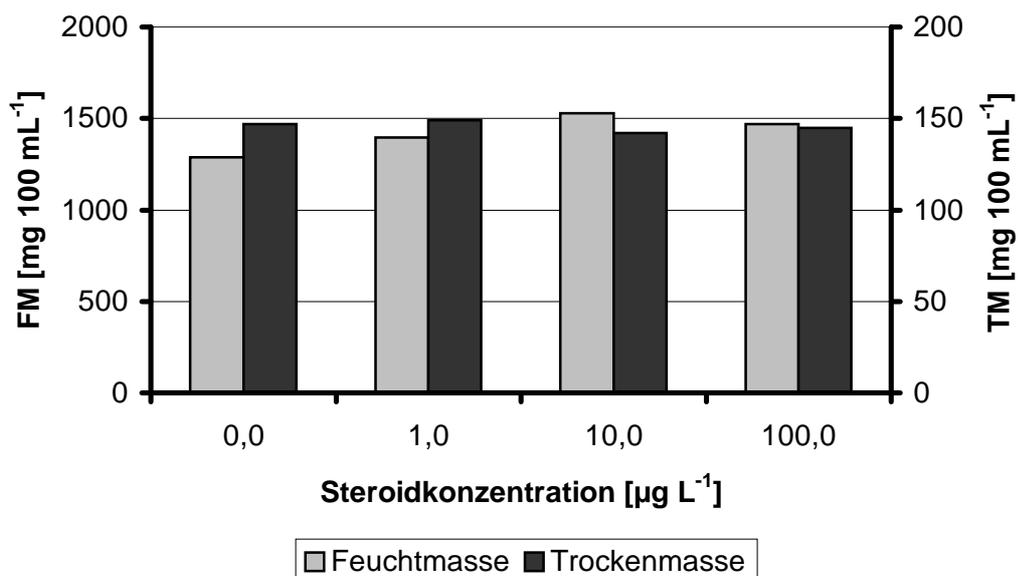


Abbildung 2-49: *Marasmius scorodonius*, CBS 850.87: Effekt von 24-Epi-brassinolid auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

Auf *C. odora* wirkte 24-Epi-brassinolid in allen Konzentrationen stark wachstumshemmend. Die Wachstumshemmung betrug 50% (Abbildung 2-47). Das Wachstum von *H. odoratus* sowie *M. scorodonius* wurde nicht beeinflusst. Bei keinem der drei Teststämme wurden morphologische Veränderungen durch das Steroid festgestellt. Es kam nicht zur Ausbildung der für die Fruchtkörper beschriebenen sensorischen Eigenschaften.

2.3.2 Zusatz eines Kulturfiltrates

Während *H. odoratus*, CBS 764.68, langsam wuchs (Kulturdauer >30 Tage), zeichnete sich der Stamm CBS 553.80 durch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit aus (Kulturdauer <10 Tage). Zahlreiche Pilze geben biologisch aktive Substanzen an ihre Umgebung ab [CUTLER, 1995]. Darunter sind auch Phytoeffektoren, denen entscheidende regulatorische Aufgaben im Zusammenleben von Pilz und Pflanze zukommen [GOGALA, 1991]. Es ist denkbar, daß Pilzzellen ebenfalls Mediatoren ins Kulturmedium abgeben, die stimulierend auf das Wachstum von Pilzen der gleichen Art wirken. Ein Mangel dieser Mediatoren in Kulturen des Stammes CBS 764.68 sollte durch Supplementierung ausgeglichen werden. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Volumina Medium aus Kulturen dieses Stammes gegen steriltfiltriertes Medium aus einer 7 Tage alten Kultur des schnellwachsenden Stammes CBS 553.80 ersetzt.

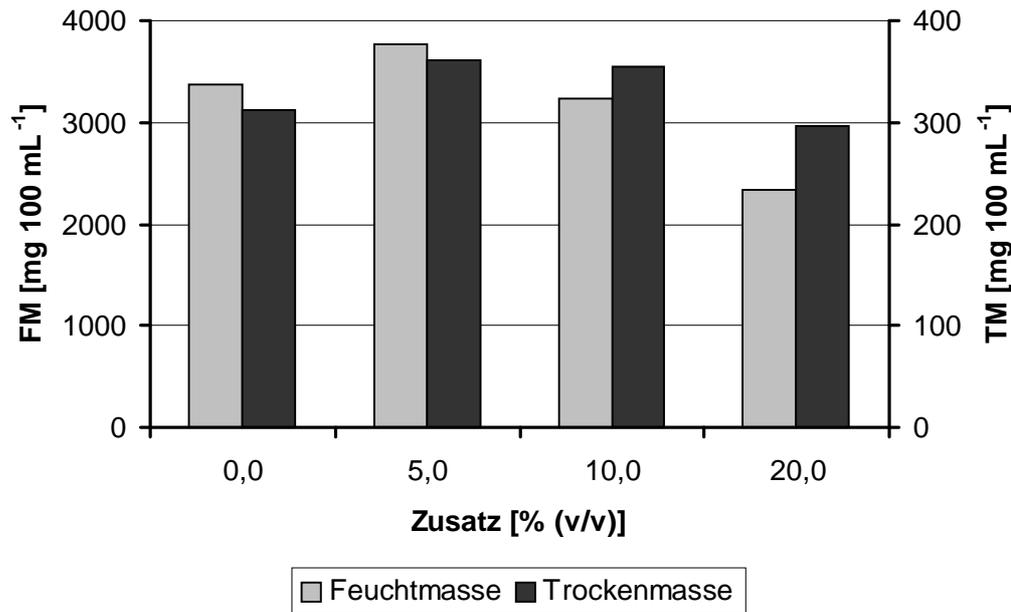


Abbildung 2-50: *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68: Effekt durch den Zusatz eines Kulturfiltrates des schnellwachsenden Stammes *H. odoratus* CBS 553.80 auf die Biomassebildung, Bestimmung am 14. Kulturtag

Die Supplementierung mit Medium des schnellwachsenden *H. odoratus*-Stammes CBS 553.80 führte nicht zu einer signifikant erhöhten Wachstumsrate des Stammes CBS 764.68. Weder sensorische noch morphologische Veränderungen wurden beobachtet.

2.3.3 Teilzusammenfassung 2.3

- Eine deutliche Stimulation der Biomassebildung konnte nur bei *C. odora* durch den Zusatz von Kinetin und Indolessigsäure in bestimmten Konzentrationsverhältnissen erzielt werden.
- Ansonsten waren die zugesetzten Effektoren ohne Wirkung bzw. hatten einen negativen Einfluß auf die Biomassebildung. 24-Epibrassinolid wirkte wachstumshemmend auf *C. odora* und hatte keinen Einfluß auf die beiden anderen Pilze. Polyamine hemmten in unterschiedlichem Maße das Wachstum aller drei Testorganismen.
- Die sensorischen und morphologischen Eigenschaften der Pilze wurden durch keinen der Zusätze beeinflusst.

3 Diskussion

3.1 Lichteinfluß auf Pilze

Während Pflanzen unabdingbar auf Licht angewiesen sind, da sie es als Energiequelle für die Photosynthese nutzen, ist es für Pilze nicht lebensnotwendig. Sie beziehen als heterotrophe Organismen Energie und Kohlenstoffbausteine aus dem Umsatz organischer Substrate und wachsen auch in völliger Dunkelheit. Der Einfluß von Lichtreizen wurde vermutlich vor diesem Hintergrund in Forschung und Anwendung lange vernachlässigt und findet nach wie vor vergleichsweise wenig Beachtung. Die Belichtungsverhältnisse finden in verschiedenen Studien insoweit Beachtung, als daß die Pilze in Dunkelheit kultiviert wurden. Eine Begründung fehlt jedoch.

Doch auch bei Pilzen sind deutliche Reaktionen auf Belichtung zu beobachten (vgl. Tabelle 3-1). Die beschriebenen Effekte beziehen sich auf unterschiedlichste Aspekte der Pilzentwicklung. Häufig wurden visuell erfaßbare Vorgänge wie die Akkumulation von Pigmenten (besonders Carotinoide) oder morphologische Veränderungen (Fruchtkörperbildung, Sporulation) beschrieben. Auf biochemischer Ebene wurde die Regulation verschiedener Enzymaktivitäten und daraus resultierende Metabolitenkonzentrationen untersucht. Aromabildende Prozesse wurden bislang jedoch kaum betrachtet [BÖKER, 1997, YAMAUCHI ET AL., 1996; NAMBU DIRI ET AL., 1973].

Tabelle 3-1: Beispiele für lichtbedingte Effekte bei Pilzen

beobachteter Effekt	Spektralbereich
Pigmentierung	
Einfluß auf die Bildung verschiedener Pigmente in <i>Alternaria alternata</i> [HÄGGBLOM UND UNESTAM, 1979]	Blaulicht, Weißlicht
Akkumulation von Carotinoiden in <i>Gibberella fujikuroi</i> [AVALOS UND SCHROTT, 1990]	Blaulicht
Akkumulation von Carotinoiden in <i>Neurospora crassa</i> [MORELLI ET AL., 1993]	Blaulicht
Akkumulation von β -Caroten in <i>Phycomyces blakesleeanus</i> [BEJARANO ET AL., 1990]	<530 nm
Veränderung des Flavin- und Pterin-Musters in <i>Phycomyces blakesleeanus</i> [HOHL ET AL., 1992A; HOHL ET AL. 1992B]	UV-A- und Blaulicht
Akkumulation von Hispidin in <i>Polyporus hispidus</i> [NAMBUDIRI ET AL., 1973]	Tageslicht
Photomorphogenese / Phototropismus / Sporulation	
Fruchtkörperbildung bei <i>Cyathus stercoreus</i> [GARNETT, 1958; LU, 1965]	<530 nm
positiver Phototropismus des Sporocarps bei <i>Cyathus stercoreus</i> [BRODIE, 1975]	Blaulicht
Conidienbildung bei <i>Neurospora crassa</i> [TURIAN, 1977]	Blaulicht
Koremia-Bildung, positiver Phototropismus der Koremien bei <i>Penicillium isariiforme</i> [BENNINK, 1972; MUTHUKUMAR ET AL., 1991]	470-480 nm
Einfluß auf Gravitropismus und Autochemotropismus bei <i>Phycomyces blakesleeanus</i> [CAMPUZANO ET AL., 1996]	UV- und Blaulicht
Keimung der Urediniosporen von <i>Puccinia substriata</i> [TAPSOBA UND WILSON, 1997]	Fluoreszenz
positiver Phototropismus von Synnemata bei <i>Sporobolomyces salmonicolor</i> , [LAZAROVA ET AL., 1994]	Blaulicht
Conidienbildung bei <i>Trichoderma harzianum</i> [BAUM UND HORWITZ, 1991]	UV-A- und Blaulicht
Verschiedene physiologische und metabolische Effekte	
Hemmung der Alternariol-Bildung (Polyketid) bei <i>Alternaria alternata</i> [HÄGGBLOM UND UNESTAM, 1979]	Blaulicht
Akkumulation von Gibberellinen in <i>Gibberella fujikuroi</i> [JOHNSON UND COOLBAUGH, 1990]	k. A.
Steigerung der Konzentration von Himbeeralkohol und -keton in Kulturen von <i>Nidula niveo-tomentosa</i> [BÖKER, 1997]	UV-A-Licht
Beeinflussung der Aktivität einiger Dehydrogenasen und Oxygenasen bei <i>Penicillium glaucum</i> , <i>P. album</i> , <i>Fusarium oxysporium</i> , <i>Trichoderma lignourum</i> [CHEBOTAREV UND ZEMLYANUKHIN, 1973]	sichtbares und UV-Licht
Aktivitätssteigerung der Arylalkoholoxidase bei <i>Pleurotus eryngii</i> [DELGADO ET AL., 1992]	Weißlicht
Aktivitätssteigerung von Enzymen des Zimtsäurestoffwechsels in <i>Polyporus hispidus</i> [NAMBUDIRI ET AL., 1973]	Tageslicht
Anstieg des intrazellulären ATP-Spiegels bei <i>Trichoderma viride</i> [TÁMOVÁ ET AL., 1995]	Weißlicht

Als wirksame Wellenlänge des Lichts wird meist ein Bereich <520 nm angegeben. Dies entspricht dem Blau- und UV-Bereich des Lichtspektrums (Abbildung 3-1). Es ist zu vermuten, daß auch bei der Angabe Weiß- bzw. Tageslicht nur dieser Teil des Spektrums für den beobachteten Effekt maßgeblich ist. Reaktionen auf Licht mit einer Wellenlänge >520 nm sind nicht bekannt.

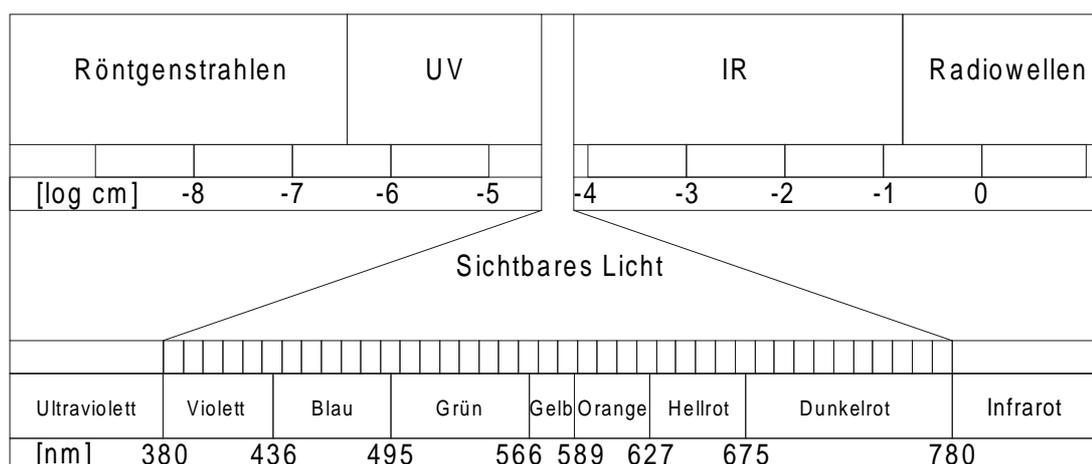


Abbildung 3-1: Spektrum des sichtbaren Lichts als Teil der elektromagnetischen Strahlung

Aufgrund des wirksamen Spektralbereiches etablierte sich der Begriff „Blaulicht-Effekt“ als Sammelbegriff für die beobachteten Reaktionen. Trotz der Bandbreite verschiedenartiger Blaulicht-Reaktionen ist der Mechanismus der Reizaufnahme und Signalverarbeitung noch nicht aufgeklärt. Konkrete Rezeptorstrukturen konnten bislang nicht isoliert werden. Zwar gab es in der Vergangenheit immer wieder Hypothesen und Modelle zur Wirkungsweise von Blaulichtrezeptoren. Insbesondere eine japanische Arbeitsgruppe um KUMAGAI beschäftigte sich in zahlreichen Veröffentlichungen ausgiebig mit einem „Myochrom“-System [YAMAMURA ET AL., 1978; KUMAGAI, 1978; KUMAGAI, 1984A; KUMAGAI, 1984B]. Weitere Vorstellungen basieren auf Flavinen, Flavoproteinen, Carotinoiden und Pterinen als entscheidende Strukturen [NINNEMAN, 1995]. Doch keines der Modelle wurde bisher bestätigt und etabliert.

3.2 Bedeutung des L-Phenylalanins für die Aromabildung

Die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin nimmt eine Stellung als Bindeglied zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel ein. Nach Desaminierung wird der Grundkörper in Form von trans-Zimtsäure in den Phenylpropanoidstoffwechsel eingeführt. Unterschiedliche Modifikationen (Hydroxylierungen, Methylierungen, Seitenkettenverkürzungen, Veresterungen) führen zu einer Vielfalt von Sekundärprodukten, von denen zahlreiche aromaaktive Eigenschaften besitzen (Abbildung 3-2) [TOWERS, 1976]. Darunter befinden sich Aromastoffe von großer ökonomischer Bedeutung wie Vanillin, Benzaldehyd, Zimtaldehyd und andere.

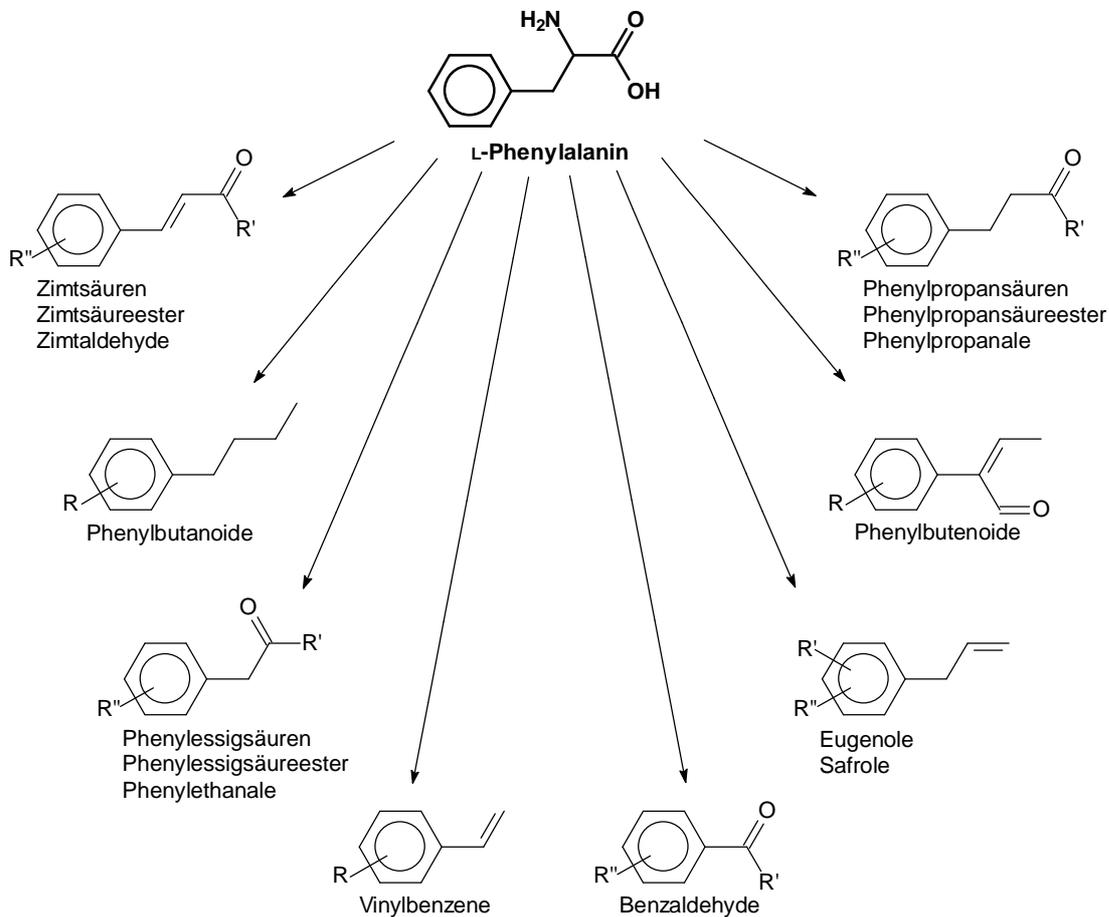


Abbildung 3-2: L-Phenylalanin als Precursor für flüchtige Aromastoffe [nach BERGER ET AL., 1999]

Holzerstörende Pilze, insbesondere die ligninabbauenden Weißfäulepilze, verfügen häufig über mannigfaltige Enzymsysteme für die Metabolisierung phenylpropanoide Strukturen. Ihr natürliches Habitat, lebendes oder totes Holz, bietet das Substrat in Form des

polymeren Lignins im Überfluß. Die Pilze bergen somit ein großes Potential zur Bildung flüchtiger Aromastoffe aus dem Phenylpropanoidmetabolismus.

Es hat sich gezeigt, daß exogen appliziertes L-Phenylalanin in den Stoffwechsel auf künstlichen Nährmedien kultivierter Pilze eingeschleust werden kann und zu aromawirksamen Substanzen metabolisiert wird.

3.3 Screening

3.3.1 Selektion der Stämme

Die ausgewählten Pilze sollten bereits ohne Zusatz von Precursoren aromaaktive Substanzen bilden. Das Spektrum der Geruchseindrücke wurde breit gewählt, um die Lichtwirkung auf verschiedenste Stoffwechselwege in die Untersuchung miteinzubeziehen. Zahlreiche umfassende Abhandlungen zu Aroma und Inhaltsstoffen von Fruchtkörpern sowie in Flüssigmedien kultivierter Pilze wurden für die Auswahl zugrunde gelegt [ABRAHAM UND BERGER, 1994; GROSS UND ASTHER, 1989; JANSSENS ET AL., 1992; SENEMAUD UND MANGEOT, 1988; RAPOIR ET AL., 1996A; RAPOIR ET AL., 1996B; RAPOIR ET AL., 1997].

Neben den sensorischen Eigenschaften diene die Färbung der Pilze als Auswahlkriterium. Pigmentierung ist häufig Folge von Lichteinwirkung (z. B. Carotinoide) [AVALOS UND SCHROTT, 1990]. Die Bildung von Farbstoffen wurde als Hinweis gewertet, daß Lichtreize regulatorische Einflüsse auch auf metabolische Aktivitäten des Pilzes haben könnten, die zur Genese von Aromastoffen führen. Angaben über die Färbung der Fruchtkörper und weitere Informationen über Geruchseindrücke wurden einschlägigen Lexika entnommen [CETTO (Ed.), 1992; MICHAEL ET AL. (Eds.), 1987].

3.3.2 Kulturführung

Die Kultivierung in einem komplexen Standardnährmedium (Hefeextrakt als komplexe Komponente) versprach gutes Wachstum, was sich in späteren Untersuchungen bestätigte: Der Einsatz eines synthetischen Standardmediums (SNL-B₁) hatte eine vergleichsweise geringe Wachstumsrate verschiedener Pilze zur Folge.

Die Intention der Testreihe lag darin, positive Effekte der UV-A-Belichtung auf die Exkretion aromaaktiver Substanzen ins Medium zu zeigen. Um die Adaption des Pilzes an UV-A-Licht, das Teil des normalen Tageslichtspektrums ist (Abbildung 3-1), auszuschließen, wurden bereits die Vorkulturen unter Lichtausschluß kultiviert. Erst das wachsende Mycel

der experimentellen Kulturen wurde dem Licht exponiert. Reaktionen auf den Lichtreiz konnten sich somit erst in dieser Phase manifestieren und wurden der Analytik zugänglich. BÖKER [1997] konnte zeigen, daß die Medienkonzentrationen von Himbeerketon und -alkohol mit zunehmender Belichtungsdauer anstiegen und bei 14 h d^{-1} ein Maximum erreichten. Dieser empirische Wert diente als Grundlage für die hier durchgeführten Untersuchungen.

Das Potential zur Bildung phenylpropanoider Aromastoffe wurde durch den Zusatz von L-Phenylalanin als Precursor ausgeschöpft (vgl. 3.2). Die Applikation von 10 mmol L^{-1} stellte ein großes Überangebot des Substrates dar, was die Bildung aromatischer Sekundärstoffe begünstigen sollte.

3.3.3 Analytik

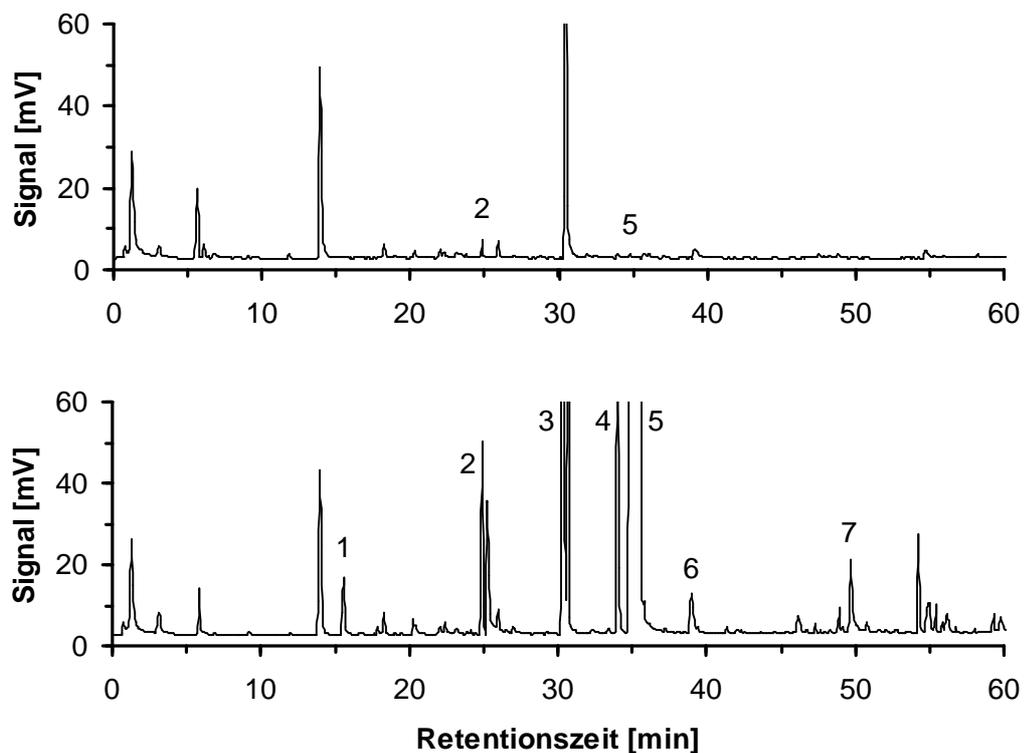
Die Festphasenmikroextraktion (SPME) bot sich für die Probenvorbereitung an. Es werden nur geringe Probevolumina benötigt. Die Entnahme von Medium aus den Kulturen konnte so gering gehalten werden und ermöglichte, alle Einzelproben einer Kultivierungsperiode aus der gleichen Kultur zu gewinnen. Diese Einzelproben wurden zu einer Sammelprobe vereinigt. Die Analyse der Sammelprobe erschloß einen Überblick über die Hauptmetabolite, die während der Kultivierung ins Medium abgegeben wurden. Konzentrationsunterschiede zwischen den unterschiedlichen Kulturansätzen brachten Effekte durch UV-A-Belichtung bzw. Zusatz von L-Phenylalanin zum Vorschein. Temporär oder in geringen Konzentrationen gebildete Metabolite wurden in diesem System durch den Verdünnungseffekt allerdings nur bedingt erfaßt.

3.3.4 Precursorwirkung des L-Phenylalanins

Nahezu jeder der untersuchten Pilze war in der Lage, exogen zugesetztes L-Phenylalanin zu flüchtigen Verbindungen umzusetzen. Das Maß der Bildung entsprechender Metabolite war dabei sehr unterschiedlich. Nur in wenigen Fällen war der Effekt so offensichtlich wie bei *G. odoratum* (Abbildung 3-3 und 2.1.13, S. 16). Vielfach wurden bereits ohne den Zusatz von L-Phenylalanin phenolische Verbindungen ins Medium abgegeben, deren Konzentrationen durch den Precursor weiter erhöht wurden. Als Beispiel sei *L. lepideus* genannt, der Zimtsäurederivate (besonders Zimtsäure- und Anissäuremethylester) *de novo* synthetisiert [SHIMAZONO, 1958] (2.1.19, S. 22).

Die Fähigkeit, L-Phenylalanin als Substrat zu nutzen, wird in hohem Maße von der Lebensweise des Pilzes bestimmt. Weißfäulepilze beziehen Energie und Nährstoffe aus dem Abbau von Lignin. Dieser polymere Bestandteil des Holzes besteht aus substituierten

Zimtsäurederivaten. Die Enzymausstattung ligninolytischer Pilze für den Metabolismus phenolischer Substrate ist daher hochentwickelt, was sich in ihrem breiten Produktspektrum widerspiegelt [LAPADATESCU ET AL., 1997]. Braunfäulepilze hingegen verwerten vorwiegend die Cellulose des Holzes. Ihre Fähigkeiten, exogen zugesetzte phenolische Komponenten zu metabolisieren, sind daher meist schwächer ausgeprägt.



- | | |
|------------------------|----------------------------------|
| 1: Benzaldehyd | 2: Phenylelessigsäuremethylester |
| 3: 2-Phenyl-1-ethanol | 4: trans-Zimtaldehyd |
| 5: 3-Phenyl-1-propanol | 6: trans-Zimtalkohol |
| 7: Phenylelessigsäure | |

Abbildung 3-3: Flüchtige phenolische Metabolite in Kulturen von *Gloeophyllum odoratum*, CBS 444.61, oben: ohne Zusatz von L-Phenylalanin, unten: mit Zusatz von L-Phenylalanin (10 mmol L⁻¹)

3.3.5 Lichtstimulierte Bildung flüchtiger Metabolite

Bei etwa einem Drittel der untersuchten Pilze wurde die Bildung flüchtiger Metabolite durch UV-A-Licht stimuliert (Tabelle 2-47, S. 37). Die beobachteten Effekte waren quantitativer Art. Die Konzentrationen ebenfalls in Dunkelheit gebildeter Metabolite wurden lediglich erhöht. Bei keinem Pilz wurden in belichteten Kulturen Substanzen detektiert, die in dunkel geführten Kulturen nicht gebildet wurden. Das bedeutet, daß durch die UV-A-

Belichtung keine sonst inaktiven Enzymaktivitäten induziert wurden, die zur Bildung flüchtiger Metabolite beitragen.

Meist wurden Konzentrationssteigerungen um das zwei- bis fünffache beobachtet (Tabelle 2-47, S. 37), was allerdings bei den vorwiegend beobachteten Konzentrationen von 0,5-2 mg L⁻¹ absolut betrachtet keinen großen Effekt bedeutet. In wenigen Fällen erhöhte sich die Konzentration auf das 7- bis 10fache (Phenylmethanol bei *H. odoratus*, Benzaldehyd bei *P. involutus*, trans-p-Methoxyzimtsäuremethylester bei *L. lepideus*).

Mit Ausnahme von C₈-Verbindungen bei *A. praecox* und *G. odoratum* wurden belichtungsbedingte Konzentrationserhöhungen nur bei aromatischen Substanzen beobachtet. Diesen Verbindungen ist gemeinsam, daß sie dem Phenylalanin-Zimtsäure-Stoffwechselweg entspringen.

Das erste Enzym in diesem Weg ist die Phenylalanin-Ammonium-Lyase, deren Lichtstimulation bereits aus Pflanzen sowie einigen Pilzen bekannt ist. Auch für Enzyme, die in Folge Zimtsäure über p-Cumarsäure zu Kaffeesäure umsetzen, wurde ein stimulierender Effekt durch Licht beschrieben [NAMBUDIRI ET AL., 1973]. Die Ergebnisse des Screenings legen nahe, daß noch weitere enzymatische Reaktionen des Zimtsäurestoffwechsels durch Licht stimuliert werden.

3.3.6 Wachstum

Die Belichtungsverhältnisse während des Screenings hatten keine auffälligen Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Pilze. Weder Wachstumsrate noch morphologische Eigenschaften des Mycels (Pelletform, Farbe) wurden beeinflusst. Lediglich bei *M. giganteus* (2.1.24, S. 27) wurde bei Belichtung in Kombination mit dem Zusatz von L-Phenylalanin eine Erhöhung der Wachstumsrate festgestellt. In den anderen Ansätzen setzte die gleiche Entwicklung lediglich mit geringer Verzögerung ein.

Ausgeprägte Stimulation oder Hemmung der Pilzentwicklung, wie es für verschiedene andere Pilze beschrieben wurde (vgl. 3.1), trat bei den untersuchten Stämmen nicht auf. In nachfolgenden Versuchen (2.2, S. 39 ff) zeigte sich, daß die Biotrockenmasse in belichteten Kulturen häufig etwas geringer war als in den entsprechenden dunkel geführten Ansätzen. Offenbar bedingte der Lichtstreß in diesen Fällen eine leichte Verzögerung von Bioprocessen.

3.4 Bildung halogener Anisylverbindungen durch *Bjerkandera adusta*

3.4.1 Verbreitung von Organohalogenverbindungen in der Natur

Akkumulation oder Metabolisierung

Bis vor wenigen Jahren wurde die Meinung vertreten, daß bis auf einzelne Ausnahmen Organohalogenverbindungen in der Natur anthropogenen Ursprungs sind. Das Vorkommen dieser Substanzen in lebenden Organismen wurde mit der Aufnahme aus der Umwelt und anschließender Akkumulation oder Metabolisierung erklärt. Hier einige für den Menschen relevante Beispiele:

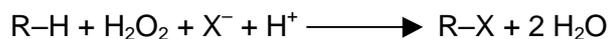
- Bromphenole sind essentiell für das charakteristische Aroma von Seefischen, Crustaceen und marinen Mollusken [WHITFIELD ET AL., 1997A].
- Das Fungizid 3,5,6-Tribromphenol wird durch *Paecilomyces variotii* zu 2,4,6-Tribromanisol umgesetzt. Dessen moderiges Aroma geht aus behandelten Transportkisten auf Obst über [WHITFIELD ET AL., 1997B].
- 2,4,6-Trichloranisol als mikrobieller Metabolit verursacht eine Korknote als Fehleroma in Wein [BUSER ET AL., 1982].
- Ligninolytische Basidiomyceten sind fähig zur Detoxifikation von Chlorphenolen [DE JONG ET AL., 1994].

Mittlerweile wurde gezeigt, daß eine große Anzahl von Organohalogenverbindungen *de novo* von verschiedensten Organismen synthetisiert wird [NEIDLEMAN UND GEIGERT, 1986].

de novo Synthese

Bis heute wurden weit über 2000 halogenierte Verbindungen natürlichen Ursprungs isoliert. Entsprechend dem natürlichen Vorkommen der Halogenide handelt es sich dabei meist um chlorierte und bromierte Metabolite. Iodierte und besonders fluorierte Substanzen sind vergleichsweise selten. Eine Vielzahl von Organismen ist zu Halogenierungsreaktionen befähigt, sogar der Mensch – er produziert das iodhaltige Schilddrüsenhormon Thyroxin.

Die bislang einzig bekannten Enzyme, die Halogenierungsreaktionen katalysieren, sind die sogenannten Haloperoxidasen. Man geht von folgender Reaktion aus:



Ein organisches Substrat (R-H) reagiert in der Gegenwart von Peroxiden, in der Regel Wasserstoffperoxid, und Halogenidionen (X^-) zur Organohalogenverbindung (R-X). Das Substratspektrum der zahlreich bekannten Haloperoxidasen ist sehr breit. Die Inkorporation von Fluor ist aufgrund des hohen Redoxpotentials des Fluorids nicht möglich. Da in der Natur jedoch auch fluorhaltige Verbindungen bekannt sind, muß es noch weitere halogenierende Enzyme geben [NEIDLEMAN UND GEIGERT, 1986].

Die Mehrzahl der natürlichen Organohalogenverbindungen, vorwiegend bromierte Substanzen, werden von marinen Algen produziert. Unter den terrestrischen Organismen zeichnen sich besonders holzzerstörende Basidiomyceten durch ihre hohe Syntheseleistung für Halometabolite aus. Als wichtige Produktgruppen sind Halomethane und halogenierte Aromaten zu nennen [FIELD ET AL., 1995].

Halomethane sind von großer ökologischer Bedeutung. Die Immission halogener Substanzen wurde lange ausschließlich Industrieabgasen zugeschrieben und gilt als Indikator für Umweltverschmutzung. Doch wie sich inzwischen herausstellte, übertreffen Haloverbindungen natürlichen Ursprungs die Industrieemissionen in unberührten Landschaften in ihrer Masse etwa um den Faktor 300 [ASPLUND UND GRIMVALL, 1991]. Chlormethan hat daran einen Anteil von etwa $5000000 \text{ t Jahr}^{-1}$ [HARPER ET AL., 1989].

In der Zelle fungieren Halomethane als Methylgruppendonator für ein methylierendes Enzymsystem. Dieses System ist in Struktur und Physiologie völlig losgelöst von S-Adenosylmethionin-abhängigen Methylierungssystemen [FIELD ET AL., 1995].

Bis 1995 konnten 43 aromatische Halogenverbindungen aus Basidiomyceten identifiziert werden. Meist handelt es sich dabei um einfache Strukturen wie chlorierte Anisyl-, Hydrochinon oder Orcinolderivate [FIELD ET AL. 1995]. Die physiologischen Funktionen sind vielfältig. Weit verbreitet sind antimikrobielle Eigenschaften gegen Bakterien, Hefen und andere Pilze. Aber auch Keimhemmung bei Pflanzen oder Hemmung der Chitinsynthese bei Insekten werden beschrieben. Eine weitere wichtige Funktion kommt ihnen als Substrat für H_2O_2 -generierende Oxidasen zu [FIELD ET AL. 1995].

Aromatische Organohalogenverbindungen gelten als sehr stabil und reichern sich in der Umwelt an.

Untersuchungen an *Bjerkandera adusta*

Die Ergebnisse des im Screening durchgeführten Vergleichs wiesen auf einen stimulierenden Einfluß der UV-A-Belichtung auf die Bildung von 3,5-Dichloranisalkohol und -aldehyd hin (2.1.3, S. 6).

In den im folgenden diskutierten Untersuchungen wurden verschiedene einfach und zweifach substituierte Anisylderivate detektiert:

- 3-Brom-p-anisaldehyd und –alkohol,
- 3-Chlor-p-anisaldehyd und –alkohol,
- 3,5-Dibrom-p-anisaldehyd,
- 3,5-Dichlor-p-anisaldehyd,
- 3-Brom-5-chlor-p-anisaldehyd.

Halogenierte Anisylverbindungen sind bei Pilzen weit verbreitet. Bei Kultivierung holzerstörender Basidiomyceten in Flüssigmedien wurden bis zu 47 mg L⁻¹ dieser Verbindungen produziert. In Waldboden oder totem Holz wurden Konzentrationen bis zu 75 mg kg⁻¹ detektiert [FIELD ET AL., 1995]. Die physiologische Bedeutung der halogenierten Anisylderivate liegt im Ligninabbau. Sie dienen als Cosubstrate der extrazellulären Arylalkoholoxidase (AAO) [TEUNISSEN UND FIELD, 1998; DE JONG ET AL. 1994B]. Die AAO generiert H₂O₂, das für die oxidative Ligninolyse durch Manganperoxidase und Ligninperoxidase benötigt wird. Die oxidierten Cosubstrate werden regeneriert. Neben halogenierten Substraten werden auch nichthalogenierte Arylalkohole wie Veratrylalkohol umgesetzt. Es konnte jedoch eine erheblich höhere Affinität der Enzyme zu den halogenierten Substraten festgestellt werden [DE JONG ET AL., 1994]. Zudem sind diese sehr stabil und werden im Gegensatz zu den nichthalogenierten Substraten nur langsam metabolisiert. So wurden selbst bei überlanger Kultivierung von *Hypholoma fasciculare* unveränderte Gesamtkonzentrationen festgestellt – lediglich die Konzentrationsverhältnisse der halogenierten Anisylderivate zueinander hatten sich durch Redoxprozesse verschoben [VERHAGEN ET AL., 1998].

Steigerung der Syntheseleistung

Um neben den bei *B. adusta* beobachteten Chlorierungen weitere Halogenierungen zu erzielen, wurden den Kulturen Halogenide einzeln wie auch in Kombination zugesetzt, was sich im Konzentrationsanstieg chlorierter und bromierter Verbindungen widerspiegelte. Fluor- oder iodhaltige Metabolite wurden nicht detektiert.

Die Produktmengen waren ohne Zusatz von L-Phenylalanin sehr gering, wie nach den Ergebnissen des Screenings bereits zu vermuten war. Durch den Zusatz des Precursors wurde die Ausbeute deutlich gesteigert. In erster Linie wurde jedoch Phenylmethanol (bis zu 9 mg L^{-1} , Tabelle 2-50, S. 51) gebildet. Nichthalogenierte Anisylderivate wurden nicht detektiert.

Die Einführung der Hydroxylgruppe in 4-Position stellt offensichtlich einen Engpaß dar. Durch L-Tyrosin als Precursor wurde dieser Engpaß umgangen. Die Bildung nichthalogener Substanzen trat in den Hintergrund, die halogenierten Anisylderivate waren die Hauptmetabolite im Medium (max. $3,8 \text{ mg L}^{-1}$ 3,5-Dichlor-p-anisaldehyd, Tabelle 2-51, S. 52). Schwankungen der Konzentrationsverhältnisse lassen sich auf die von VERHAGEN ET AL. [1998] beschriebenen Redoxprozesse zurückführen (s. o.).

Die in den Kontrollansätzen gebildeten Organochlorverbindungen sind auf die Inkorporation bereits im Medium enthaltenen Chlorids zurückzuführen.

Nahezu alle in der Literatur beschriebenen Kultivierungen bezüglich der Bildung von Organohalogenen wurden als statische Oberflächenkultivierungen durchgeführt.

Die daraufhin erfolgte Umstellung der Kultivierung von *B. adusta* von Submers- auf statische Kultivierung hatte eine deutliche Steigerung der Konzentration der halogenierten Anisylderivate zur Folge. Diese Beobachtung deckt sich mit der von VERHAGEN ET AL. [1998] beschriebenen Korrelation zwischen vegetativem Wachstum und Bildungsrate. Während der Wachstumsphase setzt die Bildung der Organohalogene ein. Bei Erreichen der stationären Phase ist die Bildungsphase beendet, und die Konzentrationen bleiben unverändert. Das schnelle Wachstum des Pilzes in Submerskultur begrenzt somit den Bildungszeitraum auf vergleichsweise kurze Zeit. Die resultierenden Konzentrationen der Zielsubstanzen bleiben entsprechend gering. Versuche im Bioreaktor bestätigten diese Überlegung. Der Pilz wuchs sehr schnell, eventuell durch die optimale Sauerstoffversorgung bedingt, es wurden jedoch keine Halogenverbindungen detektiert. Als Precursor zugesetztes L-Tyrosin wurde lediglich zu unhalogenierten Derivaten umgesetzt.

Einfluß auf das Wachstum

Während der alleinige Zusatz von Halogenidsalzen keinerlei Auswirkungen auf das Pilzwachstum in Submerskultur hatte, kam es in Kombination mit L-Phenylalanin zu einer Wachstumshemmung, die sich in einer etwa 30%ig geringeren Biomasse äußerte (Abbildung 2-5, S. 48). Der Effekt war bei allen Halogeniden etwa gleich stark ausgeprägt. Gründe für die synergistische Wirkung von Halogeniden und L-Phenylalanin sind nicht ersichtlich. Die UV-A-Belichtung hatte eine weitere Wachstumshemmung zur Folge.

Wurde L-Tyrosin als Precursor zugesetzt, wurden noch deutlichere Effekte sichtbar (Abbildung 2-6, S. 49). Die allgemein bekannte hemmende Wirkung von Fluorid kam hier stark zum Tragen (60% geringere Biomasse gegenüber alleinigem L-Tyrosinzusatz.). Die anderen Halogenide reduzierten die Biomasse lediglich um ca. 15%. Offensichtlich lag hier ein ähnlicher Synergismus vor wie beim Einsatz von L-Phenylalanin. Bemerkenswert war der wachstumshemmende Effekt bei UV-A-Belichtung. Bereits ohne Halogenidzusatz kam es zu einer Halbierung der Biomasse. Es ist denkbar, dass es durch den Zusatz von L-Tyrosin zu einer Photosensibilisierung mit den beobachteten Folgen kommt.

Einfluß der UV-A-Belichtung auf die Bildung halogenierter Anisyllderivate

Nach Berücksichtigung aller Einzelergebnisse muß davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem im Screening beobachteten Belichtungseffekt um einen sekundären Effekt handelt. Ein regulativer Einfluß der UV-A-Belichtung auf Enzymaktivitäten kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Eine Verminderung des vegetativen Wachstums, ausgelöst durch UV-A-Licht, hatte eine verminderte Biomassebildung zur Folge. Die direkt mit der Biomassebildung korrelierte Bildung der chlororganischen Verbindungen war somit ebenfalls vermindert.

3.5 *Gloeophyllum odoratum*: Bildung von C₈-Verbindungen und Exopolysacchariden

3.5.1 Herkunft von C₈-Verbindungen in Pilzen

Das typische Pilzaroma läßt sich insbesondere auf 1-Octen-3-ol sowie weitere C₈-Verbindungen zurückführen. 1-Octen-3-ol entsteht in zwei Schritten durch enzymatisch-oxidative Spaltung von Linolsäure (Abbildung 3-4) [WURZENBERGER UND GROSCH, 1983]. Die Peroxidbildung wird durch eine Lipxygenase katalysiert. Neben der 10-Hydroperoxy-E-8,Z-12-octadecadiensäure (10-HPOD) entstehen auch geringe Mengen an 13-HPOD. Die Hydroperoxidlyase ist spezifisch für 10-HPOD und katalysiert deren Spaltung, woraus 1-Octen-3-ol resultiert [WURZENBERGER UND GROSCH, 1984; ASSAF ET AL., 1997]. Durch Folgereaktionen entstehen daraus weitere C₈-Verbindungen.

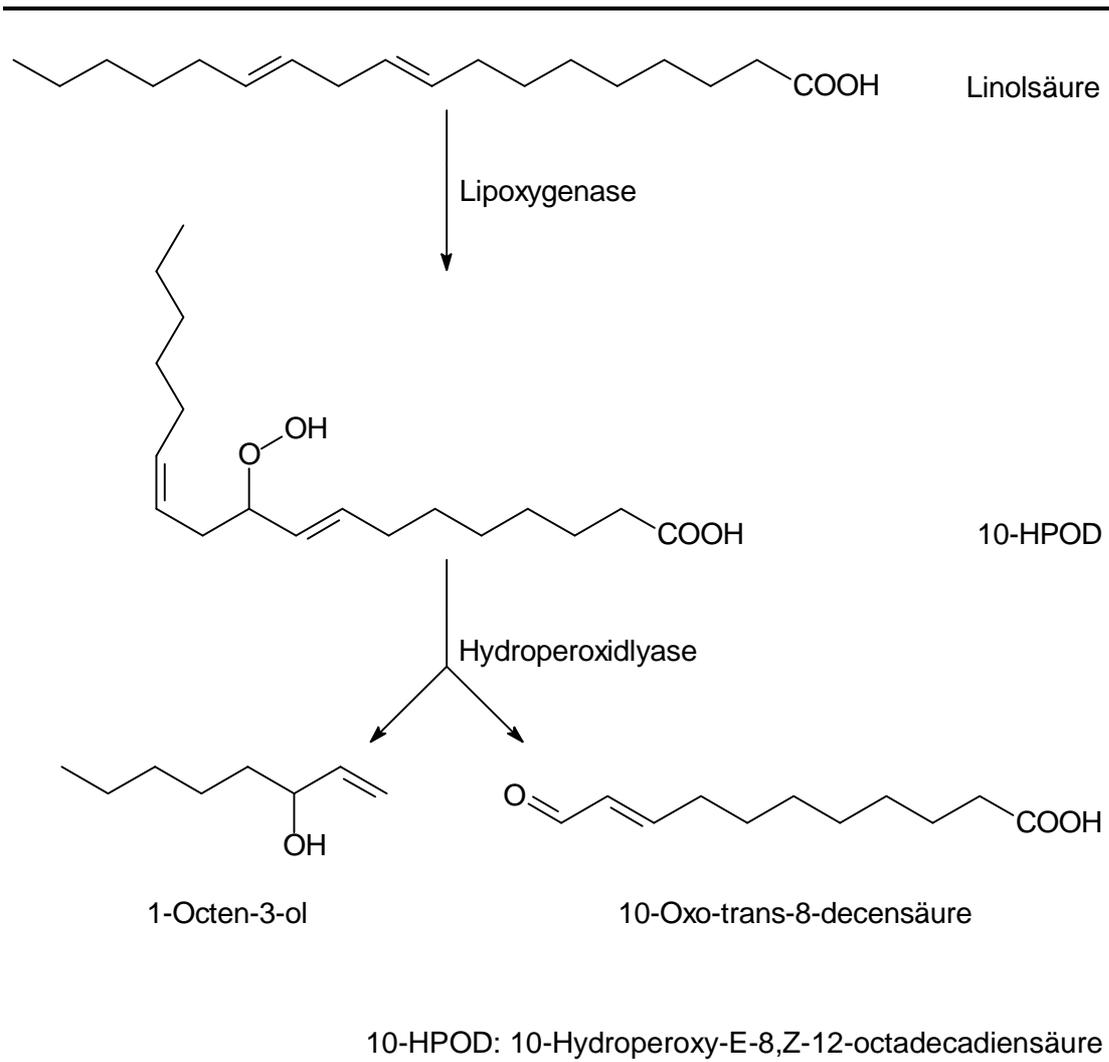


Abbildung 3-4: Genese von 1-Octen-3-ol aus Linolsäure

Die Umsetzung erfolgt, wenn durch Verletzung der Zellen der Membranbestandteil Linol-säure als Substrat mit den intrazellulären Enzymen zusammentrifft. Die Bildung von 1-Octen-3-ol verläuft sehr schnell.

Bei der Untersuchung der funktionellen Untereinheiten von Fruchtkörpern wurden auf enzymatischer Ebene deutliche Unterschiede bezüglich der 1-Octen-3-ol-Genese festgestellt. Die höchste Aktivität wurde in den Lamellen, die geringste im Stiel von *Agaricus bisporus* nachgewiesen [WURZENBERGER UND GROSCH, 1983; MAU ET AL., 1992].

3.5.2 Lichtwirkung auf die Genese von 1-Octen-3-ol

Die Bestimmung der Aktivitäten von Lipoxygenase und Hydroperoxidlyase zeigte in belichteten sowie in dunkel geführten Kulturen einen vergleichbaren Verlauf (Abbildung 2-1, S. 40). Der geringe Zeitversatz – das Aktivitätsmaximum wurde in der belichteten Kultur früher erreicht – kann kaum als Auslöser für die um den Faktor 4 höhere Konzentration

von 1-Octen-3-ol in der Sammelprobe des Screeningversuchs gewertet werden. Bei Berücksichtigung der Konzentrationen weiterer C₈-Verbindungen, die sich aus 1-Octen-3-ol ableiten lassen, müßte eine Aktivitätsdifferenz bei weitem deutlicher hervortreten. Offensichtlich liegt keine Photostimulation der Aktivitäten des untersuchten Enzymsystems vor. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von YAMAUCHI ET AL. [1996], die in Ansätzen den Einfluß von Blaulicht auf die Bildung von 1-Octen-3-ol in zwei Stämmen von *Neurospora* untersuchten. Dort wurde ebenfalls kein Effekt festgestellt.

Als Auslöser für die vermehrte Bildung von C₈-Körpern ist eine Schädigung der Zellmembran durch das UV-A-Licht denkbar. In Folge würde in erhöhtem Maße freigesetzte Linolensäure zu 1-Octen-3-ol umgesetzt werden. Dies müßte nicht ausschließlich auf enzymatischem Wege geschehen – auch eine rein chemische Umsetzung wäre hier denkbar.

3.5.3 Viskosität des Mediums

Im Laufe der Kultivierung von *G. odoratum* kam es zu einer erheblichen Erhöhung der Medienviskosität durch Exopolysaccharide. Für die Aufarbeitung der Kulturen und die anschließende Analytik hatte dies schwerwiegende Auswirkungen:

- Die Filtrierbarkeit war nicht gegeben, da Filter nach sehr kurzer Zeit verblockt wurden.
- Bei Zentrifugation zur Abtrennung der Biomasse sedimentierte neben dem Mycel ein großer Anteil des Exopolysaccharids. Eine exakte Biomassebestimmung war somit nicht immer gegeben.
- Eine befriedigende Extraktion von Metaboliten war nicht gewährleistet. Bei der Flüssig/flüssig-Extraktion kam es zur Ausbildung stabiler Emulsionen. Die Phasentrennung trat vielfach nicht ein und mußte mittels Zentrifugation herbeigeführt werden. Der Übergang von Substanzen aus der wäßrigen in die organische Phase wurde stark behindert. Die als Alternative angewandte Festphasenmikroextraktion wurde mit steigender Viskosität zunehmend gestört. Eine ausreichende Durchmischung des Adsorptionsansatzes war schließlich nicht mehr gegeben. Zudem mußte mit einer Adsorption der Analyten an den Exopolysacchariden gerechnet werden.

Die Viskositätserhöhung des Mediums ist kein Einzelfall. Viele Pilze bilden vermehrt Exopolysaccharide, was die oben beschriebenen Auswirkungen für die Aufarbeitung der Kulturen mit sich bringt. Diesem generellen Problem sollte durch gezielte Gegenmaßnahmen Rechnung getragen werden.

3.5.3.1 Exopolysaccharide

Die Hyphen vieler Pilze sind an ihrem natürlichen Standort von einer dünnen Polysaccharidscheide umgeben. Bei Submerskultivierung löst sich diese Scheide von den Zellen, und die Polysaccharide gehen ins Medium über. Sie werden kontinuierlich nachgebildet und führen so im Laufe der Kultivierung zu einer Viskositätserhöhung.

Meist besitzen die Exopolysaccharide ein Rückgrat aus β -(1 \rightarrow 3)-verknüpften D-Glucoseeinheiten mit β -(1 \rightarrow 6)-Verzweigungen [ROUHIER ET AL., 1995]. GUTIÉRREZ ET AL. [1996] berichten von α -(1 \rightarrow 4)-Verknüpfungen. In die Seitenketten werden auch weitere Zucker eingebaut. Häufig sind die Glucane mit Proteinen verbunden. Größe, Zusammensetzung und Verzweigungen bestimmen die Eigenschaften der Exopolysaccharide.

Da sie die Rheologie von Flüssigkeiten verändern, finden sie industrielle Anwendung in verschiedenen Bereichen (Lebensmittel-, Textiltechnik, Pharmazie) [STASINOPOULOS UND SEVIOUR, 1992]. Größtes Interesse wird den β -Glucanen wegen ihrer tumorsuppressiven Wirkungen zuteil [MIZUNO ET AL., 1995]. Große Anstrengungen werden unternommen, Wirkmechanismen aufzuklären und mikrobielle Systeme auf die Bildung wirksamer Substanzen zu optimieren.

Für viele Anwendungen wäre es hingegen von Vorteil, die Bildung der Exopolysaccharide zu verhindern bzw. diese nachträglich zu entfernen, da die erhöhte Medienviskosität einen erheblichen Störfaktor für die Aufarbeitung und Analytik darstellt (s. o.).

3.5.3.2 Maßnahmen zur Verringerung der Medienviskosität

Variation der Medienzusammensetzung

Glucose ist Bestandteil einer Vielzahl von Kulturmedien, da sie für den Pilz leicht zugänglich ist und im Gegensatz zu vielen anderen C-Quellen gutes Wachstum ermöglicht. Aufnahme in die Zelle und Einschleusung in den Stoffwechsel geschehen schnell und bedürfen keiner aufwendigen enzymatischen Modifikation.

Glucose ist jedoch auch Hauptbestandteil der in 3.5.3.1 beschriebenen Exopolysaccharide. Die ständige Verfügbarkeit des Monomers im Überschuss führt möglicherweise zum verstärkten Aufbau dieser Polysaccharide.

Vor diesem Hintergrund wurde der Zugang zur Glucose durch deren Austausch gegen andere Zucker erschwert. Die Verwertung dieser Kohlenstoffquellen bedarf einer vorangehenden Spaltung. Die Zelle benötigt dafür spezifische Enzyme und Carriersysteme.

Medien mit den folgenden Kohlenstoffquellen wurden getestet:

- Malzextrakt = Mischung verschiedener Zucker
 - ~50% Maltose = Dimer aus Glucose, α -(1→4)-verknüpft
 - ~10% Maltotriose = Trimer aus Glucose, α -(1→4)-verknüpft
 - ~10% Glucose
 - ~ 2% Fructose
 - ~ 1% Saccharose = Dimer aus Glucose und Fructose, α -1→ β -2-verknüpft
- Stärke = verzweigtes Polymer aus Glucose, α -(1→4)- und α -(1→6)-verknüpft
- Saccharose
- Lactose = Dimer aus Galaktose und Glucose, β -(1→4)-verknüpft

G. odoratum konnte Lactose nicht ausreichend als C-Quelle nutzen und wuchs in dem entsprechenden Medium nur minimal. Es ist anzunehmen, daß der Pilz nicht über spezifische Enzyme zur Spaltung des Disaccharids verfügt. Die beiden anderen Zucker sowie der Malzextrakt wurden gut als Substrat verwertet. Der Wechsel der Kohlenstoffquelle schlug sich nicht in einer verminderten Medienviskosität nieder. Bei Einsatz von Malzextrakt war sogar ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen.

Offensichtlich sind die Substrate dem Pilz so gut zugänglich, daß die Bausteine auch weiterhin in hohem Maße der Synthese von Exopolysacchariden zugeführt werden.

Es wurde gezeigt, daß in SNL-Hefe bei vergleichsweise höchstem Pilzwachstum die geringste Viskositätszunahme zu verzeichnen war (Abbildung 2-2 und Abbildung 2-3, S. 43). Das Ergebnis legt nahe, daß durch die Stimulation des Wachstums die Zuckerbausteine vermehrt der Synthese von Zellwandpolysacchariden zugeführt werden. Die Bildung von Exopolysacchariden wird dadurch möglicherweise in den Hintergrund gedrängt. Natürlich sind auch weitere vielschichtige Regulationsmechanismen durch Bestandteile des Komplexmediums nicht auszuschließen.

Voraussetzung für eine hohe Produktion von Exopolysacchariden ist ein hohes C/N-Verhältnis [RAU ET AL., 1992]. Um das Gegenteil zu erreichen, wurde der Stickstoffgehalt der SNL-B₁ durch den Zusatz von 3 g L⁻¹ NaNO₃ erhöht. Dieser Zusatz hatte jedoch keinen nennenswerten Effekt auf Wachstum und Medienviskosität. Die Kulturen verhielten sich wie in der nicht modifizierten SNL-B₁.

Belichtung mit UV-A-Licht führte ausschließlich bei den beiden glucosehaltigen SNL-B₁ (unmodifiziert und mit erhöhtem N-Gehalt) zu einer gegenüber unbelichteten Kulturen verminderten Medienviskosität. Ein Grund für diesen Effekt ist nicht ersichtlich.

Die Variation des Nährmediums erbrachte keine Verminderung der Exopolysaccharidbildung. Da sie die günstigsten Eigenschaften aufwies, wurde auch weiterhin die komplexe SNL-Hefe als Kulturmedium eingesetzt.

Einsatz hydrolytischer Enzyme zum Abbau von Exopolysacchariden

Die Variation der Medienzusammensetzung zielte auf die Verminderung der Exopolysaccharidsynthese ab. Die hydrolytischen Enzyme wurden nach Beendigung der Kultivierung eingesetzt, um bereits gebildete Exopolysaccharide wieder abzubauen.

Hydrolytische Enzyme finden breite Verwendung in der Lebensmittelindustrie. Unter anderem werden sie bei der Saffherstellung zur Verflüssigung von Obst oder Gemüse eingesetzt. Durch den teilweisen oder vollständigen Abbau von Pektinen, Hemicellulose und Cellulose wird die Preßausbeute und damit der Ertrag pro eingesetzter Rohware erhöht. Durch die reduzierte Viskosität verbessert sich die Filtrierbarkeit der Säfte. Zudem bauen die Enzyme für Trübung und Schleier verantwortliche Substanzen ab.

Die Parallelen zum Problem der Exopolysaccharide in den Kulturmedien von Pilzen waren gegeben. Dennoch hatten die eingesetzten Enzympräparate keinen Einfluß auf die Medienviskosität (vgl. S. 44). Offensichtlich fand kein Abbau der Polysaccharide statt. Unter der Vielzahl verschiedener Enzyme in den technischen Präparaten war keines, das die Bindungen der Zielsubstanzen hydrolysierte.

Ausfrieren

Beim Einfrieren des Mediums ballen sich die Polysaccharidstränge zusammen. Es ist anzunehmen, daß dem komplexen Netzwerk dabei Wasser entzogen wird. Dieser Vorgang ist nicht reversibel. Präzipitierte und getrocknete Polysaccharide sind kaum in Wasser löslich [GUTIÉRREZ ET AL., 1996]. Offensichtlich müssen die Glucane eine gewisse Größe und Konzentration überschreiten, damit dieser Effekt eintritt. Da Struktur, Größe und Bildungsrate von Pilz zu Pilz unterschiedlich sind, tritt der Ausfriereffekt nicht unabdingbar ein. Bei *G. odoratum* war die Verflechtung der Stränge möglicherweise nicht ausreichend, um das Glucan als Präzipitat entfernen zu können (vgl. S. 45).

3.6 UV-A-stimulierte Bildung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester durch *Lentinus lepideus*

3.6.1 Einfluß unterschiedlicher Nährmedien auf das Wachstum

Unter den getesteten Nährmedien zeigte die komplexe SNL-Hefe den günstigsten Einfluß auf das Wachstumsverhalten von *L. lepideus* und wurde daher als Nährmedium beibehalten (2.2.3.1, S.53 ff). In dem für die Kultivierung von *Lentinus edodes* optimierten Leatham-Medium [MILES UND CHANG, 1987] wurde eine vergleichbare Wachstumsrate beobachtet. *L. edodes* weist in Leatham-Medium ein sichtlich höheres Wachstum auf als in SNL-Hefe [pers. Mitteilung SPAETHER, Inst. Lebensmittelchemie, Universität Hannover]. In diesem Medium kam es bei Kultivierung von *L. lepideus* zu einer deutlichen Viskositätssteigerung mit den bereits in 3.5.3 beschriebenen Auswirkungen. Zudem wies eine terpenige Geruchsnote auf ein verändertes Produktspektrum hin.

Die Zusammensetzung des Nährmediums ist entscheidend für das Produktspektrum von *L. lepideus*. So kommt es, wenn Isoleucin als einzige N-Quelle angeboten wird, zur vornehmlichen Bildung von Sesquiterpenen [HANSSEN, 1979]. Die Wachstumsrate in SNL-B₁ war nur sehr gering. Während in SNL-Hefe und Leatham-Medium etwa 350 mg 100 mL⁻¹ Biotrockenmasse gebildet wurden, lag der Ertrag hier gerade bei 40 mg 100 mL⁻¹. Der Zusatz von Calcium hatte keinen weiteren Effekt. Calcium hat auf einige Pilze eine wachstumsfördernde Wirkung [HANSSEN, 1979].

3.6.2 Bildung flüchtiger Metabolite

3.6.2.1 Untersuchung von Sammelproben

Produktspektrum und Konzentrationsverhältnisse der Metabolite, die im Screening mittels SPME bestimmt worden waren, konnten nach Flüssig/flüssig-Extraktion in Qualität und Quantität bestätigt werden (Tabelle 2-53, S. 56). Lediglich bei trans-Zimtsäure wurde eine nicht zu erklärende Diskrepanz registriert. Hier wie in den nachfolgenden Untersuchungen zeigte sich, daß trans-Zimtsäure – abweichend von den Ergebnissen des Screenings – stets in dunkel geführten Kulturen in einer höheren Konzentration vorliegt als in belichteten Kulturen.

Auffällig war die große Zahl an Methylestern aromatischer Säuren, die von *L. lepideus* ins Medium abgegeben wurden. Der kräftige balsamische, an Zimt und Anis erinnernde Geruchseindruck des Pilzes läßt sich auf dieses Estergemisch zurückführen.

Unter den gebildeten Estern befand sich auch der Methylester der trans-4 Methoxyzimtsäure (4-MZS-ME). Dessen Konzentrationsbestimmung in den Sammelproben ließ einen deutlichen positiven Effekt durch die UV-A-Belichtung erkennen (belichtet: 1,82, dunkel: 0,21 mg L⁻¹). In den belichteten Kulturen wurde zudem das cis-Isomer des Esters detektiert (4,43 mg L⁻¹). Es entsteht durch UV-A-induzierte Isomerisierung aus dem trans-Isomer [TOWERS UND YAMAMOTO, 1985]. Diese Reaktion ist reversibel. Stellt man die Summe der Konzentrationen von trans- und cis-4-MZS-ME aus der belichteten der Konzentration aus der dunkel geführten Kultur gegenüber, tritt der positive Belichtungseffekt um so stärker hervor (1,82 + 4,43 gegenüber 0,21 mg L⁻¹).

Auch beim Zimtsäuremethylester kommt es zu einer photoinduzierten trans-cis-Isomerisierung, die bei einem Vergleich zwischen belichteten und unbelichteten Kulturen berücksichtigt werden muß.

Die freien Säuren wurden zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung detektiert. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von WAT UND TOWERS [1977] überein. *L. lepideus* verfügt offensichtlich über ein sehr effektives Methylierungssystem.

Der Zusatz von L-Phenylalanin als Precursor hatte einen vergleichsweise geringen Effekt auf die Bildung phenolischer Metabolite durch *L. lepideus* (Tabelle 2-28, S. 22). Bezüglich des 4-MZS-ME war der Effekt in unsupplementierten Kulturen ausgeprägter. Auf den Zusatz von L-Phenylalanin konnte somit im weiteren Verlauf der Untersuchungen verzichtet werden. Der Pilz ist in der Lage, diese Substanzen über den Shikimatweg aus Glucose über L-Phenylalanin und Zimtsäure *de novo* zu synthetisieren [SHIMAZONO ET AL., 1958; TOWERS, 1976, OHTA ET AL., 1990A]. Die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase als entscheidendes Bindeglied zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel wurde sowohl in dunkel geführten wie auch in belichteten Kulturen nachgewiesen (Abbildung 2-9, S. 57). Die Enzymaktivität wurde durch Belichtung stimuliert. In dunkel und in belichtet geführten Kulturen war die Aktivität im Kulturverlauf gleichermaßen rückläufig. Dieser Effekt wurde ebenso bei *N. niveo-tomentosa* beobachtet [BÖKER, 1997].

3.6.2.2 Konzentrationsverlauf der Hauptmetabolite

Die Bestimmung von Metabolitenkonzentrationen aus Sammelproben ermöglicht, generelle Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturansätzen zu erkennen. Diese äußern sich in der Summe der während der Kultivierung eingetretenen Konzentrationsänderungen. Es ist davon auszugehen, daß Metabolite nicht stetig gebildet und im Medium akkumuliert werden, sondern daß vielmehr die Bildungsraten temporären Variationen unter-

worfen sind. Bei der Beobachtung der Medienkonzentrationen der in Tabelle 3-2 aufgeführten Metabolite über den gesamten Kulturverlauf wurde diese Vermutung bestätigt (2.2.3.4, S. 57 ff).

Tabelle 3-2: Über den Kulturverlauf im Medium von *Lentinus lepideus*, CBS 450.79 beobachtete Hauptmetabolite und ihre biochemische Herkunft, Strukturen s. **Abbildung 2-11**, S. 59

Metabolit	Herkunft
2-Methyl-1-propanol	Katabolismus von Valin
2-Methyl-1-butanol	Katabolismus von Isoleucin
3-Methyl-1-butanol	Katabolismus von Leucin
Phenylmethanol	Phenylalanin-Zimtsäure-Stoffwechselweg
2-Phenyl-1-ethanol	– " –
3-Phenyl-1-propanol	– " –
Zimtsäuremethylester	– " –
p-Anissäuremethylester	– " –
4-Methoxyzimtsäuremethylester	– " –
Isovanillinsäuremethylester	– " –

Die Konzentrationsentwicklung von p-Anissäure- und Isovanillinsäuremethylester sowie der niederen Alkohole korrelierte mit der Biomassebildung. Bedingt durch gleichbleibende Enzymaktivitäten wurden die Substanzen bis zum Erreichen des Biomassemaximums akkumuliert. Mit dem Verbrauch der C-Quelle nahmen die Konzentrationen der Alkohole wegen rückläufiger Bildungsraten und weiterer Metabolisierung ab. Die UV-A-Belichtung hatte einen nachteiligen Einfluß auf die Bildung dieser Metabolite.

Die Konzentration des Zimtsäuremethylesters erreichte bereits am 10. Kulturtag ein Maximum. Der anschließende langsame Rückgang deutet darauf hin, daß durch regulative Prozesse das erreichte Konzentrationsniveau nicht aufrecht erhalten wurde. Der weitere Umsatz des Intermediats Zimtsäuremethylester überwiegt dessen Neusynthese. Der Rückgang der PAL-Aktivität kann nicht die alleinige Ursache für den Rückgang darstellen, da andere aromatische Substanzen weiterhin akkumuliert werden. Auch auf die Konzentration des Zimtsäuremethylesters wirkt sich die UV-A-Belichtung negativ aus (max. 95 mg L⁻¹ in der dunkel geführten Kultur, 65 mg L⁻¹ bei Belichtung). Im Gegensatz zur dunkel geführten Kultur wurde am 21. Kulturtag ein Nebenmaximum verzeichnet, das auf eine Enzymaktivierung zurückzuführen war (vgl. 3.6.2.3).

Die Konzentrationsverläufe der aromatischen Alkohole machen deutlich, daß durch die UV-A-Belichtung in größerem Maße in Regulationsmechanismen eingegriffen wurde. In Dunkelheit war der bereits beschriebene Konzentrationsverlauf zu beobachten. Bei Belichtung waren zwei Maxima auf geringem Niveau (0,4 am 7. und 0,9 mg L⁻¹ am 21. Kulturtag für 2-Phenyl-1-ethanol, die beiden anderen Alkohole noch darunter) zu verzeich-

nen. Über die Ursachen dieser Konzentrationsentwicklung kann nur spekuliert werden (s. u.).

Ein ähnlicher Kurvenverlauf war bei der Bildung des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters sowohl in dunkel als auch in belichtet geführten Kulturen zu verzeichnen. In Dunkelheit sank die Konzentration von $3,4 \text{ mg L}^{-1}$ am 7. Kulturtag auf ein Minimum ab und erreichte in einem zweiten Maximum gegen Ende der Kultivierung etwa $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Im Gegensatz zu allen anderen beobachteten Metaboliten führte die UV-A-Belichtung hier zu einem Anstieg der Konzentration auf ein Niveau von etwa 6 mg L^{-1} . Am 19. Kulturtag kam es zu einem sprunghaften Anstieg auf schließlich 20 mg L^{-1} .

OHTA ET AL. [1990B] beschrieben die Korrelation des ersten Konzentrationsmaximums mit dem Verbrauch der Stickstoffquelle. Der Konzentrationsanstieg zum zweiten Maximum wurde auf den Verbrauch der Kohlenstoffquelle zurückgeführt (Beginn bei 60%igem Verbrauch).

Da dieser Zusammenhang in gleichem Maße belichtete und unbelichtete Kulturen betrifft, müssen noch weitere Faktoren Einfluß auf die Konzentrationsentwicklung nehmen. Photo-regulation auf enzymatischer Ebene ist eine denkbare Erklärung.

Die beobachteten Effekte sind eindeutig auf Licht mit einer Wellenlänge $<400 \text{ nm}$ zurückzuführen. Bei Belichtung mit einer im Blau- und Rotbereich emittierenden Pflanzenleuchte („Fluora“) (s. S. 63 ff) waren die Metabolitenkonzentrationen vergleichbar mit den in unbelichteten Kulturen bestimmten. Die Ausnahme bildete auch hier der Konzentrationsverlauf des 4-MZS-ME. Der Anstieg gegen Ende der Kultivierung blieb aus. Während auch in Dunkelheit eine enzymatische Grundaktivität zur Bildung vorhanden ist, wird diese offensichtlich durch den Lichteinfluß vollends gehemmt. Es ist anzunehmen, daß der wirksame Spektralbereich im Blaubereich liegt. Effekte durch Rotlicht wurden bislang für Pilze nicht beschrieben, jedoch zahlreiche Blaulichteffekte (Tabelle 3-1, S. 90). UV-A- und Blaulicht haben demnach antagonistische Wirkungen. KUMAGAI [1984] beschrieb solche Effekte bei der Induktion der Conidienbildung für verschiedene Pilze. Hier erschließen sich Parallelen zur Hellrot/Dunkelrotregulierung des Phytochromsystems in Pflanzen [SITTE ET AL., 1991]. Bei der Kombination beider Lampentypen (s. S. 67 ff) äußerte sich die gegenläufige Wirkung von UV-A- und Blaulicht durch eine Abschwächung der Effekte. Das Konzentrationsniveau des 4-MZS-ME lag bei $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, der Anstieg ab dem 17. Kulturtag resultierte in einer Endkonzentration von lediglich 10 mg L^{-1} . Es ist denkbar, daß die methodisch bedingte Reduzierung der Strahlungsintensität (2 „Fluora“- , 1 UV-A-Leuchte) ebenfalls einen Einfluß auf den Gesamteffekt hatte. Nach BÖKER [1997] hat die Beleuchtungsintensität jedoch eine untergeordnete Bedeutung. Ausschlaggebend für die Wirkung ist die Beleuchtungsdauer [AVALOS UND SCHROTT, 1989; KUMAGAI, 1984].

Mehrfach wurde berichtet, Licht habe keinen Einfluß auf die Bildung von 4-Methoxyzimtsäuremethylester [BISCHOF, 1969; WAT UND TOWERS, 1977; HANSEN, 1979]. Diese globale Aussage trifft jedoch so nicht zu. In den entsprechenden Untersuchungen wurde die Belichtung im Tageslicht durchgeführt. Es ist anzunehmen, daß die beobachtete Konzentrationsverminderung auf die Wirkung des Blaulichtanteils im sichtbaren Licht zurückzuführen war. Hier besteht somit Übereinstimmung mit der durch Belichtung mit der „Fluora“-Leuchte hervorgerufenen Konzentrationsverminderung. Eine mögliche Wirkung von UV-Licht wurde in den angeführten Studien nicht berücksichtigt, konnte jedoch in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden.

Bei der Betrachtung der Metabolitenkonzentrationen muß berücksichtigt werden, daß es sich bei den beobachteten Substanzen um Intermediate handelt. Diese können weiter umgesetzt und damit der Erfassung entzogen werden. Mehrere Ursachen für Konzentrationsdifferenzen sind denkbar.

- niedrige oder sinkende Konzentration:
 - Die Bildung wird durch Enzyminaktivierung oder Eduktlimitierung gehemmt.
 - Eine Folgereaktion wird aktiviert.
- hohe oder steigende Konzentration:
 - Enzyme zur Bildung werden stimuliert.
 - Es kommt zur Akkumulation, da eine Folgereaktion gehemmt wird.

3.6.2.3 Enzymatische Untersuchungen zur Genese von 4-Methoxyzimtsäuremethylester

Die Bildung des 4-MZS-ME aus L-Phenylalanin kann über zwei Wege führen. Beide Wege verlaufen über Zimtsäure (Phenylalanin-Ammonium-Lyase, PAL). Auf dem Hauptweg wird diese zum Zimtsäuremethylester methyliert (O-Methyltransferase 1, OMT 1). Dieser wird in 4-Position hydroxyliert (4-Hydroxylase) und anschließend auch in dieser Position methyliert (OMT 2). Alternativ kann Zimtsäure zur p-Cumarsäure hydroxyliert und anschließend durch OMT 1 und OMT 2 methyliert werden (Abbildung 3-5, S.113) [OHTA ET AL., 1991].

Die Bildung des 4-MZS-ME wurde durch die Belichtung mit Blaulicht unterbunden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß im Stoffwechselweg der Hydroxylierungsschritt betroffen ist. Zimtsäure wurde in gleichem Maße methyliert wie in unbelichteten Kulturen.

Wäre die Methylierung betroffen, wäre die Akkumulation von p-Cumarsäure (OMT 1) oder p-Cumarsäuremethylester (OMT 2) die Folge gewesen. Zudem ist bekannt, daß Zimtsäure-4-Hydroxylasen in Pflanzen durch UV-Licht induziert werden und ein regulatives Element des Phenylpropanoidstoffwechsels darstellen [PIERREL ET AL., 1994; KOOPMANN UND HAHLBROCK, 1997]. Bei gegenläufiger Wirkung von UV- und Blaulicht wäre eine Enzymhemmung bei Belichtung mit der „Fluora“-Leuchte die Folge.

Um den möglicherweise gehemmten Reaktionsschritt zu supplementieren, wurde den Kulturen L-Tyrosin (5 mmol L^{-1}), p-Cumarsäure ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) bzw. p-Cumarsäuremethylester ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) zugesetzt (s S. 71 ff). Jede der drei Substanzen trägt bereits eine OH-Gruppe in 4-Stellung.

In keinem Fall wurde die Erhöhung des 4-MZS-ME beobachtet. *L. lepideus* weist eine Tyrosin-Ammonium-Lyase-Aktivität auf [OHTA ET AL., 1991]. L-Tyrosin wurde offensichtlich jedoch nicht auf dem Stoffwechselweg umgesetzt, der zu 4-MZS-ME führt. Aus der Bestimmung der p-Cumarsäure-Konzentration im Medium wurde deren rasche Metabolisierung ersichtlich. Die Bildung des 4-MZS-ME wurde jedoch nicht registriert. Möglicherweise wurde die p-Cumarsäure extrazellulär umgesetzt. Die Dimerisierung der Säure durch eine extrazelluläre Laccase wurde von KATASE UND BOLLAG [1991] in Kulturen von *Trametes versicolor* beschrieben. Durch Zusatz des p-Cumarsäuremethylesters wurde das Wachstum des Pilzes stark eingeschränkt. Die fungizide Wirkung zahlreicher Zimtsäurederivate, darunter p-Cumarsäuremethylester, ist bekannt [BUSWELL UND ERIKSSON, 1994, DAAYF ET AL., 1997]. Die ungewöhnlich starke Wirkung auf *L. lepideus* war nicht zu erwarten, da der Pilz selbst entsprechende Zimtsäurederivate *de novo* synthetisiert. Gewöhnlich üben Konzentrationen $<1 \text{ mmol L}^{-1}$ keine hemmende Wirkung auf Pilze aus.

Der exogene Zusatz in 4-Stellung hydroxylierter Aromaten war somit nicht geeignet, die Bildung des 4-Methoxyzimtsäuremethylesters zu fördern.

Bei der späteren Bestimmung der Enzymaktivitäten im Zellhomogenat wurde festgestellt, daß die 4-Hydroxylierung nicht, wie zunächst angenommen, das regulierende Element bei der Bildung des 4-MZS-ME darstellt.

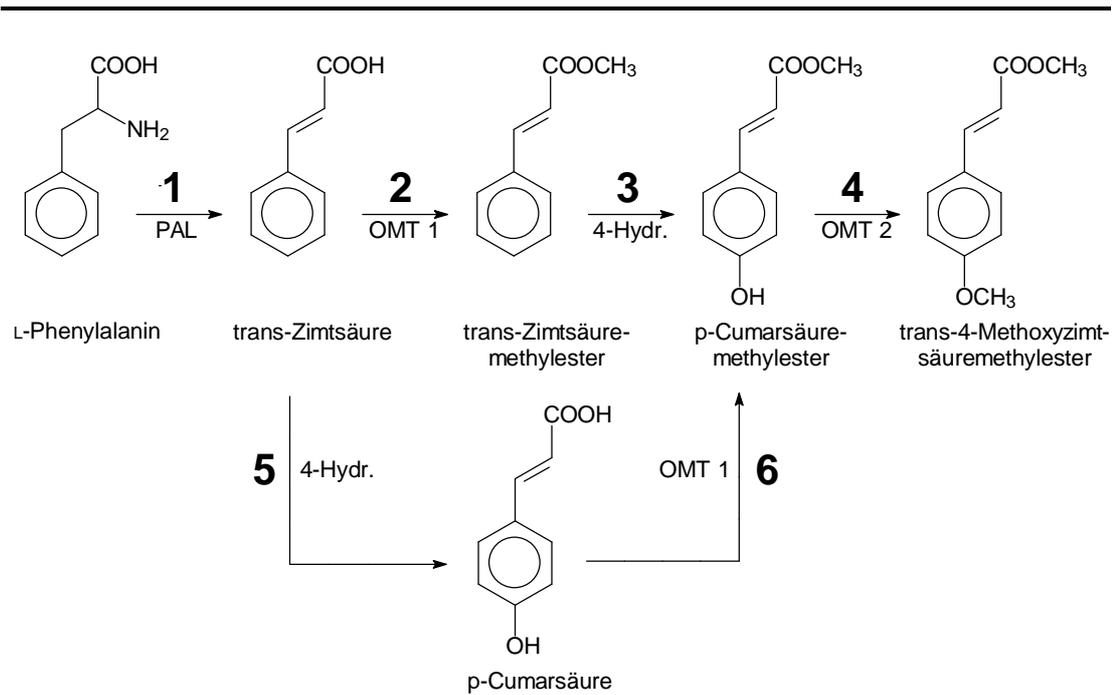


Abbildung 3-5: *Lentinus lepideus*, CBS 450.79: Einfluß von UV-A-Licht auf Enzymaktivitäten bei der Biogenese von 4-Methoxyzimtsäuremethylester, Erläuterungen im Text

Alle Enzymaktivitäten der Reaktionskette von L-Phenylalanin bis zum 4-MZS-ME wurden in UV-A-belichteten und dunkel geführten Kulturen nachgewiesen (2.2.3.7, S. 70 ff). Über die Substratspezifitäten und den resultierenden Umsatzraten wurde die von OHTA ET AL. [1991] postulierte Unterscheidung eines Hauptweges und eines untergeordneten Alternativweges bestätigt.

Trans-Zimtsäure (Abbildung 3-5, (2)) wurde von der OMT 1 um den Faktor 3 besser als Substrat akzeptiert als p-Cumarsäure (Nebenweg, (6)). Die 4-Hydroxylierung des trans-Zimtsäuremethylesters (3) wurde etwa doppelt so schnell katalysiert wie die 4-Hydroxylierung der trans-Zimtsäure (Nebenweg, (5)).

Wie bereits beschrieben, wurde die PAL-Aktivität (1) durch Belichtung der Kulturen stimuliert (s. S. 108). Dieser Effekt ist auch für andere Pilze bekannt [VANCE ET AL., 1975; BÖKER, 1997]. Die Aktivität nahm über den Kultivierungszeitraum ab. UV-A-Licht hatte einen deutlich positiven Einfluß auf die OMT 1-Aktivität (2). Zwischen dem 12. und dem 17. Kulturtag stieg die Aktivität auf ein Nebenmaximum an, das mit dem Nebenmaximum der trans-Zimtsäuremethylesterkonzentration korrelierte. Die 4-Hydroxylierung des trans-Zimtsäuremethylesters (3) lief bei Belichtung schneller ab als in Dunkelheit. Von Hydroxylasen ist bekannt, daß sie durch Licht induziert werden können (s. o.). Aus der Aktivitätsentwicklung der 4-Hydroxylasen ist der Konzentrationsanstieg des 4-MZS-ME nicht abzuleiten. Dieser Anstieg läßt sich vielmehr aus dem Aktivitätsverlauf der

OMT 2 (4) ableiten (Abbildung 2-34, S. 75): Es gab zwei Aktivitätsmaxima, die mit dem Konzentrationsverlauf des 4-MZS-ME übereinstimmen. Die Aktivitätszunahme ist kurzfristig auch in der unbelichteten Kultur zu verzeichnen. Auch dieser Befund stimmt mit dem Konzentrationsverlauf des Produkts überein. Bei Belichtung ist die Stimulation weitaus stärker und hält länger an, so daß auch die große Konzentrationsdifferenz des Esters zwischen belichteter und unbelichteter Kultur erklärt werden kann.

Die Umsetzung auf dem Nebenweg ist offensichtlich kaum lichtabhängig. Die Aktivitätsdifferenzen sind kaum nennenswert. Während der Aktivitätsverlauf der OMT 1 mit beiden Substraten (Hauptweg: trans-Zimtsäure (2), Nebenweg: p-Cumarsäure (6)) vergleichbar war, zeigte die 4-Hydroxylierung einen zeitlichen Versatz. Die Hydroxylierung der trans-Zimtsäure (Nebenweg, (5)) steigt zunächst an und erreicht am 7. Kulturtag ein Maximum. Auf dem Hauptweg ist die Enzymaktivität von Beginn an rückläufig. Dieser Befund spricht dafür, daß es sich hier um zwei verschiedene Enzyme handelt.

Auf welchem Mechanismus die Aktivitätssteigerung beruht, ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu erklären. Denkbar sind sowohl eine Regulation des Enzyms als auch die Regulation auf genetischer Ebene.

3.7 Beeinflussung der Wachstumseigenschaften

Im Screening (2.1, S. 4 ff) fiel häufig die unbefriedigende Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze negativ ins Gewicht. Während bei prokaryontischen Mikroorganismen oder Hefen die Verdopplung der Zellzahl meist innerhalb von Stunden zu beobachten ist (Teilungsrate von *E. coli*: $\sim 3 \text{ h}^{-1}$), bedarf es dafür bei filamentösen Pilzen oft Tage. Daraus resultierende Kultivierungsperioden von mehr als 4 Wochen bei Submerskultivierung sind jedoch für die Laborarbeit nicht akzeptabel. Um betreffende Stämme trotzdem für weitere Untersuchungen zugänglich zu machen, wurde versucht, die Wachstumsrate der Pilze zu erhöhen (2.3, S. 78 ff).

Neben dem bisweilen sehr langsamen Wachstum mehrerer Basidiomyceten zeigte sich in den Screening-Versuchen, daß nur in wenigen Fällen die in der Literatur für die Fruchtkörper beschriebenen Geruchseindrücke und Pigmentierungen auftraten. Diese beiden Eigenschaften waren jedoch die maßgeblichen Kriterien zur Auswahl der untersuchten Pilze.

Es liegt nahe, daß die Pilze bei den gewählten Kulturbedingungen (komplexes Nährmedium, Submerskultivierung, Lichtbedingungen) andere Eigenschaften ausprägen als an ihrem natürlichen Standort oder bei Kultivierung unter abweichenden Bedingungen. Schon lange ist der Einfluß der Medienzusammensetzung auf die Produktion von Sekun-

därmetaboliten bekannt. Als Beispiel sei hier die Bildung von Terpenen durch verschiedene Spezies von *Ceratocystis* und mehrere Stämme von *Lentinus lepideus* genannt [SPRECHER UND HANSEN, 1982]. Während von *L. lepideus* in komplexen Nährmedien hauptsächlich flüchtige Zimtsäurederivate gebildet wurden, führte die Kultivierung in einem synthetischem Medium auf Basis von Glucose, Isoleucin und Thiamin zur nahezu ausschließlichen Bildung verschiedener Sesquiterpene [HANSEN, 1985].

Doch auch stammspezifische Unterschiede als mögliche Ursache dürfen hier nicht unterschätzt werden. GROSS ET AL. [1989] zeigten, daß verschiedene Stämme des Weißfäulepilzes *Phlebia radiata* bei gleichen Kulturbedingungen individuelle Geruchseindrücke vermittelten, was sich deutlich in der gaschromatographischen Untersuchung der Kulturmedien widerspiegelte. Bei Studien zur Bildung von Benzaldehyd wurde eine ähnliche Variabilität auch für *Ischnoderma benzoinum* evident [FABRE ET AL., 1996].

Es galt, durch gezielte Maßnahmen sowohl das Wachstum der Pilze zu stimulieren als auch Einfluß auf die sensorischen Eigenschaften zu nehmen. Anstatt den klassischen Weg über eine Veränderung der Nährmedienzusammensetzung zu beschreiten, wurde alternativ versucht, durch den Einsatz von Effektoren Einfluß auf die Wachstumseigenschaften der Pilze zu nehmen (2.3, S. 78 ff). Als Teststämme wurden folgende Pilze gewählt:

1. *Clitocybe odora*, CBS 131.44 (2.1.6, S. 10). Die Wachstumsrate war moderat, der schwache, uncharakteristische Geruchseindruck wich vom kräftigen Anisaroma des Fruchtkörpers ab.
2. *Hypomyces odoratus*, CBS 764.68. Der Pilz wuchs langsam. Der Geruch der Submerskultur war schwach und uncharakteristisch, während in der Literatur ein kampherartiges Aroma beschrieben wurde (2.1.15, S. 18).
3. *Marasmius scorodonius*. CBS 850.87. Der in Submerskultur langsam wachsende Pilz bildete nicht den charakteristischen Knoblauchgeruch des Fruchtkörpers aus (2.1.23, S. 26).

Um ein Zusammenwirken der Zusätze mit unbekanntem Komponenten des bis dahin eingesetzten Komplexmediums (SNL-Hefe) auszuschließen, wurde die Studie in einem synthetischen Medium (SNL-B₁) durchgeführt. UV-A-Licht als weiterer Parameter sollte zunächst nicht in die Untersuchung einbezogen werden. Die Pilze wurden bei Umgebungslicht kultiviert.

3.7.1 Einsatz von Phytohormonen

Phytohormone sind pflanzliche Signalmoleküle, die Wachstum, Differenzierung und Reaktionen auf äußere Einflüsse regulieren. Die Wirkungsmechanismen sind sehr komplex und noch weitgehend unverstanden. Dennoch finden sie breite Anwendung bei der Kultivierung pflanzlicher Zelllinien. Die Eigenschaften der wichtigsten Gruppen sind in Tabelle 3-3 wiedergegeben. Ohne den Zusatz von Effektoren wäre die Differenzierung der Kalli – langsam wachsender, ungeordneter Zellaggregate – zu spezialisierten Geweben oder Pflanzen mit Sproß und Wurzel nicht gegeben [KRIKORIAN, 1995].

Beispielsweise ermöglicht der kombinierte Einsatz von Auxinen und Cytokininen in der Pflanzenzucht die großtechnische Pflanzenvermehrung über sogenannte „ewige Zelllinien“. Kalluskulturen können unendlich vervielfältigt werden. Durch einen Überschuß an Auxinen wird in den undifferenzierten Kalli die Wurzelbildung induziert, anschließend wird in der Jungpflanze durch Erhöhung der Cytokininkonzentration die Sproßbildung ausgelöst. Die Pflanzenvermehrung auf diesem Wege ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung, da auch diffizil zu reproduzierende Pflanzenarten in großer Stückzahl vermehrt werden können [KRIKORIAN, 1995].

Die angewandten Dosen und Konzentrationen stützen sich nach wie vor auf empirische Untersuchungen und können von Pflanze zu Pflanze stark variieren.

Tabelle 3-3: Übersicht über die wichtigsten Gruppen der Phytohormone und ihrer Charakteristika [DAVIES, 1995]

Gruppe/Substanz	Charakteristika
Abscisinsäure	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibierung zahlreicher Vorgänge (Wachstum, Öffnung der Stomata) • Auslöser der Ruhephase • Aktivierung der Insektenabwehr (Enzymaktivierung)
Auxine	<ul style="list-style-type: none"> • Hauptvertreter: Indolessigsäure (IAA) • Stimulation der Polyaminsynthese (s. u.) • Induktion von Zellvergrößerung und -teilung • Induktion der Zelldifferenzierung • Induktion der Wurzelbildung • Verzögerung von Alterungsprozessen und Reifung
Brassinosteroide	<ul style="list-style-type: none"> • bisher über 60 verschiedene Steroide bekannt • Aktivierung des Stengelwachstums • Inhibierung des Wurzelwachstums • Aktivierung der Ethylenproduktion
Cytokinine	<ul style="list-style-type: none"> • Hauptvertreter: Kinetin und Zeatin • Induktion der Zellteilung • Induktion der Knospung • Induktion der Sproßbildung • Blattvergrößerung durch Zellstreckung • Stimulation der Chloroplastenentwicklung
Ethylen	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivierung von Reifungsprozessen • Fördert Alterungsprozesse • Fördert die Abwehr von Mikroorganismen • Signalmolekül zwischen Pflanzen („Alarmsignal“)
Gibberelline	<ul style="list-style-type: none"> • Hauptvertreter: Gibberellinsäure, bisher über 90 bekannte Derivate, darunter mehrere inaktive Vorstufen • Stimulation von Stengelwachstum durch Induktion der Zellstreckung und -teilung • Induktion der Saatkeimung
Jasmonate	<ul style="list-style-type: none"> • Jasmonsäure und Jasmonsäuremethylester • Inhibierung zahlreicher Vorgänge • Fördert Alterung • Fördert Reifung (Blüten, Früchte,...) • Aktivierung der Abwehr gegen Schädlinge
Polyamine (PA)	<ul style="list-style-type: none"> • Putrescin, Spermidin, Spermin • lebensnotwendig für Zellen • sehr breites Wirkungsspektrum, u. a.: • Stimulation des Zellwachstums • Induktion der Zellteilung • Wirkung auf die Morphogenese

Die Vermutung liegt nahe, daß auch Pilze auf die potenten Phytoeffektoren ansprechen. Berührungspunkte zwischen Pilz und Pflanze und damit auch zwischen Pilz und Pflanzenhormonen sind in der Natur zahlreich gegeben. Die klassische Betrachtungsweise

sieht den Pilz dabei meist als Pathogen (Mehltau, Rostpilze,...), dessen Eindringen durch die Pflanze abgewehrt wird. Die Abwehr wird über Phytohormone reguliert. Dabei wirken diese zum Teil auch direkt auf den Pilz und hemmen Sporenkeimung und Wachstum.

Vermeint findet die Symbiose als positive Lebensgemeinschaft zwischen Pilz und Pflanze Beachtung (z. B. Mycorrhiza bei Leguminosen). Offensichtlich ist diese Vergesellschaftung weiter verbreitet als lange angenommen.

Es ist davon auszugehen, daß die Bildung und Entwicklung des Symbioseverbundes nicht ungeordnet und zufällig abläuft, sondern einer komplizierten Kontrolle unterworfen ist. Dabei geschieht die gegenseitige Beeinflussung der Partner über die Sezernierung von Phytohormonen. Nicht nur der Pilz manipuliert die Vorgänge des pflanzlichen Partners. Die Pflanze ihrerseits nimmt Einfluß auf Sporenkeimung, Wachstum und Eindringen des Pilzes in die Wurzel. Die Erkenntnisse über die Mechanismen sind allerdings noch gering. Aus Studien zur Wirkung von Phytohormonen auf Pilze geht hervor, daß Gibberelline, Abscisinsäure, Ethylen und Jasmonsäure sich nicht oder sogar negativ auf das Wachstum auswirken. Insbesondere bei den letztgenannten wird ein Zusammenhang mit ihrer Rolle in der pflanzlichen Abwehr von Schädlingen erkennbar (vgl. Tabelle 3-3). Cytokininen, Auxinen, Polyaminen und Brassinosteroiden wurde dagegen von verschiedenen Arbeitsgruppen eine positive Wirkung zugeschrieben (s. u.).

3.7.1.1 Cytokinine und Auxine

Cytokinine und Auxine sind die wohl gebräuchlichsten Phytoeffektoren in Pflanzenzellkulturen [KRIKORIAN, 1995]. Auch in mikrobiellen Systemen wurden bereits positive Effekte durch ihren Einsatz erzielt. Im Gegensatz zu den pflanzlichen Zellkulturen wurden die Hormone hier jedoch einzeln eingesetzt. Die beobachteten Reaktionen verschiedener Pilze waren unterschiedlich. Sowohl Wachstumsstimulation [GOGALA, 1991; FASIDI UND OLORUNMAIYE, 1994] wie auch Hemmung [FARAG ET AL., 1987] wurden beschrieben. Bei mehreren Pilzen waren die Zusätze ohne Wirkung [GOSH UND SENGUPTA, 1981; FASIDI UND AKWAKWA, 1996]. FARAG ET AL. [1987] zeigten eine Steigerung der Aflatoxinbildung in *Aspergillus parasiticus* durch Indoleessigsäure. Kinetin stimulierte die Öffnung des Fruchtkörperhutes von *Agaricus bisporus* [KOVÁCS, 1982].

Meist ließ sich eine Dosisabhängigkeit mit einem deutlichen Wirkungsmaximum erkennen. Eine zu hohe Konzentration des zugesetzten Hormons führte in jedem Fall zu einer negativen Wirkung.

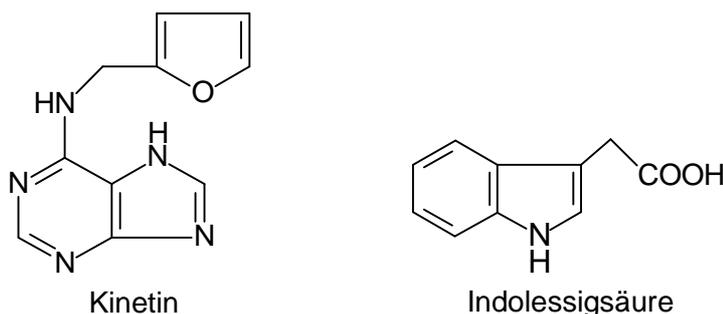


Abbildung 3-6: Struktur von Kinetin und Indoleessigsäure

Analog zur Anwendung in Pflanzenzellkulturen wurden Kinetin und Indoleessigsäure (IAA) bei den drei Teststämmen in Erwartung einer synergistischen Wirkung in Kombination eingesetzt (2.3.1.2, S. 82 ff).

Der Zusatz von Kinetin und IAA hatte keine Auswirkungen auf die Biotrockenmasse in Kulturen von *M. scorodoni*. Eine leichte Erhöhung des Feuchtmasse/Trockenmasseverhältnisses bei Erhöhung der Hormonkonzentration deutet auf eine Zellvergrößerung infolge verstärkter Wasseraufnahme hin. Bei Pflanzen wird dieser Effekt durch Auxine hervorgerufen (vgl. Tabelle 3-3, S.117).

Ob die indifferenten Ergebnisse bei *H. odoratus* auf eine Wirkung der Phytohormone zurückgeführt werden können, wurde nicht ersichtlich. Eine Stimulation des Wachstums ist jedoch offensichtlich auszuschließen.

Im Gegensatz zu den anderen beiden Testorganismen war die Reaktion von *C. odora* sehr deutlich (Abbildung 2-43, S. 83). Bei Konzentrationen von 0,1 und 0,5 mg L⁻¹ wurde im Vergleich zum Kontrollansatz nahezu eine Verdopplung der Biomasse erzielt. Eine weitere Erhöhung zeigte keinerlei Wirkung – der Wert entsprach dem Kontrollwert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Wirkung in Pflanzenzellkulturen und – sofern eine Reaktion ausgelöst wurde – bei verschiedenen anderen Pilzen (s. o.).

Die Reaktion von *C. odora* auf Kinetin und Indoleessigsäure in äquimolaren Konzentrationen warf die Frage nach der Wirkung divergierender Konzentrationsverhältnisse auf. In Pflanzenzellkulturen wird durch gezielte Änderung der Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung der Differenzierungsprozeß gesteuert [KRIKORIAN, 1995]. Das komplizierte Zusammenspiel der beiden Hormone spiegelte sich auch in der Anwendung auf *C. odora* wider (Abbildung 2-46, S. 85). Ein deutlicher Trend zu einer für die Biomassebildung optimalen Kombination war nicht eindeutig erkennbar. Es zeichnete sich ab, daß 0,5 mg L⁻¹ Kinetin kombiniert mit IAA im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 0,5 mg L⁻¹ einen Optimalbereich umspannten. Gleiche Werte wurden auch bei

einem Verhältnis von 0,1/0,5 mg L⁻¹ (Kinetin/IAA) erzielt. Dieses indifferente Bild kann sicherlich durch das breite Wirkungsspektrum der eingesetzten Phytohormone erklärt werden. Beiden wird ein Einfluß auf Zellvergrößerung und Zellteilung zugesprochen (Tabelle 3-3). Beim gemeinsamen Einsatz muß mit Synergismen genauso wie mit gegenläufigen Wirkungen gerechnet werden.

Auch bei pflanzlichen Systemen ist eine genaue Vorhersage der optimalen Verhältnisse nicht möglich [KRIKORIAN, 1995]. Die Bedürfnisse der einzelnen Spezies sind offensichtlich zu unterschiedlich.

Obwohl bei *C. odora* ein deutlich positiver Einfluß von Kinetin und Indoleessigsäure auf das Wachstum gezeigt werden konnte, wurde – wie auch bei den anderen beiden Testorganismen – kein Effekt bezüglich der sensorischen Eigenschaften erkennbar.

3.7.1.2 Brassinosteroide

Brassinosteroide tragen ein großes Potential, Wachstum und Differenzierungsprozesse bei Pilzen auszulösen. Wird das Mycel statisch kultivierter Basidiomyceten mit Brassinosteroiden behandelt, so wird sowohl das Wachstum angeregt als auch die Fruchtkörperbildung induziert. ADAM ET AL. [1991] erreichten bei *Psilocybe cubensis* und *Gymnopilus purpuratus* eine um den Faktor 2-3 erhöhte Wachstumsrate und eine Verkürzung der Kultivierungszeit bis zur Sporocarpbildung um ein Viertel. Die Zahl der gebildeten Fruchtkörper vervierfachte sich. Der Wirkungsmechanismus war derzeit jedoch nicht bekannt [CUTLER, 1992].

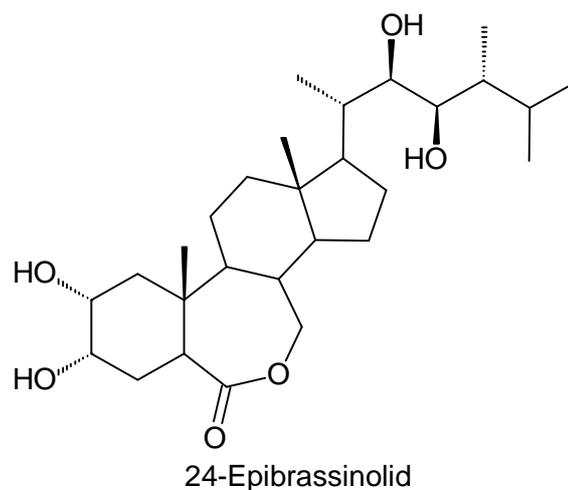


Abbildung 3-7: Struktur von 24-Epibrassinolid

Die bei statischer Kultivierung festgestellte Stimulation von *P. cubensis* und *G. purpuratus* war nicht auf die submers kultivierten Teststämme übertragbar. Während *H. odoratus* und *M. scorodoni* nicht auf den Zusatz des Steroids reagierten, wurde die Biomassebildung bei *C. odora* erheblich gehemmt. Bei allen Konzentrationen war ein Rückgang der Biomasse von 50% zu verzeichnen (Abbildung 2-47, S. 86). Morphologische Veränderungen, die auf einen Differenzierungsprozeß anlässlich einer Fruchtkörperinduktion hätten schließen lassen, wurden nicht beobachtet. Sensorische Veränderungen aufgrund des Phytoeffektors wurden nicht festgestellt. Möglicherweise ist der krasse Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen auf die Art der Kultivierung zurückzuführen.

3.7.1.3 Polyamine (PA)

Wie bei Pflanzen sind Polyamine für die Entwicklung von Pilzen essentiell [TABOR UND TABOR, 1985]. Eine Inhibierung der endogenen Polyaminsynthese kann durch exogen zugesetzte Polyamine supplementiert werden [GALSTON UND KAUR-SAWHNEY, 1995]. KHURANA ET AL. [1996] zeigten die Induktion des vegetativen Wachstums und den Einfluß der PA auf die Entwicklung von Conidien in *Aspergillus flavus* ($0,1-1,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Der Differenzierungsprozess in *Mucor rouxii* wird durch Polyamine eingeleitet [MARTINEZ-PACHERO ET AL., 1989]. Die Komplexität der PA-Wirkung spiegelt sich in den unterschiedlichen – teilweise gegenläufigen – Effekten bei den verschiedenen Organismen wieder.

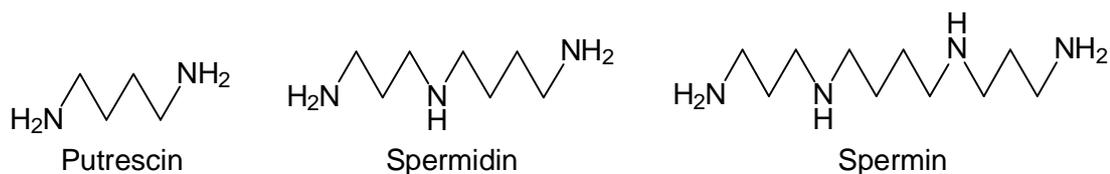


Abbildung 3-8: Struktur von Putrescin, Spermidin und Spermin

Die beschriebene Stimulation des vegetativen Wachstums hat sich bei den drei Teststämmen nicht bestätigt (2.3.1.1, S. 78 ff). Der Zusatz einer PA-Kombination führte bereits bei der geringsten Konzentration ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) zu einer Wachstumshemmung. Diese Konzentration lag deutlich unter den in der Literatur als stimulierend beschriebenen Konzentrationen. Der Hemmeffekt war deutlich dosisabhängig und verstärkte sich mit zunehmender Konzentration.

Bei Betrachtung der Einzelwirkung zeigte sich eine stammspezifische Wirkung. Auf *C. odora* hatte nur Spermin als das größte der drei Moleküle eine stark inhibitorische Wirkung. Bei den anderen beiden Stämmen war eine Verstärkung der Hemmwirkung mit zunehmender Molekülgröße erkennbar (Putrescin < Spermidin < Spermin). Dieser Effekt stimmt mit Beobachtungen bei *Tilletia caries* und *T. controversa* überein [TRIONE ET AL., 1988]. Über Gründe für die Wachstumshemmung läßt sich nur spekulieren.

Bezüglich der sensorischen Eigenschaften der Pilze war unter keiner der gewählten Bedingungen ein Effekt erkennbar.

3.7.2 Übertragung von Effektoren zwischen zwei Pilzstämmen

Gemessen am Glucoseverbrauch und der Länge der Kultivierungsdauer wies *Hypomyces odoratus*, CBS 553.80, eine etwa 4fach höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf als *H. odoratus*, CBS 764.68. Diese Differenz führte zur Hypothese, daß sich die beiden Stämme in ihrer Fähigkeit, wachstumsstimulierende Substanzen zu produzieren, unterscheiden.

Pilze geben zahlreiche biologisch aktive Substanzen in ihre Umgebung ab [CUTLER, 1995], Vor diesem Hintergrund wurde versucht, eine postulierte Minderproduktion in Stamm CBS 764.68 durch die Übertragung von Medium einer Kultur des schnellwachsenden Stammes zu supplementieren.

Der Austausch von Medium (5-, 10-, 20%ig) führte nicht zu einer Erhöhung der Wachstumsrate. Bei 20%igem Austausch war sogar ein Hemmeffekt zu beobachten. Morphologisch wie sensorisch kam es nicht zu Veränderungen.

Als mögliche Erklärungsansätze sind zu nennen:

- Es werden keine wachstumsstimulierenden Effektoren ins Medium abgegeben.
- Die Konzentration ist nicht ausreichend.
- Die Substanzen sind nicht stabil.
- Die Wirkung wird durch weitere Substanzen antagonisiert.
- Es werden Hemmstoffe ausgeschieden (Hemmung von Konkurrenten am natürlichen Standort).

3.7.3 Schlußbetrachtungen zum Einsatz von Mediatoren

Die Ergebnisse zeigen, daß die Wirkung von Phytohormonen auf das Wachstumsverhalten von Pilzen sehr heterogen ist. Die hemmenden Effekte sind möglicherweise die Folge nicht adäquater Dosierungen. Auch in pflanzlichen Systemen ist die Wirkung sehr stark von der Konzentration des eingesetzten Mediators abhängig. Positive Effekte werden nur

in sehr engen Grenzen erzielt. Die Stimulation des Wachstums von *C. odora* durch die Kombination von Kinetin und Indolelessigsäure gibt jedoch Anlaß zur Annahme, daß bei Pilzen ebenfalls eine Anwendung von exogenen Mediatoren möglich ist. Die unterschiedlichen Reaktionen der Testorganismen läßt jedoch vermuten, daß die Wirksamkeit nur bei einer begrenzten Zahl von Pilzen gegeben ist. In jedem Fall bedarf es, wie auch bei Pflanzenzellkulturen, Voruntersuchungen, um optimale Anwendungsparameter zu bestimmen. Möglicherweise könnten so auch – im Gegensatz zu den Befunden dieser Versuchsreihe – sensorische Eigenschaften der Pilze beeinflusst werden.

Da die angestrebten Effekte in dieser Studie nur in Ansätzen erkennbar wurden, wurde von Untersuchungen bei verschiedenen Belichtungsverhältnissen und der Anwendung auf weitere Pilze vorerst abgesehen.

3.8 Abschließende Betrachtungen und Ausblick

Die Ergebnisse des Screenings (2.1, S. 4 ff) zeugen davon, daß der Einfluß von Licht, insbesondere von UV-A-Licht, auf die Bildung flüchtiger Metabolite nicht vernachlässigt werden darf. Etwa bei der Hälfte der untersuchten Pilze wurden lichtbedingte Konzentrationsänderungen verschiedener Metabolite festgestellt.

Bei *Lentinus lepideus* (2.2.3, S. 53 ff) führte die Belichtung mit UV-A-Licht zu einer Steigerung der Konzentration von 4-Methoxyzimtsäuremethylester auf bis zu 20 mg L⁻¹. In dunkel geführten Kulturen dagegen erreichte die Konzentration lediglich 6 mg L⁻¹, in mit Blaulicht bestrahlten Kulturen sogar noch darunter. Es konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivitäten der Genese des 4-MZS-ME einer Photoregulation unterliegen. Über eine generelle Stimulierung der Aktivitäten hinaus wurde eine temporale Aktivitätsmodulation der O-Methyltransferasen festgestellt.

In erster Linie waren Auswirkungen der Lichteinstrahlung auf die Bildung phenolischer Metabolite zu erkennen (Tabelle 2-47, S. 37). Diese Beobachtung führt zu der Annahme, daß weitere Enzymaktivitäten des Zimtsäurestoffwechsels durch Licht beeinflusst werden. Die Arbeiten von BÖKER [1997] und NAMBUDIRI ET AL. [1973] unterstützen diese Annahme. Diese Hinweise legen nahe, auch den möglichen Belichtungseinfluß auf die Genese bedeutsamer Aromastoffe wie Vanillin oder Benzaldehyd zu untersuchen.

Die Frage nach den Mechanismen der Aktivitätsmodulation blieb bisher unberücksichtigt. Es ist offen, ob die Regulationsmechanismen entsprechende Enzyme direkt beeinflussen oder bereits auf genetischer Ebene wirken.

Daß die beobachteten Effekte nicht grundsätzlich auf Photoregulation von Enzymaktivitäten zurückzuführen waren, zeigten die Untersuchungen an *B. adusta* und *G. odoratum* (2.2.2, S. 45 ff und 2.2.1, S. 39 ff). Es ist anzunehmen, daß im Falle von *G. odoratum* die Ursache der erhöhten Konzentration von C₈-Verbindungen in einer Schädigung der Zellen lag. Der vermeintlich positive Effekt der UV-A-Belichtung auf die Bildung der flüchtigen Metabolite war offensichtlich eine sekundäre Folgeerscheinung.

Im Screening wurde deutlich, daß die Belichtung neben stimulierenden Effekten ebenso hemmende Effekte hervorbrachte. Bei etwa 50% der lichtbedingten Effekte war eine Verminderung der Produktkonzentration in den belichteten Kulturen zu verzeichnen.

Diese Beispiele sollten als Hinweis gewertet werden, daß die Lichtverhältnisse während der Kultivierung von Pilzen nicht unbeachtet bleiben sollten. Die Ursachen für indifferentes Wachstum oder streuende Produktmengen sind möglicherweise in vielen Fällen lichtbedingt.

Bei der Arbeit mit Mikroorganismen werden seit jeher große Anstrengungen unternommen, Wachstum und Ausbeute der Zielsubstanzen zu steigern. Dabei werden unterschiedlichste Strategien verfolgt.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Phytohormone auf ihr Potential untersucht, Pilzwachstum und Bildung aromaaktiver Substanzen zu stimulieren (2.3, S. 78 ff). Die Kombination von Kinetin und Indoleessigsäure wirkte in wenigen Konzentrationsverhältnissen stimulierend auf das Wachstum von *C. odora*. Bereits in anderen Studien wurden positive Effekte von Phytohormonen auf die Entwicklung einzelner Pilze beschrieben [ADAM ET AL., 1991; GOGALA, 1991; KHURANA ET AL., 1996; KOVÁCS, 1982]. Da die Ergebnisse bislang kontrovers sind, bedarf es hier noch weitreichender Untersuchungen. Unter Berücksichtigung der großen Bedeutung exogener Effektoren bei der Kultivierung pflanzlicher Zelllinien ist es denkbar, auch bei Pilzen Wirkungen zu erzielen. Möglicherweise kann auf diesem Wege zukünftig Zugriff auf langsam wachsende Pilze erhalten werden.

Neben den flüchtigen Aromastoffen gilt Exopolysacchariden großes Interesse. Sie finden breite industrielle Anwendung als Verdickungsmittel, Füllstoffe etc. Zudem wird ihnen pharmakologische Wirkung zugeschrieben. Vielfach gehen daher die Bestrebungen dahin, die Exkretion dieser Substanzen zu fördern, um sie als Produkt zu verwerten.

Gilt es jedoch, weitere Produkte wie z. B. flüchtige Aromastoffe aus dem Medium zu gewinnen, stören die Exopolysaccharide die Extraktionsverfahren. Dies kann soweit führen, daß die Extraktion nicht effektiv durchgeführt werden kann. Entgegen den Bemühungen, die Exkretion der Polysaccharide als wertvolles Produkt zu steigern, müssen hier Maßnahmen ergriffen werden, um ihre Bildung zu reduzieren.

In Versuchen mit *G. odoratum* (2.2.1.3, S. 42 ff) wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um dieses Ziel zu erreichen. Unter anderem wurde die Zusammensetzung des Nährmediums variiert. In Ansätzen konnte gezeigt werden, daß diese Maßnahme erfolgversprechend ist. Obwohl in diesem Fall keine Verbesserung eintrat, wurde deutlich, daß diese Vorgehensweise potentiell geeignet ist, dem Problem zu begegnen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Mikrobiologie

4.1.1 Pilzkulturen

Tabelle 4-1: Namen und Bezugsquellen der untersuchten Basidiomyceten

wissenschaftlicher Name		Stammnummer
<i>Agrocybe praecox</i>	(Person:Fries) Fayod	CBS 108.59
<i>Bjerkandera adusta</i>	(Willdenow:Fries) Karsten	CBS 414.48
<i>Clitocybe geotropa</i>	(Bulliard) Quélet	CBS 110.21
<i>Clitocybe nebularis</i>	(Batsch:Fries) Kummer	CBS 130.44
<i>Clitocybe odora</i>	(Bulliard:Fries) Kummer	CBS 131.44
<i>Collybia fusipes</i>	(Bulliard:Fries) Quélet	CBS 174.51
<i>Cortinarius odorifer</i>	Britzelmayr	CBS 517.95
<i>Cortinarius percomis</i>	Fries	CBS 130.42
<i>Cystoderma carcharias</i>	(Persoon) Fayod	CBS 157.47
<i>Cystostereum murrain</i>	(Berkeley & Curtis) Pouzar	CBS 257.73
<i>Exidia thuretiana</i>	(Léveillé) Fries	CBS 215.63
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	(Wulfen:Fries) Imazeki	CBS 444.61
<i>Hypomyces odoratus</i> *	Arnold	CBS 764.68
<i>Hypomyces odoratus</i> *	Arnold	CBS 553.80
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	(Wahlenberg:Fries) Karsten	CBS 311.29
<i>Lactarius deliciosus</i>	(Linnaeus:Fries) Gray	CBS 581.63
<i>Lactarius rufus</i>	(Scopoli:Fries) Fries	CBS 181.57
<i>Lentinus lepideus</i>	(Fries:Fries) Fries	CBS 450.79
<i>Lepista irina</i>	(Fries) Bigelow	CBS 366.47
<i>Lepista nuda</i>	(Bulliard:Fries) Cooke	CBS 300.58
<i>Lepista nuda</i>	(Bulliard:Fries) Cooke	DSM 8620
<i>Marasmius scorodoni</i>	(Fries:Fries) Fries	CBS 137.83
<i>Marasmius scorodoni</i>	(Fries:Fries) Fries	CBS 850.87
<i>Meripilus giganteus</i>	(Persoon:Fries) Karsten	CBS 561.86
<i>Paxillus involutus</i>	(Batsch:Fries) Fries	CBS 591.89
<i>Polyporus tuberaster</i>	Jacquin:Fries	CBS 786.84
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	(Jacquin:Fries) Karsten	CBS 353.63
<i>Rhodotus palmatus</i>	(Bulliard:Fries) Maire	CBS 275.33
<i>Sparassis crispa</i>	Wulfen:Fries	CBS 408.71
<i>Suillus granulatus</i>	(Linnaeus:Fries) Kunze	CBS 114.42
<i>Trametes hirsuta</i>	(Wulfen:Fries) Pilát	CBS 282.74

* Ascomyceten

Stammsammlungen:

CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande

DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

4.1.2 Kulturmedien

4.1.2.1 Flüssige Medien

In allen Standardnährmedien wurde die folgende Spurenelementelösung eingesetzt.

Tabelle 4-2: Spurenelementelösung für SNL

Komponente	Konzentration
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	5 mg L ⁻¹
FeCl ₃	80 mg L ⁻¹
MnSO ₄	27 mg L ⁻¹
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	90 mg L ⁻¹
Titriplex III	400 mg L ⁻¹
Wasser, demin.	ad 1000 mL

Nr. 1 Standard-Nährlösung mit Vitamin B₁ (SNL-B₁), pH 5,2

Tabelle 4-3: Nährlösung SNL-B₁

Komponente	Konzentration
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	0,5 g L ⁻¹
Thiaminhydrochlorid (Vit B ₁)	2 mg L ⁻¹
Spurenelementelösung	1,0 mL L ⁻¹
Wasser, demin.	ad 1000 mL

Das Thiaminhydrochlorid wurde aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (2 mg mL⁻¹) nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Nr. 2 Standard-Nährlösung mit Hefeextrakt (SNL-Hefe), pH 5,2

Tabelle 4-4: Nährlösung SNL-Hefe

Komponente	Konzentration
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	0,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Spurenelementelösung	1,0 mL L ⁻¹
Wasser, demin.	ad 1000 mL

Nr. 3 Nährlösung mit Lactose als C-Quelle

Das Medium wurde auf Basis der SNL-B₁ angesetzt. Die Glucose wurde durch 30 g L⁻¹ Lactose ersetzt.

Nr. 4 Nährlösung mit Malzextrakt als C-Quelle

Das Medium wurde auf Basis der SNL- B₁ angesetzt. Die Glucose wurde durch 30 g L⁻¹ Malzextrakt ersetzt.

Nr. 5 Nährlösung mit Saccharose als C-Quelle

Das Medium wurde auf Basis der SNL- B₁ angesetzt. Die Glucose wurde durch 20 g L⁻¹ Saccharose ersetzt.

Nr. 6 Nährlösung mit Stärke als C-Quelle

Das Medium wurde auf Basis der SNL- B₁ angesetzt. Die Glucose wurde durch 20 g L⁻¹ Stärke ersetzt.

Nr. 7 Nährlösung mit erhöhtem Stickstoffgehalt

Das Medium wurde auf Basis der SNL- B₁ angesetzt. Es wurden zusätzlich 3 g L⁻¹ NaNO₃ aus einer separat autoklavierten Stammlösung (300 mg mL⁻¹) zugesetzt.

Nr. 8 Nährlösung mit erhöhtem Calciumgehalt

Das Medium wurde auf Basis der SNL- B₁ angesetzt. Es wurden zusätzlich 73,5 mg L⁻¹ CaCl₂ x 2 H₂O (= 0,5 mmol L⁻¹) zugesetzt.

Nr. 9 Nährlösung nach Leatham [Miles und Chang, 1987], pH 4,0

Tabelle 4-5: Leatham-Medium

Komponente	Konzentration
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	2,0 g L ⁻¹
Mineralienlösung	1,0 mL L ⁻¹
Spurenelementelösung	1,0 mL L ⁻¹
Vitaminlösung	1,0 mL L ⁻¹
Wasser, demin.	ad 1000 mL

Die Vitaminlösung wurde aus einer sterilfiltrierten Stammlösung nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Tabelle 4-6: Mineralienlösung für Leatham-Medium

Komponente	Konzentration
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3,67 g L ⁻¹
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	14,1 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
HCl, konz.	0,5 mL L ⁻¹
Wasser, demin.	ad 1000 mL

Tabelle 4-7: Spurenelementelösung für Leatham-Medium

Komponente	Konzentration
CuSO ₄ x 6 H ₂ O	784 mg L ⁻¹
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	81 mg L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x H ₂ O	94 mg L ⁻¹
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	81 mg L ⁻¹
SnCl ₂ x 2 H ₂ O	38 mg L ⁻¹
HCl, konz.	2,0 mL L ⁻¹
Wasser, demin.	ad 1000 mL

Tabelle 4-8: Vitaminlösung für Leatham-Medium

Komponente	Konzentration
myo-Inosit	1,0 g L ⁻¹
Thiaminhydrochlorid	1,0 g L ⁻¹
Pyridoxalhydrochlorid	100 mg L ⁻¹
Niacin	100 mg L ⁻¹
Ca-D-Panthenat	100 mg L ⁻¹
p-Aminobenzoesäure	100 mg L ⁻¹
Riboflavin	100 mg L ⁻¹
Biotin	30 mg L ⁻¹
Folsäure	10 mg L ⁻¹
Cobalamin	10 mg L ⁻¹
Wasser, demin.	ad 1000 mL

Der pH-Wert der Medien wurde vor dem Autoklavieren mit HCl (2 N) eingestellt. Die Sterilisation erfolgte bei 121° C und 1 bar Überdruck für 20 min.

4.1.2.2 Feste Nährböden

Die SNL-Hefe wurde durch Zusatz von 1,5 % Agar-Agar verfestigt. Es wurden Platten (Ø 80 mm) mit 20 mL sowie Schrägagarröhrchen mit 8 mL Medium gegossen.

4.1.3 Kulturführung

4.1.3.1 Stammhaltung

Die Stammkulturen wurden auf Agarplatten sowie in Schrägagarröhrchen (4.1.2.2) bei 24 °C im Brutschrank kultiviert, bis die Oberfläche von einem dichten Mycel bedeckt war (je nach Pilzstamm zwischen 1 und 3 Wochen). Drohte bei längerer Kultivierung ein Austrocknen des Nährbodens, wurden 2 mL steriles Wasser auf die Oberfläche pipettiert. Zur Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C wurden die Platten und Röhrchen mit Parafilm versiegelt. Nach maximal 6 Monaten wurden aus den Randzonen der plattierten Kulturen Agarstücke (ca. 0,5-1,0 cm²) entnommen und auf frische Agarmedien umgesetzt.

4.1.3.2 Vorkulturen

Gut bewachsene Agarstücke (ca. 1,0 cm²) wurden aus der Randzone der Stammkulturen (4.1.3.1) entnommen, in Erlenmeyerkolben mit Flüssigmedien überführt und bei 24 °C und 150 U min⁻¹ im Rundschüttler inkubiert. Sobald Wachstum erkennbar war, wurden die Agarstücke mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (12000 U min⁻¹, 30 s).

Nach ca. 2 Wochen waren die Kulturen in der Regel hinreichend bewachsen, um als Inokulum für Vorkulturen eingesetzt zu werden. Die Inokulation erfolgte im entsprechenden Flüssigmedium 10%ig (v/v) nach Homogenisierung. Die Vorkulturen wurden bis zur ausreichenden Zelldichte für etwa 2 Wochen bei 24 °C und 150 U min⁻¹ auf einem Rundschüttler kultiviert, bevor das Mycel erneut homogenisiert wurde. Wurde für den Ansatz der experimentellen Kulturen ein großes Homogenatvolumen benötigt, wurden zuvor mehrere Vorkulturen in einem sterilen 500 mL Erlenmeyerkolben vereinigt.

Für die Versuche mit definierten Belichtungsverhältnissen wurden die Kolben der Vorkulturen durch Aluminiumfolie abgedunkelt.

4.1.3.3 Experimentelle Kulturen

Die experimentellen Kulturen wurden je nach Wachstumsverhalten der einzelnen Pilze 5-10%ig (v/v) mit Vorkulturhomogenat beimpft. Das vorgelegte Medienvolumen betrug, wenn nicht anders angegeben, 120 mL in einem 300 mL Erlenmeyerkolben. Um während des Animpfens eine gleichbleibende Inokulumqualität zu gewährleisten, wurde vor jedem Pipettierschritt der Kolben der Vorkultur kräftig umgeschwenkt.

In Versuchen zur Verbesserung des Pilzwachstums sollten bei verschiedenen Pilzen jeweils exakt die gleichen Inokulummengen eingesetzt werden. Dazu wurde zunächst durch

Vakuumfiltration eines Aliquots von 10 mL die Feuchtmasse des Vorkulturhomogenates bestimmt. Es wurde berechnet, welches Volumen des Homogenates zugesetzt werden mußte, um in der experimentellen Kultur eine Anfangsfeuchtmasse von $0,5 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ zu erzielen. Dieses Volumen wurde vor der Inokulation dem Kolben entnommen.

Die Kultivierung der Submerskulturen erfolgte bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ und 150 U min^{-1} im Rundschtüttler unter den je nach Versuchsanordnung gegebenen Lichtbedingungen.

Statische Oberflächenkulturen wurden 10%ig (v/v) beimpft und bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Das vorgelegte Medienvolumen betrug 120 mL in einem 500 mL Erlenmeyerkolben.

4.1.3.4 Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierung erfolgte in einem 2,5 L Labortischfermenter (Meredos), ausgestattet mit pH-Elektrode (Ingold) und pO_2 -Elektrode (Meredos). Die Belüftungsrate betrug $1,0 \text{ L min}^{-1} \text{ L}^{-1}$ Kulturmedium. Zu- und Abluft wurden durch ein Midisart 2000-Modul (PTFE-Membran, Porengröße $0,20 \text{ } \mu\text{m}$, Sartorius) sterilfiltriert. Die Rührerdrehzahl betrug 300 U min^{-1} . Der Bioreaktor wurde auf $24 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert.

Im Reaktor wurden 2,3 L Medium vorgelegt. Die Vorkultur (150 mL) wurde vor der Inokulation nicht homogenisiert.

4.1.4 Applikation von Zusatzstoffen

4.1.4.1 Zusatz von Precursoren

L-Phenylalanin sowie L-Tyrosin wurden den Kulturen als Feststoff zugesetzt. Die zur Einstellung der gewünschten Konzentration im Medium benötigte Stoffmenge wurde in ein 4 mL Schraubdeckelgläschen eingewogen und autoklaviert. p-Cumarsäure und p-Cumarsäuremethylester (Eigensynthese, 4.3.1) wurden aus ethanolischen Stammlösungen zugesetzt. Die Konzentration der Stammlösungen betrug jeweils $0,5 \text{ mmol mL}^{-1}$.

Der Zusatz der Precursoren erfolgte in der Regel am 3. Kulturtag nach Inokulation.

4.1.4.2 Zusatz von Phytoeffektoren

Alle eingesetzten Phytoeffektoren wurden aus sterilfiltrierten Stammlösungen einen Tag nach Inokulation zugesetzt. Es wurden wässrige Stammlösungen mit den folgenden Konzentrationen angesetzt:

Spermin (97 %, Sigma)	0,02 mM mL ⁻¹	4,060 mg mL ⁻¹
Spermidin (>99,5 %, Fluka)	0,02 mM mL ⁻¹	14,500 mg mL ⁻¹
Putrescin (>98 %, Sigma)	0,02 mM mL ⁻¹	23,300 mg mL ⁻¹
24-Epibrassinolid (>97 %, Sigma)	210,0 nmol mL ⁻¹	0,100 mg mL ⁻¹
	21,0 nmol mL ⁻¹	0,010 mg mL ⁻¹
	2,1 nmol mL ⁻¹	0,001 mg mL ⁻¹
Indolessigsäure (>98 %, Fluka)	0,53 µmol mL ⁻¹	0,100 mg mL ⁻¹
Kinetin (>99 %, Fluka)	0,47 µmol mL ⁻¹	0,100 mg mL ⁻¹

4.1.4.3 Zusatz eines Kulturfiltrates

Kulturmedium des schnellwachsenden *Hypomyces odoratus*, CBS 553.80, wurde durch Vakuumfiltration am 7. Kulturtag von der Biomasse getrennt und anschließend durch einen Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert.

Dieses Kulturfiltrat wurde ohne weitere Aufarbeitung einen Tag nach Inokulation Kulturen des langsamwachsenden Stammes *H. odoratus*, CBS 764.68, 5-, 10- und 20%ig (v/v) zugesetzt. Zum Ausgleich waren die entsprechenden Volumina den Kolben bereits vor Inokulation entnommen worden.

4.1.4.4 Zusatz von Halogenidsalzen

Der Zusatz von Halogeniden zu *Bjerkandera adusta* erfolgte aus sterilfiltrierten Stammlösungen. Es wurden die folgenden wässrigen Lösungen angesetzt:

KF (>99 %, Fluka)	1 mM mL ⁻¹	58 mg mL ⁻¹
KBr (>99,5 %, Merck)	2 mM mL ⁻¹	238 mg mL ⁻¹
KCl (>99,5 %, Fluka)	2 mM mL ⁻¹	149 mg mL ⁻¹
KJ (>99,5 %, Fluka)	2 mM mL ⁻¹	332 mg mL ⁻¹

Die Salzlösungen wurden einen Tag nach Inokulation appliziert.

4.1.5 Probenahme

4.1.5.1 Standard-Probenahme

Am Probenahmezeitpunkt wurde jeweils ein gesamter Kulturkolben als Probe genommen und aufgearbeitet. Für die Separation von Medium und Biomasse kamen dabei drei Methoden zum Einsatz.

1. Vakuumfiltration: Die Biomasse wurde in einer Vakuumfiltrationseinheit über ein Papierfilter (MN 616, Macherey-Nagel) vom Medium abgetrennt. Diese Methode war nicht bei allen Pilzen einsetzbar, da der Filter in mehreren Fällen schnell verblockte.
2. Zentrifugation: Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 8000 x g in einer Kühlzentrifuge bei 4 ° C. Diese Methode konnte nicht bei allen Pilzen eingesetzt werden, da wiederholt die elastische Pelletstruktur der Bildung eines stabilen Sediments entgegenstand.
3. Filtration durch Gaze: Bei großen Probevolumina oder wenn sowohl Vakuumfiltration als auch Zentrifugation nicht zufriedenstellend angewandt werden konnten, wurde zur Filtration Baumwollgaze eingesetzt.

4.1.5.2 Probenahme für Sammelproben

Über den gesamten Kulturzeitraum wurde, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Pilzes, jeden 2. oder 3. Tag eine Probe aus der Kultur entnommen. Mit einer Kolbenhubpipette wurden 5 mL der gleichmäßig suspendierten Kultur steril entnommen und in einer Tischzentrifuge für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. 3 mL des Überstandes wurden in das Sammelgefäß überführt und die darin vereinigten Proben bis zur weiteren Untersuchung bei –70 ° C eingelagert.

4.1.6 Bestimmung verschiedener Kulturparameter

4.1.6.1 pH-Wert

Unmittelbar nach der Probenahme wurde der pH-Wert im Kulturmedium mit einem täglich kalibrierten pH-Meter bestimmt.

4.1.6.2 Glucosekonzentration

Die Restglucose im Kulturmedium wurde direkt nach Probenahme generell mit Schnellteststreifen (Diabur-Test[®] 5000, Boehringer) bestimmt.

Bei Störungen des Schnelltestes wurde auf einen photometrischen Test zurückgegriffen (Glucose (HK) 16-UV, Sigma).

4.1.6.3 Trockenmasse

Ein definiertes Probevolumen wurde über ein getrocknetes und tariertes Rundfilter (MN 616, Macherey-Nagel) vakuumfiltriert. Die zurückgebliebene Biomasse wurde mehrfach mit demin. Wasser gewaschen und zusammen mit dem Filter bei 103 °C für 24h im Trockenschrank getrocknet. Die Biotrockenmasse wurde durch Differenzwägung des im Exsikkator abgekühlten Filters bestimmt und auf 100 mL berechnet.

4.1.6.4 Prüfung auf Kontamination

Die Prüfung auf Kontaminationen erfolgte durch regelmäßige lichtmikroskopische Untersuchungen der Kulturen.

4.1.6.5 Viskositätsmessung

Die Viskosität der Kulturmedien wurde in Anlehnung an DIN EN ISO 2431 bestimmt. 5 mL des zu untersuchenden Mediums wurden in einen Trichter pipettiert, dessen Auslauf verschlossen gehalten wurde. Die Auslauföffnung verengte sich auf einen Durchmesser von 0,75 mm. Vor Beginn der Messung wurde die Luft im Ablauf vorsichtig entfernt. Der Auslauf wurde geöffnet und die Zeit gemessen, bis der Meniskus der Flüssigkeit eine Markierung im Ablaufröhrchen des Trichters erreichte. Als Referenzflüssigkeit diente Wasser.

4.1.7 Belichtung

Die Inkubationshaube wurde im Inneren mit drei Leuchtstoffröhren ausgestattet. Die tägliche Belichtungsdauer betrug 14 h. Die Regelung erfolgte über eine Zeitschaltuhr. Es wurden entweder jeweils drei Leuchtstoffröhren des gleichen Typs oder eine Kombination aus zwei Röhren vom Typ „Fluora“ und einer UV-A-Röhre eingesetzt. Kulturen, die unter Lichtausschluß wachsen sollten, wurden durch Umhüllen der Kolben mit Alufolie abgedunkelt.

Tabelle 4-9: Eingesetzte Lichtquellen

Bezeichnung	Hersteller	Charakterisierung
UV-A (TL 44 D 25 / 09 N)	Philips	Solariumlampe mit Strahlungsmaximum bei 350 nm (vgl. Abbildung 4-1), Strahlungsfluß (315-400 nm): 3,2 W
FLUORA (L 15 W / 77)	Osram	Pflanzenlampe mit betontem blauen und roten Spektralbereich (vgl. Abbildung 4-2), Lichtstrom: 400 lm

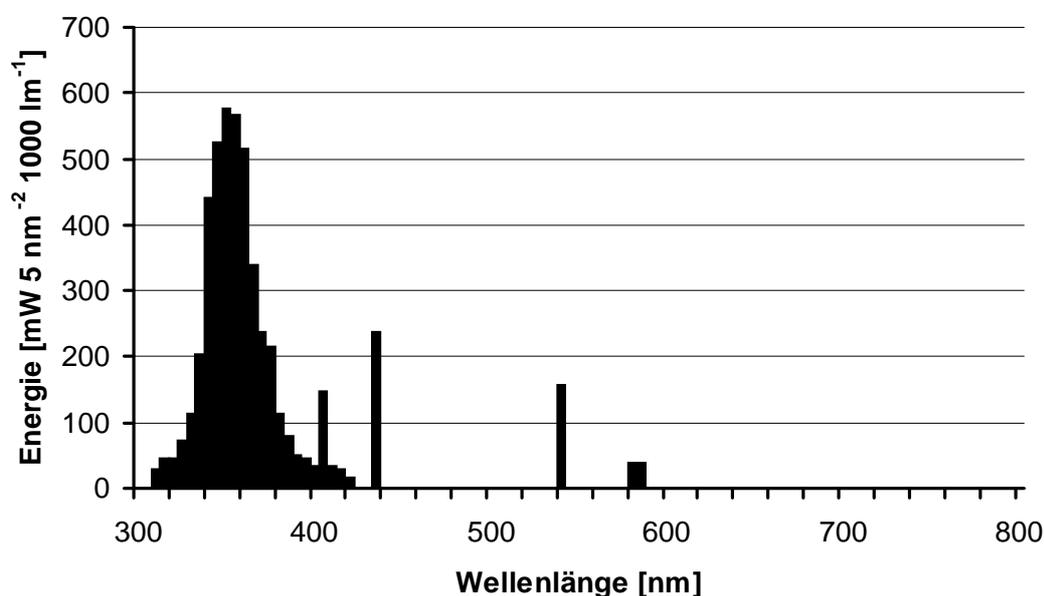


Abbildung 4-1: Lichtspektrum der UV-A-Lampe (Philips, TL 44 D 25 / 09 N) [nach: Philips Licht Katalog, 1995/96]

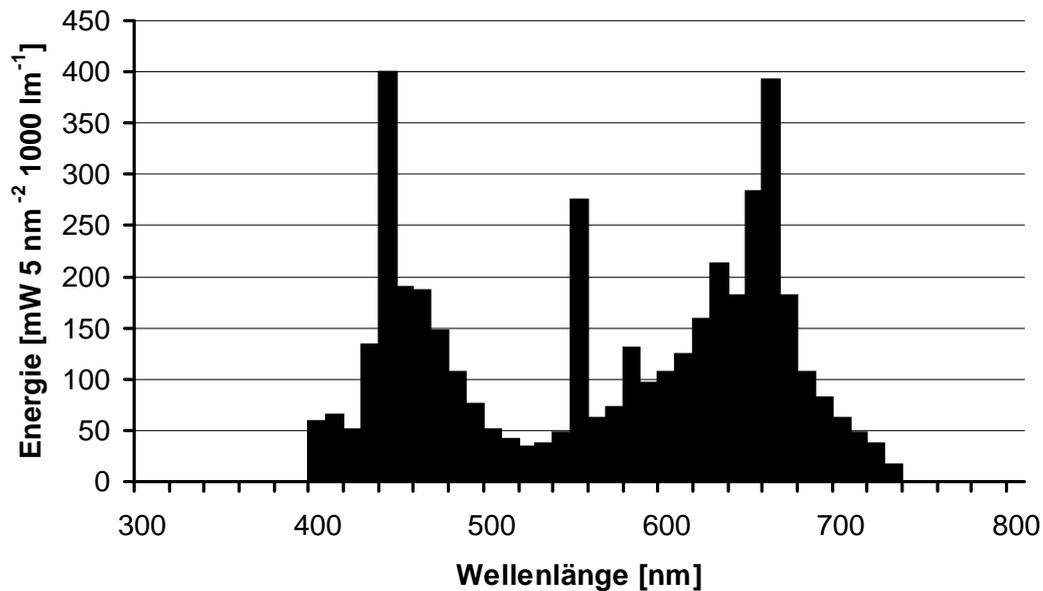


Abbildung 4-2: Lichtspektrum der „Fluora“-Pflanzenlampe (Osram, L 15 W / 77)
[nach: Osram Lichtprogramm, 1999/2000]

4.2 Enzymatik

4.2.1 Herabsetzung der Viskosität von Kulturfiltraten

Nach der Probenahme wurden den Kulturfiltraten sogenannte klärende Enzyme zugesetzt. Es handelte sich dabei um technische Enzympräparate mit verschiedenen hydrolytischen Aktivitäten (Hauptaktivitäten: Pectinasen, Cellulasen, Hemicellulasen).

Zu jeweils 10 mL des Kulturfiltrates wurden die folgenden Präparate in der angegebenen Menge zudosiert. Die von den Herstellern für Fruchtsäfte empfohlenen Dosierungen wurden dabei um ein Mehrfaches überschritten.

Clarex [®] 5 x L (Solvay)	400 µL
Clarex [®] ML (Solvay)	800 µL
Pearex [®] 5 x L (Solvay)	400 µL
[®] Rohament Max (Röhm)	400 µL
[®] Rohapect 7104 (Röhm)	100 mg

Die verschlossenen Ansätze wurden bei 24 °C auf einem Rundschüttler (240 U min⁻¹) für 7 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die jeweiligen Viskositäten bestimmt (4.1.6.5). Als Vergleich diente unbehandeltes Kulturfiltrat.

4.2.2 Zellaufschluß

Die Zellen wurden mechanisch mit einem Teflon-Potter (Maximalvolumen 25 mL, Schott), angetrieben von einem KPG-Rührwerk (Stufe 10, IKA Janke und Kunkel), aufgeschlossen. Das Aufschlußgefäß wurde im Eisbad gekühlt. Die Aufschlußgüte wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

1. *Gloeophyllum odoratum*: 1,0 g gewaschene Feuchtmasse wurde im Pottergefäß in 2 mL Aufschlußpuffer (Na-/K-Phosphat-Puffer, 100 mM, pH 6,5) suspendiert und 5 min homogenisiert. Das Homogenat wurde ohne weitere Behandlung im Enzymassay (4.2.4.4) eingesetzt.
2. *Lentinus lepideus* (1): Zur Aktivitätsbestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) nach Methode 1 (4.2.4.1) wurden 300 mg gewaschene Feuchtmasse im Pottergefäß in 3 mL Aufschlußpuffer (Tris-/HCl-Puffer, 50 mM, pH 8,8) suspendiert und 5 min homogenisiert. Das Homogenat wurde direkt im Enzymassay eingesetzt.
3. *Lentinus lepideus* (2): Für den PAL-Assay nach Methode 2 (4.2.4.1) sowie alle weiteren Enzymassays (4.2.4.2, 4.2.4.3) wurden 5 g gewaschene Feuchtmasse im Pottergefäß in 10 mL Aufschlußpuffer (K-Phosphat-Puffer, 100 mM, pH 7,0) suspendiert und 10 min homogenisiert. Das Homogenat wurde in Polycarbonat-Zentrifugenbecher (Nalgene) überführt und für 15 min bei 5000 x g zentrifugiert. Nach Bestimmung des Gesamtproteingehaltes (4.2.3) wurde die Proteinkonzentration mit dem Aufschlußpuffer auf 1,0 mg mL⁻¹ eingestellt.

4.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration im Rohextrakt aus (4.2.2, Nr. 3) wurde nach der Methode von BRADFORD [1976] mit Hilfe des Rotiquant-Proteinassays (Roth) bestimmt. Die Kalibrierung wurde im Bereich von 1-25 µg mL⁻¹ mit Rinderserumalbumin (BSA, Sigma) durchgeführt. 800 µL der adäquat mit Aufschlußpuffer (4.2.2) verdünnten Probe wurden in einer ½-Mikroküvette mit 200 µL des Farbreagens vermischt und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595 nm gegen einen Reagenzienblindwert mit Aufschlußpuffer anstelle von Zellextrakt gemessen.

4.2.4 Enzymassays

4.2.4.1 Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)

Methode 1 [nach BÖKER, 1997]

0,5 mL Zellhomogenat von *Lentinus lepideus* (4.2.2) wurden mit 2,0 mL Substratlösung vermischt. Die Substratlösung bestand aus Tris-/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,8), dem 10 mmol L⁻¹ L-Phenylalanin zugesetzt worden waren. Dieser Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 30 °C unter Lichtausschluß auf einem Rundschtüttler (250 U min⁻¹) inkubiert. Der Reaktionsabbruch erfolgte durch den Zusatz von 0,5 mL HCl (2 N). Die Probe wurde zentrifugiert und die gebildete Zimtsäure mittels HPLC (4.4.1, Gradientenprogramm 2) quantifiziert. Die Bildungsrate wurde auf die Pilzfeuchtmasse bezogen. Die Kontrolle wurde mit Aufschlußpuffer angesetzt.

Methode 2

1,0 mL Rohextrakt (4.2.2) wurde mit 0,5 mL Substratlösung (100 mM K-Phosphat-Puffer, pH 7,0, mit 10 mmol L⁻¹) vermischt. Die Inkubation erfolgte für 120 min bei 30 °C unter Lichtausschluß auf einem Rundschtüttler (250 U min⁻¹). Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,5 mL HCl (1 N) gestoppt. Nach Zentrifugation der Probe wurde die gebildete Zimtsäure mittels HPLC (4.4.1, Gradientenprogramm 2) quantifiziert. Die Aktivität wurde auf die Masse des Gesamtproteins bezogen (= spezifische Aktivität). Eine mit Aufschlußpuffer angesetzte Kontrolle wurde mitgeführt.

4.2.4.2 4-Hydroxylasen [modifiziert nach OHTA UND SHIMADA, 1991]

250 µL FAD-Lösung (3,5 µmol mL⁻¹), 250 µL NADPH-Lösung (7,0 µmol mL⁻¹) und 250 µL Substratlösung (17,5 µmol mL⁻¹) wurden in einem 10 mL Schnappdeckelgläschen vermischt. Als Substrate dienten trans-Zimtsäure sowie trans-Zimtsäuremethylester, gelöst in 40%igem unvergällten Ethanol. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 1,0 mL Rohextrakt (4.2.2) gestartet. Die Inkubation erfolgte im verschlossenen Gläschen für 180 min bei 30 °C unter Lichtausschluß auf einem Rundschtüttler (250 U min⁻¹). Durch Zusatz von 250 µL HCl (2 N) wurde die Reaktion abgebrochen. Die Probe wurde zentrifugiert und die gebildeten Produkte per HPLC (4.4.1, Gradientenprogramm 1) quantifiziert (trans-Zimtsäure → p-Cumarsäure, trans-Zimtsäuremethylester → 4-Hydroxymethyl-ester). Die Aktivität wurde auf die Masse des Gesamtproteins bezogen. Die Kontrolle wurde mit Aufschlußpuffer anstelle des Rohextraktes angesetzt.

Die Substratlösungen wurden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die wässrigen Stammlösungen der Cosubstrate wurden aliquotiert und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.2.4.3 O-Methyltransferasen [modifiziert nach OHTA ET AL., 1991]

Jeweils $250\text{ }\mu\text{L}$ S-Adenosylmethioninlösung (SAM, $3,0\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}$) und Substratlösung ($15\text{ }\mu\text{mol mL}^{-1}$) wurden in einem 10 mL Schnappdeckelgläschen vermischt. Als Substrate dienten trans-Zimtsäure und p-Cumarsäure, gelöst in 40%igem unvergällten Ethanol. Durch Zusatz von $1,0\text{ mL}$ Rohextrakt (4.2.2) wurde die Reaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte im verschlossenen Gläschen bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Lichtausschluß auf einem Rundschtüttler (250 U min^{-1}). Nach 120 min wurde die Reaktion durch $500\text{ }\mu\text{L}$ HCl (1 N) gestoppt. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und die gebildeten Produkte mittels HPLC (4.4.1, Gradientenprogramm 2) quantifiziert (Zimtsäure \rightarrow Zimtsäuremethylester, p-Cumarsäure \rightarrow 4-Methoxyzimtsäure, p-Coumarsäuremethylester \rightarrow 4-Methoxyzimtsäuremethylester). Die Aktivität wurde auf die Masse des Gesamtproteins bezogen. Die Kontrolle wurde mit Aufschlußpuffer anstelle des Rohextraktes angesetzt.

Die Substratstammlösungen wurden bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, während die aliquotierte wässrige SAM-Stammlösung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurde.

4.2.4.4 Lipoxygenase/Hydroperoxidlyase [WURZENBERGER UND GROSCH, 1983]

2 mL des Zellhomogenates von *Gloeophyllum odoratum* (4.2.2) wurden in ein 4 mL Schraubdeckelgläschen überführt und 5 min bei Raumtemperatur im verschlossenen Gläschen inkubiert. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von $200\text{ }\mu\text{L}$ NaOH (1 N) gestoppt. Nach Mikroextraktion (4.4.4.5) wurde das entstandene 1-Octen-3-ol per GC (4.4.3.1, Konfiguration 2, Temperaturprogramm 2) quantifiziert.

4.3 Synthesen

4.3.1 Synthese von p-Cumarsäuremethylester

Prinzip: säurekatalysierte Methylierung mit Methanol

16,5 g (= 0,1 mol) p-Cumarsäure wurden mit 24,5 mL absolutiertem Methanol (24 h über Molekularsieb, 3 Å) und 1,2 mL H₂SO₄ konz. im Wasserbad (75 °C) 5 h unter Rückfluß gekocht. Der Kühler wurde mit einem Trockenrohr verschlossen. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Großteil des Methanols abdestilliert. Der Reaktionsansatz wurde in 50 mL eisgekühlte, gesättigte NaHCO₃-Lösung überführt. Der ausgefallene Feststoff wurde über einen Büchnertrichter mit Papierfilter abgesaugt, mit wenig demin. Wasser gewaschen und zweifach aus Methanol umkristallisiert. Das Produkt wurde in Form von weißen Nadeln gewonnen. Die Ausbeute betrug 67,9 %. Die Reinheitskontrolle des in Methanol gelösten Produkts mittels GC (4.4.3.1, Konfiguration 2, Temperaturprogramm 1) und HPLC (4.4.1, Gradientenprogramm 1) ergab keine Verunreinigungen.

4.3.2 Synthese von p-Methoxyzimtsäuremethylester

Prinzip: säurekatalysierte Methylierung mit Methanol

8,9 g (= 0,05 mol) 4-Methoxyzimtsäure wurden mit 20 mL absolutiertem Methanol und 0,6 mL H₂SO₄ konz. nach dem gleichen Schema wie p-Cumarsäure methyliert (4.3.1). Der p-Methoxyzimtsäuremethylester wurde in weißen, blättchenförmigen Kristallen gewonnen. Die Ausbeute betrug 87 %. In der Reinheitskontrolle mittels GC (4.4.3.1, Konfiguration 2, Temperaturprogramm 1) und HPLC (4.4.1, Gradientenprogramm 1) wurden lediglich geringe Spuren von trans-Zimtsäure festgestellt.

4.4 Analytik

4.4.1 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Analytische Jasco Hochdruckgradientenanlage mit UV-/Vis-Detektor, angeschlossen an einen Shimadzu Integrator

Pumpe:	980-PU intelligent HPLC-Pump
Degasser:	DG-980-50 3-line-Degasser
Gradientenformer	LG-980-2 Ternary Gradient Unit
Detektor:	UV-975 intelligent UV-/Vis-Detector
Integrator:	C-R5A
Injektor:	RH 7125 mit 20 μ L-Loop (Rheodyne)
Trennsäule:	Nucleosil 120-5-C ₁₈ , 5 μ m, 250 x 4 mm, mit entsprechender Vorsäule, 11 x 4 mm (Macherey & Nagel)
Eluenten:	A: Acetonitril B: Essigsäure (Baker, für die HPLC), 1%ig (v/v)
Gradientenprogramm:	1. 10 % A – 0,5 % min ⁻¹ – 20 % A – 1,0 % min ⁻¹ – 40 % A – 4,0 % min ⁻¹ – 80 % A 2. 25 % A (10 min) – 4,0 % min ⁻¹ – 85 % A

4.4.2 Probenvorbereitung für die HPLC

Zur Abtrennung von Partikeln in den wässrigen Proben kamen zwei Methoden zum Einsatz.

1. Mikrofiltration der Proben durch Spritzenaufsatzfilter (Celluloseacetat, 0,45 μ m, Sartorius).
2. Zentrifugation von 1 mL Aliquots der Proben in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 14 000 x g für 15 min. Der Überstand wurde direkt eingespritzt.

4.4.3 Gaschromatographie (GC)

4.4.3.1 GC-FID

Konfiguration 1

SATO Chrom Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID), angeschlossen an eine Auswertestation mit Software Chromcard for Windows Version 1.19-7 β (CE-Instruments)

Injektion:	1 μ L bzw. SPME, splitless, Splitöffnung nach 60 s
Injektortemperatur:	230 °C
Detektortemperatur:	270 °C
Säule:	Carbowax 20 M fused silica Kapillarsäule: 25 m x 0,32 mm ID, Filmdicke: 0,25 μ m (Leupold, Weihenstephan)
Vorsäule:	Carbowax 20 M fused silica desaktiviert: 3 m x 0,32 mm ID, (CS Chromatographieservice)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) – 3 °C min ⁻¹ – 230 °C (20 min)
Gase:	Trägergas: H ₂ – 50 kPa; 3,8 mL min ⁻¹ (40 °C) FID-Brenngase: H ₂ – 50 kPa, Druckluft – 100 kPa

Konfiguration 2

Fisons GC 8360 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID), angeschlossen an eine Auswertestation mit Software Chromcard for Windows Version 1.19-7 β (CE-Instruments)

Injektion:	1 μ L bzw. SPME, splitless, Splitöffnung nach 60 s
Injektortemperatur:	230 °C
Detektortemperatur:	270 °C
Säule:	Carbowax 20 M fused silica Kapillarsäule: 25 m x 0,32 mm ID, Filmdicke: 0,4 μ m (J & W)
Vorsäule:	Carbowax 20 M fused silica desaktiviert: 3 m x 0,32 mm ID, (CS Chromatographieservice)
Temperaturprogramm:	1. 40 °C (3 min) – 3 °C min ⁻¹ – 230 °C (20 min) 2. 60 °C (3 min) – 4 °C min ⁻¹ – 150 °C – 10 °C min ⁻¹ – 200 °C (10 min)
Gase:	Trägergas: H ₂ – 50 kPa; 3,8 mL min ⁻¹ (40 °C) FID-Brenngase: H ₂ – 50 kPa, Druckluft – 100 kPa

4.4.3.2 GC-Massenspektrometrie (GC-MS)

Konfiguration 1

Fisons GC 8000 Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor Fisons MD-800, angeschlossen an eine Auswertestation mit Software Masslab for Windows Version 1.3 (Fisons)

Injektion:	1. 1 μ L bzw. SPME, splitless, Splitöffnung nach 60 s 2. 1 μ L cool on column
Injektortemperatur:	1. 230 °C (Split/splitless-Injektor) 2. 40 °C (On-column-Injektor)
Säule:	Carbowax 20 M fused silica Kapillarsäule: 25 m x 0,32 mm ID, Filmdicke: 0,4 μ m (Macherey & Nagel)
Vorsäule:	Carbowax 20 M fused silica deaktiviert: 3 m x 0,32 mm ID, (CS Chromatographieservice)
Temperaturprogramm:	40 °C (3 min) – 3 °C min ⁻¹ – 230 °C (20 min)
Trärgas:	He – 50 kPa
Interface:	230 °C
Ionenquelle:	200 °C
Quadrupol-Massenfilter:	100 °C
Ionisation:	Elektronenstoß-Ionisation, 70 eV
Massenbereich:	m/z 33–300
Spektrenbibliotheken:	Wiley, NIST, LIBTX, institutseigene Referenzdatei

Konfiguration 2

Hewlett Packard HP 5890 Serie II Gaschromatograph mit massenselektivem Detektor Hewlett Packard Mass Spectrometer 5989 A, angeschlossen an eine Auswertestation MS HP-UX Chemstation mit Software B06.01 (Hewlett Packard)

Injektion:	1 μ L on column
Säule:	Optima 5-MS Kapillarsäule: 30 m x 0,25 mm ID, Filmdicke: 0,25 μ m (Macherey & Nagel)
Temperaturprogramm:	40 °C (5 min) – 3 °C min ⁻¹ – 100 °C – 4 °C min ⁻¹ – 280 °C (3 min)
Trärgas:	He – 50 kPa
Interface:	260 °C
Ionenquelle:	260 °C
Quadrupol-Massenfilter:	100 °C
Ionisation:	Elektronenstoß-Ionisation, 70 eV
Massenbereich:	m/z 33–300, m/z 33–500
Spektrenbibliotheken:	Wiley, NIST, institutseigene Referenzdatei

4.4.3.3 GC-Atomemissionsdetektion (GC-AED)

Hewlett Packard HP 6890 Gaschromatograph mit Atomemissionsdetektor Hewlett Packard Atomic Emission Detector HP G2350, angeschlossen an eine Auswertestation HP GC Chem Station mit Software A.05.04 (Hewlett Packard)

Injektion:	5 μL über Kaltaufgabesystem KAS 4 (Gerstel)
Säule:	Optima 5-MS Kapillarsäule: 30 m x 0,25 mm ID, Filmdicke: 0,25 μm (Macherey & Nagel)
Temperaturprogramm:	40 °C (5 min) – 3 °C min^{-1} – 100 °C – 4 °C min^{-1} – 280 °C (3 min)
Trägergas:	He – 20 psi
Cavity	300 °C
Transferline	300 °C
Reaktandgase	H ₂ – 30 psi O ₂ – 30 psi
Spülgas (Spektrometer)	N ₂ – ca. 500 mL min^{-1}

4.4.4 Probenvorbereitung für die GC

4.4.4.1 Festphasenmikroextraktion (SPME)

Als Probenaufarbeitung wurde während der Screeningversuche die Methode der SPME eingesetzt. 3 mL von durch Zentrifugation vom Pilzmycel befreites Medium wurden in einem 4 mL Schraubdeckelgläschen mit NaCl gesättigt (0,5 g mL^{-1}). Adsorbiert wurde an einer Polyacrylatfaser mit einer Filmdicke von 0,85 μm (Supelco) in einem SPME-Faserhalter für manuelles Arbeiten (Supelco). Auf einem Mehrplatzmagnetrührer wurde die Probe bei 750 U min^{-1} durchmischt. Die Adsorptionszeit betrug 40 min (Raumtemperatur). Vor Applikation der Faser in den Injektor wurde das NaCl durch kurzes Spülen mit demin. Wasser entfernt. Die GC-Bedingungen sind in 4.4.3.1 und 4.4.3.2 (Konfiguration 1) angegeben. Zur Reinigung wurde die Faser für 20 min im Injektor ausgeheizt.

Die semiquantitative Auswertung erfolgte in bezug auf Undecansäuremethylester als externen Standard (1,0-10,0 mg L^{-1}).

4.4.4.2 Flüssig/flüssig-Extraktion

100 mL mycelfreies Kulturmedium wurden mit HCl (6 N) auf einen pH-Wert von 1,5 eingestellt. Die Extraktion erfolgte durch dreimaliges Ausschütteln im Scheidetrichter mit jeweils 50 mL eines azeotropen Pentan/Diethylether-Gemisches im Verhältnis 1:1,12 (v/v). Die organischen Phasen wurden vereinigt.

Wiederholt bildete sich beim Schütteln im Scheidetrichter eine sehr stabile Emulsion, die keine ausreichende Phasentrennung erlaubte. In diesen Fällen wurde die Extraktion in 250 mL Zentrifugenbechern aus Polypropylen (Nalgene) durchgeführt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation unterstützt (15 min, 5000 x g, 10 ° C).

Die Extrakte wurden 24 h bei 4 ° C über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

4.4.4.3 Kontinuierliche Flüssig/flüssig-Extraktion

900 mL Kulturfiltrat wurden mit HCl (6 N) auf einen pH-Wert von 1,5 bzw. mit NaOH (2 N) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Das Medium wurde in eine speziell angefertigte Flüssig/flüssig-Extraktionsapparatur überführt. Die Extraktion wurde mit 250 mL eines azeotropen Pentan/Diethylether-Gemisches im (Vol.-Verhältnis 1:1,12) durchgeführt. Die Lösungsmittelvorlage wurde im Wasserbad auf 40 ° C erwärmt, die Extraktionszeit betrug 20 h.

In der Extraktionsapparatur perlte das Lösungsmittel durch eine Fritte am Boden der ca. 150 cm langen Extraktionskolonne in die Probematrix. Das Lösungsmittel, das eine geringere Dichte aufwies als die Probe, wurde durch einen Ablauf im oberen Teil der Kolonne abgeführt und lief wieder in die Vorlage zurück. Dort wurde es erneut verdampft, in einem Kühler (-20 ° C) über der Extraktionskolonne kondensiert und gelangte über ein Glasrohr erneut zur Fritte.

Die Extrakte wurden 24 h bei 4 ° C über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

4.4.4.4 Fraktionierte Destillation an einer Vigreux-Kolonnen

Die getrockneten Extrakte (4.4.4.2, 4.4.4.3) wurden an einer Vigreux-Kolonnen im Spitzkolben bei 40 ° C und Umgebungsluftdruck auf etwa 2 mL eingengt. Als interner Standard wurden definierte Mengen Undecansäure- oder Nonansäuremethylester aus methanolischen Stammlösungen (1,0 oder 5,0 mg mL⁻¹), entsprechend einer Konzentration im ausgeschüttelten Medium von 1,0 bzw. 5,0 mg L⁻¹, zugesetzt. Die Proben wurden in 4 mL Schraubdeckelgläschen mit teflonbeschichteten Septen bei -18 ° C gelagert.

Die Quantifizierung erfolgte unkorrigiert in bezug auf den internen Standard.

4.4.4.5 Flüssig/flüssig-Mikroextraktion

Standardverfahren

500 µL des vom Pilzmycel befreiten Kulturmediums wurden zusammen mit 200 mg NaCl in ein 4 mL Schraubdeckelgläschen gegeben. Zur Extraktion wurden 1,5 mL Pentan/Diethylether-Gemisch zugesetzt und das verschlossene Gläschen 2 min lang kräftig geschüttelt. Zur Phasentrennung wurde 10 min in einer Tischzentrifuge mit 5000 x g zentrifugiert. Die organische Oberphase wurde ohne weitere Behandlung für die GC (4.4.3) eingesetzt.

Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung.

Bestimmung von 1-Octen-3-ol

Dem Reaktionsansatz des Enzymassays (4.2.4.4) im 4 mL Schraubdeckelgläschen wurden 50 µL 1-Nonanol als interner Standard zugesetzt. Als Extraktionsmittel diente 1 mL Pentan. Das Gläschen wurde verschlossen und für 2 min kräftig von Hand geschüttelt. Durch Zentrifugation wurde die Phasentrennung herbeigeführt.

Die Quantifizierung erfolgte unkorrigiert in bezug auf den internen Standard.

4.4.4.6 Methylierung

Durch Einleitung von Diazomethan wurden organische Säuren in etherischen Lösungen in einer Apparatur nach WALKER ET AL. [1982] methyliert. Das Diazomethan entstand bei der Durchmischung des zweiphasigen Systems aus 1 mL 2-(2-Ethoxyethoxy)-ethanol (>99 %, Aldrich) und 1,5 mL 60%iger (m/v) KOH als untere Phase und 2 mL 1 M N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid (= Diazald, 99 %, Aldrich) in Diethylether und 1 mL Diethylether als obere Phase. Die Durchmischung sowie das Übertreiben des entstandenen Gases wurde durch die Einleitung von N₂ erreicht. Bei Gelbfärbung der Probelösung wurde die Reaktion abgebrochen und die Gasentwicklung durch Zusatz von Eisessig gestoppt.

4.4.5 Identifizierung und Quantifizierung

4.4.5.1 Gaschromatographie

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch Vergleiche zwischen den ermittelten Retentions- und MS-Daten und den Daten von unter gleichen Bedingungen chromatographierten Referenzsubstanzen sowie Literaturdaten. Die Kovats-Indices wurden nach der folgenden Formel berechnet:

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

mit: N = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyten eluiert
 n = Differenz zur Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
 A = Analyt
 t' = relative Retentionszeit (= Retentionszeit t – Totzeit t₀)

Die Quantifizierung von Substanzen in den Flüssig/flüssig-Extrakten wurde aus den GC-FID-Daten unkorrigiert in bezug auf den internen Standard durchgeführt. Die Auswertung nach Festphasenmikroextraktion erfolgte semiquantitativ in bezug auf Undecansäuremethylester als externen Standard und diente in den vergleichenden Screeningversuchen zur Festlegung von Konzentrationsbereichen.

4.4.5.2 Flüssigchromatographie

Die Zuordnung der Peaks zu entsprechenden Substanzen erfolgte aufgrund von Vergleichen zwischen den ermittelten Retentionszeiten und den Retentionszeiten von unter den gleichen Bedingungen chromatographierten Referenzsubstanzen. Die Metabolite wurden durch externe Kalibrierung quantifiziert. Die Konzentrationen der Kalibrierstandards lagen in der Regel im Bereich zwischen 1,0 und 75,0 mg L⁻¹. Wenn erforderlich, wurde ein Kalibrierintervall zwischen 0,1 und 25,0 mg L⁻¹ gewählt.

4.5 Chemikalien und Geräte

Hier werden nur häufig benutzte Chemikalien und Geräte genannt. Spezielle Chemikalien und Geräte werden in der Beschreibung der jeweiligen Anwendung spezifiziert.

4.5.1 Kulturmedienbestandteile

Tabelle 4-10: Organische Kulturmedienbestandteile

Substanz	Qualität	Hersteller
Agar Agar	f. d. Mikrobiol.	Merck
p-Aminobenzoessäure	>99 %	Fluka
L-Asparagin-Monohydrat	reinst	Merck
(+)-Biotin	>99 %	Fluka
Ca-D-Panthenat	>99 %	Fluka
Cobalamin	>98 %	Fluka
Folsäure	>97 %	Fluka
D-(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiol.	Merck
D-Glucuronsäure	–	Sigma
L-Glutaminsäure	>99 %	Fluka
Hefeextrakt	f. d. Mikrobiol.	Merck
Malzextrakt	f. d. Mikrobiol.	Merck
myo-Inosit	>99,5 %	Fluka
Niacin	>99,5 %	Fluka
Pyridoxalhydrochlorid	f. biochem. Zwecke	Merck
Riboflavin	–	Dr. Marcus
Thiaminhydrochlorid (Vit. B ₁)	>99 %	Fluka
Titriplex III	–	Merck

Tabelle 4-11: Anorganische Kulturmedienbestandteile

Substanz	Qualität	Hersteller
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	p. a.	Riedel-DeHaën
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	reinst	Riedel-DeHaën
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	>99 %	Fluka
CuSO ₄ x 6 H ₂ O	p. a.	Baker
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	–	Riedel-DeHaën
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	p. a.	Riedel-DeHaën
KCl	reinst	Riedel-DeHaën
KH ₂ PO ₄	f. d. Molekularbiol.	Merck
MgSO ₄	reinst	Riedel-DeHaën
MnSO ₄	puriss. p. a.	Fluka
MnSO ₄ x H ₂ O	p. a.	Baker
NaCl	reinst	Riedel-DeHaën
NaH ₂ PO ₄	>99%	Fluka
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x H ₂ O	>99 %	Fluka
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	reinst	Riedel-DeHaën
SnCl ₂ x 2 H ₂ O	>98 %	Fluka
ZnSO ₄ x H ₂ O	puriss. p. a.	Fluka
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	puriss. p.a.	Fluka

4.5.2 Standards und Precursoren

Tabelle 4-12: Wichtige Standards und Precursoren

Substanz	Qualität	Hersteller
Acetophenon	99 %	Aldrich
p-Anisaldehyd	>98 %	Sigma
p-Anisalkohol	98 %	Aldrich
p-Anissäure	>98 %	Fluka
p-Anissäuremethylester	>98 %	Fluka
Benzaldehyd	>99 %	Sigma
Benzoessäure	p. a.	Merck
Benzoessäuremethylester	>98 %	Fluka
p-Cumarsäure	>98 %	Fluka
3,4-Dihydroxymzimtsäure	99 %	EGA-Chemie
Ferulasäure	>99 %	Fluka
Isoferulasäure	–	Roth
Isovanillin	>98 %	Fluka
Isovanillinsäure	–	Sigma
trans-4-Methoxymzimtsäure	>98 %	Fluka
2-Methyl-1-butanol	>98 %	Fluka
3-Methyl-1-butanol	>99 %	Fluka
2-Methylbuttersäure	>98 %	Fluka
3-Methylbuttersäure	>98 %	Fluka
2-Methyl-1-propanol	>99,5 %	Fluka
2-Methylpropansäure	>99,5 %	Fluka
1-Nonanol	>99,5 %	Fluka
Nonansäuremethylester	>98 %	Sigma
1-Octen-3-ol	>98 %	Fluka
Phenylacetaldehyd	>90 %	Sigma
L-Phenylalanin	>98 %	Sigma
Phenyllessigsäure	z. S.	Merck
Phenylmethanol	>99 %	Sigma
2-Phenyl-1-ethanol	–	ICN
3-Phenyl-1-propanol	–	EGA-Chemie
3-Phenylpropansäure	>98 %	Fluka
L-Tyrosin	>98 %	Sigma
Undecansäure	>97 %	Fluka
Undecansäuremethylester	99 %	Aldrich
Vanillin	99 %	Aldrich
trans-Zimtsäure	99 %	Fluka
trans-Zimtsäureethylester	>98 %	Fluka
Zimtsäuremethylester	>99 %	Fluka
4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanon (Himbeerketon)	99 %	Aldrich

4.5.3 Weitere Chemikalien

Tabelle 4-13: Weitere verwendete Chemikalien

Substanz	Qualität	Hersteller
HCl, konz.	reinst	Riedel-DeHaën
NaOH	puriss.	Fluka
NaCl	reinst	AppliChem
KH ₂ PO ₄	puriss.	Fluka
K ₂ HPO ₄	puriss.	Fluka
Na ₂ SO ₄	reinst	Riedel-DeHaën

4.5.4 Lösungsmittel

Tabelle 4-14: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Qualität	Hersteller
Aceton	reinst	Riedel-DeHaën
Acetonitril	HPLC	Roth
Diethylether	dest.	Hochschullieferung
Ethanol	dest.	Hochschullieferung
Ethanol, unvergällt	98 %	Kraul und Wilkening
Methanol	HPLC	Roth
Methanol	dest.	Hochschullieferung
Pentan	dest.	Hochschullieferung
Pentan/Diethylether, 1:1,12 (v/v), azeotrop	redest.	selbstgemischt

4.5.5 Gase

Tabelle 4-15: Verwendete Gase

Gas	Verwendung	Qualität	Lieferant
Wasserstoff	Trärgas, Detektorgas	5.0	Linde
Stickstoff	Trärgas, Methylierung	5.0	Linde
Helium	Trärgas	5.0	Linde
Druckluft	Detektorgas, Reaktorbelüftung	–	Kompressor*

- * – Außenluft wurde über einen Feinfilter angesaugt und durch einen ölfrei arbeitenden Membrankompressor auf 5 bar komprimiert. Nach Trocknung an einem Wasserabscheider und an einer Silicagel-Patrone wurde die Luft als Detektorbrenngas für die GC verwendet.

4.5.6 Geräte

Tabelle 4-16: Geräte und Hilfsmittel in der Mikrobiologie

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Laborautoklav	VST 50/90	Zirbus
Steril-Werkbank	Laminar-Flow 821/825	Stangl
Steril-Werkbank	CA/RE 4	Clean Air
Tisch-Rundschüttler	Certomat R, Auslenkung 12,5 mm	B. Braun
Inkubationshaube, mit Beleuchtung	Certomat HK	B. Braun
Kryostat	Frigomix U-2, Thermomix BU	B. Braun
Tisch-Rundschüttler	TR-125, Auslenkung 12,5 mm	Infors
Inkubationshaube	ITE	Infors
Inkubationsschüttler	Multitron	Infors
Kryostat	FC 1000	Julabo
Brutschrank	BE 500	Memmert
Ultra-Turrax	S 25-18 mit Antrieb TP 18-10	Janke & Kunkel
Vakuum-Filtrationseinheit		Sartorius
Papier-Rundfilter	MN 616	Macherey- Nagel
Spritzenvorsatzfilter	Polysulfon, 0,22 µm, steril	Roth
Lichtmikroskop	Will H-500	Hundt

Tabelle 4-17: Weitere Hilfsmittel und Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Kühlzentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus
Tischzentrifuge	Piccolo	Christ
Tischzentrifuge	5415 C	Eppendorf
Spektralphotometer	UV-/Vis λ -12	Perkin Elmer
½-Mikroküvetten	Polystyrol	Ratiolab
pH-Meter	Calimatic 761	Knick
pH-Elektrode	SE 100 mit Temperaturfühler	Knick
Feinwaage	SB 31	Scaltec
Laborwaage	3719 MP	Sartorius
Trockenschrank	BE 500	Memmert
Kolbenhubpipetten	10 µL bis max. 5 mL	verschiedene
heizbarer Magnetrührer	Ikamag RH	Janke & Kunkel
Spritzenvorsatzfilter	Polysulfon, 0,45 µm	Roth
Spritzenvorsatzfilter	Celluloseacetat, 0,45 µm	Sartorius
Papier-Rundfilter	MN 616	Macherey- Nagel
Papier-Faltenfilter	597 ½	Schleicher & Schuell
Wasseraufbereitung	RO 10-2	Werner
Reinstwasseranlage	E-pure, 18,2 MΩ	Barnstead

4.6 Entsorgungshinweise

4.6.1 Biologisches Material

Pilzkulturen, Biomassereste und kontaminierte Gegenstände wurden vor der Entsorgung autoklaviert. Nach Separation der Pilzmasse wurden Flüssigkeiten über das Abwasser, feste Abfälle über den normalen Laborabfall entsorgt.

4.6.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Lösungsmittel wurden weitgehend durch Destillation aufgereinigt und konnten wiederverwendet werden. Auf den Einsatz halogenerter Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht recyclebare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach halogenierten und nichthalogenierten gesammelt und ebenso wie alle anderen Chemikalienreste der zentralen Entsorgung der Universität Hannover zugeführt.

5 Literatur

- ABRAHAM, B. G., KRINGS, U., BERGER, R. G., 1993. Dynamic Extraction, an Efficient Screening Procedure for Aroma Producing Basidiomycetes. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15 (5/6): 178-181.
- ABRAHAM, B. G., BERGER, R. G., 1994. Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2344-2348.
- ADAM, G., MARQUARDT, V., VORBRODT, H. M., HÖRHOLD, C., ANDREAS, W., GARTZ, J., 1991. Aspects of Synthesis and Bioactivity of Brassinosteroids. in: CUTLER, H. G., YOKOTA, T., ADAM, G. (Eds.), *Brassinosteroids. ACS Symp. Ser. 474*, American Chemical Society, Washington DC, 74-85.
- ASPLUND, G., GRIMVALL, A., 1991. Organohalogens in Nature - More Widespread than Previously Assumed. *Environ. Sci. Technol.* 2: 1346-1350.
- ASSAF, S., HADAR, Y., DOSORETZ, C. G., 1997. 1-Octen-3-ol and 13-hydroperoxylinoleate are Products of Distinct Pathways in the Oxidative Breakdown of Linoleic Acid by *Pleurotus pulmonarius*. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 484-490.
- AVALOS, J., SCHROTT, E. L., 1990. Photoinduction of Carotenoid Biosynthesis in *Giberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 295-289.
- BAUM, D., HORWITZ, B. A., 1991. Changes in Synthesis and Abundance of Specific Polypeptides at Early and Late Stages of Blue-light-induced Sporulation of *Trichoderma*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 11: 117-127.
- BEJARANO, E. R., AVALOS, J., LIPSON, E. D., CERDÁ-OLMEDO, E., 1990. Photoinduced Accumulation of Carotene in *Phycomyces*. *Planta* 183: 1-9.
- BENNINK, G. J. H., 1972. Photomorphogenesis in *Penicillium isariaeforme* I. The Action Spectrum for Light-induced Sporulation. *Acta Bot. Neerl.* 21: 528-534.
- BERGER, R. G., BÖKER, A., FISCHER, M., TAUBERT, J., 1999. Microbial Flavors. in: TERANISHI ET AL. (Eds.), *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 229-238.
- BISCHOF, J., 1969. *Vergleichende Untersuchungen über Wachstum, Sekundärstoffproduktion und Phenolaseaktivität bei einigen Lentinus lepideus-Stämmen*. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- BÖKER, A., 1997. *Untersuchungen zur biotechnischen Gewinnung einer Fruchtaroma-Impact-Verbindung mit Kulturen von Basidiomyceten*. Dissertation, Universität Hannover.
- BRODIE, H. J., 1975. *The Bird's Nest Fungi*. University of Toronto Press, Toronto.
- BUSER, H.-R., ZANIER, C., TANNER, H., 1982. Identification of 2,4,6-Trichloroanisole as a Potent Compound Causing Cork Taint in Wine. *J. Agric. Food Chem.* 30: 359-362.
- BUSWELL, J. A., ERIKSSON, K.-E. L., 1994. Effect of Lignin-related Phenols and Their Methylated Derivatives on the Growth of Eight White-Rot Fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 169-174.
- CAMPUZANO, V., GALLAND, P., ALVAREZ, M. I., ESLAVA, A. P., 1996. Blue-light Receptor Requirement for Gravitropism, Autochemotropism and Ethylene Response in *Phycomyces*. *Photochem. Photobiol.* 63 (5): 686-694.
- CETTO, B. (Ed.), 1992. *Enzyklopädie der Pilze*. BLV Verlagsgesellschaft, München.
- CHEBOTAREV, L. N., ZEMLYANUKHIN, A. A., 1973. Effect of Visible Light and Ultraviolet Rays on the Activity of Oxidation Enzymes in Molds. *Microbiology* 42: 196-200.

- CUTLER, H. G., 1994. Advances in the Use of Brassinosteroids. in: HEDIN, P. A. (Ed.), *Natural and Engineered Pest Management Agents. ACS Symp. Ser. 551*, American Chemical Society, Washington DC, 85-102.
- CUTLER, H. G., 1995. Microbial Natural Products That Affect Plants, Phytopathogens, and Certain Other Microorganisms. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14 (5): 413-444.
- DAAYF, F., BEL-RHLID, R., BÉLANGER, R. R., 1997. Methyl Ester of p-Coumaric Acid: A Phytoalexin-like Compound from Long English Cucumber Leaves. *J. Chem. Ecol.* 23 (6): 1517-1526.
- DAVIES, P. J., 1995. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. in: DAVIES, P. J., *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, New York, 1-12.
- DE JONG, E., FIELD, J. A., SPINNLER, H.-E., WIJNBERG, J. B. P. A., DE BONT, J. A. M., 1994A. Significant Biogenesis of Chlorinated Aromatics by Fungi in Natural Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1): 264-270.
- DE JONG, E., CAZEMIER, A. E., FIELD, J. A., DE BONT, J. A. M., 1994B. Physiological Role of Chlorinated Aryl Alcohols Biosynthesized De Novo by the White Rot Fungus *Bjerkandera adusta* sp. Strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1): 271-277.
- DELGADO G., GUILLÉN, F., MARTÍNEZ, M. J., GONZÁLEZ, A. E., MARTÍNEZ, A. T., 1992. Light Stimulation of Aryl-Alcohol Oxidase Activity in *Pleurotus eryngii*. *Mycol. Res.* 96: 984-986.
- DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V. DIN EN ISO 2431: Lacke und Anstrichstoffe – Bestimmung der Auslaufzeit mit Auslaufbechern, Ausgabe 1996-05-00.
- FABRE, C. E., BLANC, P. J., GOMA, G., 1996. Production of Benzaldehyde by Several Strains of *Ischnoderma benzoinum*. *Sci. Aliments* 16: 61-68.
- FARAG, R. S., EL-LEITHY, M. A., BASYONY, A. E., DAW, Z. Y., 1987. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* in a Medium containing Plant Hormones, Herbicides or Insecticides. *J. Food Prot.* 50 (12): 1044-1047.
- FASIDI, I. O., OLORUNMAIYE, K. S., 1994. Studies on the Requirement for Vegetative Growth of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, a Nigerian Mushroom. *Food Chem.* 50: 397-401.
- FASIDI, I. O., AKWAKWA, D. O., 1996. Growth Requirements of *Volvariella speciosa* (Fr. ex Fr.) Sing., a Nigerian Mushroom. *Food Chem.* 55: 165-168.
- FIELD, J. A., VERHAGEN, F. J. M., DE JONG, E., 1995. Natural Organohalogen Production by Basidiomycetes. *Tibtech.* 13: 451-456.
- GALSTON, A. W., KAUR-SAWHNEY, R., 1995. Polyamines as Endogenous Growth Regulators. in: DAVIES, P. J. (Ed.), *Plant Hormones*, Kluwer Academic Publishers, New York, 158-178.
- GARNETT, E., 1958. *Studies of Factors Affecting Fruiting Body Formation in Cyathus stercoreus*. Dissertation, Indiana University.
- GOGALA, N., 1991. Regulation of Mycorrhizal Infection by Hormonal Factors Produced by Hosts and Fungi. *Experientia* 47: 331-340.
- GOSH, A. K., SENGUPTA, S., 1981. Influence of Some Growth Factors on the Production of Mushroom Mycelium in Submerged Culture. *J. Food Sci. Technol.* 19: 57-60.
- GROSS, B., ASTHER, M., 1989. Arômes de Basidiomycetes: Caractéristiques, Analyses et Productions. *Sci. Aliments* 9: 427-454.

- GROSS, B., GALLOIS, A., SPINNLER, H.-E., LANGLOIS, D., 1989. Volatile Compounds Produced by the Ligninolytic Fungus *Phlebia radiata*, Fr. (Basidiomycetes) and Influence of the Strain Specificity on the Odorous Profile. *J. Biotechnol.* 10: 303-308.
- GUTIÉRREZ, A., PRIETO, A., MARTÍNEZ, A. T., 1996. Structural Characterization of Extracellular Polysaccharides Produced by Fungi from the Genus *Pleurotus*. *Carbohydr. Res.* 281: 143-154.
- HAGEDORN, S., KAPHAMMER, B., 1994. Microbial Biocatalysis in the Generation of Flavor and Fragrance Chemicals. *Ann. Rev. Microbiol.* 48: 773-800.
- HÄGGBLUM, P., UNESTAM, T., 1979. Blue Light Inhibits Mycotoxin Production and Increases total Lipids and Pigmentation in *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 1074-1077.
- HANSEN, H. P., 1979. *Untersuchung über die Bildung flüchtiger Stoffwechselfprodukte bei einigen holzerstörenden Pilzen*. Dissertation, Universität Hamburg.
- HANSEN, H.-P., 1985. Sesquiterpene Alcohols from *Lentinus lepideus*. *Phytochemistry* 24 (6): 1293-1294.
- HANSEN, H.-P., 1986. Volatile Fragrance Compounds from the Fungus *Gloeophyllum odoratum* (Basidiomycotina). *Z. Naturforsch.* 41c: 825-829.
- HARPER, D. B., HAMILTON, J. T. G., KENNEDY, J. T., MCNALLY, K. J., 1989. Chloromethane, a Novel Methyl Donor for Biosynthesis of Esters and Anisoles in *Phellinus pomaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (8): 1981-1989.
- HOHL, N., GALLAND, P., SENGER, H., 1992. Altered Flavin Patterns in Photobehavioral Mutants of *Phycomyces blakesleeanus*. *Photochem. Photobiol.* 55 (2): 247-255.
- JANSSENS, L., DEPOOTER, H. L., SCHAMP, N. M., VANDAMME, E. J., 1992. Production of Flavours by Microorganisms. *Proc. Biochem.* 27: 195-215.
- JENNINGS, W., SHIBAMOTO, T., 1980. *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Chromatography*, Academic Press, New York.
- JOHNSON, S. W., COOLBAUGH, R. C., 1990. Light-stimulated Gibberellin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol.* 94: 1696-1701.
- KATASE, T., BOLLAG, J.-M., 1991. Transformation of trans-4-Hydroxycinnamic Acid by a Laccase of the Fungus *Trametes versicolor*. Its Significance in Humification. *Soil Science* 151 (4): 291-296.
- KHURANA, N., SAXENA, R. K., GUPTA, R., RAJAM, M. V., 1996. Polyamines as Modulators of Microcycle Conidiation in *Aspergillus flavus*. *Microbiology* 142: 517-523.
- KONDOYAN, N., BERDAGUE, J.-L., 1996. *A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds*, Edition du Laboratoire Flaveur.
- KOOPMANN, E., HAHLBROCK, K., 1997. Differently Regulated NADPH:Cytochrome P450 Oxidoreductases in Parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14954-14959.
- KOVÁCS, E., 1982. Combined Effect of Kinetin and Radiation Treatment on the Cap Opening of *Agaricus bisporus*. *Acta Alimentaria* 11 (2): 179-187.
- KRIKORIAN, A. D., 1995. Hormones in Tissue Culture and Micropropagation. in: DAVIES, P. J., *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, New York, 774-796.
- KÜHNE, B., SPRECHER, E., 1989. Enhancement of the Production of Fungal Volatiles Employing Different Adsorbents. *Flav. & Frag. J.* 4: 77-79.
- KUMAGAI, T., 1978. Myochrome System and Conidial Development in Certain Fungi imperfecti. *Photochem. Photobiol.* 27: 371-379.

- KUMAGAI, T., 1984A. Mycochrome System in the Induction of Fungal Conidiation. in: SENGER, H. (Ed.), *Blue Light Effects in Biological Systems*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 29-39.
- KUMAGAI, T., 1984B. Mycochrome System and the Effect of Molecular Oxygen in the Induction of Conidiation in the Fungus *Alternaria cichoi*, *Physiol. Plant.* 59: 590-594.
- LAPADATESCU, C., FERON, G., VERGOIGNAN, C., DJIAN, A., DURAND, A. BONNARME, P., 1997. Influence of Cell Immobilization on the Production of Benzaldehyde and Benzyl Alcohol by the White-Rot Fungi *Bjerkandera adusta*, *Ischnoderma benzoinum* and *Dichomitus squalens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 708-714.
- LAZAROVA, G., OOTAKI, T., ISONO, K., KATAOKA, H., 1991. Phototropism in Yeast: A new Phenomenon to Explore Blue Light-induced Responses. *Z. Naturforsch.* 49c: 751-756.
- LU, B. C., 1965. The Role of Light in Fructification of the Basidiomycete *Cyathus stercoreus*, *Amer. J. Bot.* 52: 432-437.
- MARTINEZ-PACHERO, M., RODRIQUEZ, G., REYNA, G., CALVO-MENDEZ, C., RUIZ-HERRERA, J., 1989. Inhibition of the Yeast Mycelial Transition and the Photogenesis of Mucorales by Diaminobutanone. *Arch. Microbiol.* 151: 10-14.
- MICHAEL, E., HENNING, B., KREISEL, H. (Eds.), 1987. *Handbuch für Pilzfreunde*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- MILES, P. G., CHANG, S. T., 1987. Fruiting of *Lentinus edodes* (Shiitake) in Liquid Media. *MIRCEN. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3: 103-112.
- MIZUNO, T., SAITO, H., NISHITOBA, T., KAWAGISHI, H., 1995. Antitumor-active Substances from Mushrooms. *Food Rev. Int.* 11 (1): 23-61.
- MORELLI, G. NELSON, M. A., BALLARIO, P., MACINO, G., 1993. Photoregulated Carotenoid Biosynthetic Genes of *Neurospora crassa*. in: PACKER, L. (Ed.), *Methods in Enzymology – Volume 214: Carotenoids – Part B – Metabolism, Genetics, and Biosynthesis*, Academic Press, San Diego, 412-424.
- MUTHUKUMAR, G., JENSEN, E. C., NICKERSON, A. W., ECKLES, M. K., NICKERSON, K. W., 1991. Photomorphogenesis in *Penicillium isariaeforme*: Exogenous Calcium Substitutes for Light. *Photochem. and Photobiol.* 53: 287-291.
- NAMBUDIRI, A. M. D., VANCE, C. P., TOWERS, G. H. N., 1973. Effect of Light on Enzymes of Phenylpropanoid Metabolism and Hispidin Biosynthesis in *Polyporus hispidus*. *Biochem. J.* 134: 891-897.
- NEIDLEMAN, S. L., GEIGERT, J., 1986. *Biohalogenation: Principles, Basic Roles and Applications*, Ellis Horwood Ltd., Chichester.
- NINNEMAN, H., 1995. Some Aspects of Blue Light Research during the last Decade, *Photochem. Photobiol.* 61: 22-31.
- OHTA, A., SHIMADA, M., HATTORI, T., HIGUCHI, T., TAKAHASHI, M., 1990A. Production of Secondary Metabolites Including a New Metabolite p-Methoxyphenylpropanol by the Brown-Rot Fungus *Lentinus lepideus*. *Mokuzai Gakkaishi* 36 (3): 225-231.
- OHTA, A., SHIMADA, M. HIGUCHI, T., TAKAHASHI, M., 1990B. Effects of Carbon and Nitrogen Nutrients on Production of Secondary Metabolites by a Brown-Rot Fungus *Lentinus lepideus*. *Mokuzai Gakkaishi* 36 (7): 565-572.
- OHTA, A., SHIMADA, M. HIGUCHI, T., TAKAHASHI, M., 1991. A New Type of O-Methyltransferase Involved in the Biosynthesis of Secondary Metabolites of a Brown-Rot Fungus *Lentinus lepideus*. *Mokuzai Gakkaishi* 37 (3): 275-280.

- OHTA, A., SHIMADA, M., 1991. Aromatic Hydroxylation of Methyl Cinnamate to Methyl 4-Hydroxycinnamate Catalyzed by the Cell-Free Extracts of a Brown-Rot Fungus *Lentinus lepideus*. *Mokuzai Gakkaishi* 37 (8): 748-752.
- ONKEN, J., 1998. *Biotechnologie lipophiler Substrate in wäßrigen Systemen: Terpen-transformation durch Basidiomyceten*. Dissertation, Universität Hannover.
- OSRAM Lichtprogramm 1999/2000 auf CD-ROM.
- PHILIPS Licht Katalog 95/96, S. 222ff.
- PIERREL, M. A., BATARD, Y., KAZMAIER, M., MIGNOTTE-VIEUX, C, DURST, F., WERCK-REICHHART, D., 1994. Catalytic Properties of the Plant Cytochrome P450 CYP73 Expressed in Yeast – Substrate Specificity of a Cinnamate Hydroxylase. *FEBS lett.* 835-834.
- RAPOIR, S., CAVALIÉ, S., CROZE, P., ANDARY, C., 1996A. Volatile Components of Ten Frozen Mushrooms (Basidiomycetes). *J. Essent. Oil Res.* 8: 63-66.
- RAPOIR, S., CAVALIÉ, S., ANDARY, C., 1996B. Investigation of Some Volatile Components of Seven Fresh Wild Mushrooms (Basidiomycetes). *J. Essent. Oil Res.* 8: 199-201.
- RAPOIR, S., MARION, C., PÉLISSIER, Y., BESSIÈRE, J.-M., 1997. Volatile Composition of Fourteen Species of Fresh Wild Mushrooms (Boletales). *J. Essent. Oil Res.* 9: 231-234.
- RAU, U., GURA, E., OLSZEWSKI, E., WAGNER, F., 1992. Enhanced Glucan Formation of Filamentous Fungi by Effective Mixing, Oxygen Limitation and Fed-Batch Processing. *J. Ind. Microbiol.* 9: 19-26.
- ROUHIER, P., BRUNETEAU, M., MICHEL, G., 1995. Structural Analysis on β -D-Glucans from *Phytophthora capsici*. *J. Carbohydr. Chem.* 14 (2): 247-254.
- SENEMAUD, C. MANGEOT, G., 1988. Über die Entstehung von fruchtartigen Aromen durch Biosynthese von Mikroorganismen. *Flüssiges Obst* 55 (12): 714-723.
- SHIMAZONO, H., SCHUBERT, W. J., NORD, F. F., 1958. Investigations on Lignins and Lignification. XX. The Biosynthesis of Methyl p-Methoxycinnamate from Specifically Labeled D-Glucose by *Lentinus lepideus*. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 1992-1994.
- SITTE, P., ZIEGLER, H., EHRENDORFER, F., BRESINSKY, A., 1991. *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen* (begr. von: Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W.), 33. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 406.
- SPRECHER, E., HANSSSEN, H.-P., 1982. Influence of Strain Specificity and Culture Conditions on Terpene Production by Fungi. *Planta med.* 44: 41-43.
- STASINOPOULOS, S. J., SEVIOUR, R. J., 1992. Exopolysaccharide Production by *Acremonium persicinum* in Stirred-Tank and Air-Lift Fermentors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 465-468.
- TABOR, C. W., TABOR, H., 1985. Polyamines in Microorganisms. *Microbiol. Rev.* 49: 81-99.
- TADA, M., 1993. Methods for Investigating Photoregulated Carotenogenesis. in: PACKER, L. (Ed.), *Methods in Enzymology – Volume 214: Carotenoids – Part B – Metabolism, Genetics, and Biosynthesis*, Academic Press, San Diego, 269-283.
- TÁMOVÁ, G., FARKAS, V., BETINA, V., 1995. Relationship between Light Intensity and the Changes in the Intracellular Level of ATP during Photoinduction in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiol.* 40: 516-518.
- TAPSOBA, H., WILSON, J. P., 1997. Effects of the Temperature and Light on Germination of Urediniospores of the Pearl Millet Rust Pathogen, *Puccinia substriata* var. *indica*. *Plant Dis.* 81 (9): 1049-1052.

- TEUNISSEN, P. J. M., FIELD, J. A., 1998. 2-Chloro-1,4-Dimethoxybenzene as a Novel Catalytic Cofactor for Oxidation of Anisyl Alcohol by Lignin Peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (3): 830-835.
- TOWERS, G. H. N., 1976. Secondary Metabolites Derived through the Shikimate-Chorismate Pathway. in: SMITH, J. E., BERRY, D. R. (Eds.), *The Filamentous Fungi, Vol II, Biosynthesis and Metabolism*, Arnold, London, 460-474.
- TOWERS, G. H. N., YAMAMOTO, E., 1985. Interactions of Cinnamic Acid and its Derivatives with Light. in: VAN SUMERE, C. F., LEA, P. J. (Eds.), *The Biochemistry of Plant Phenolics*. Phytochemical Society of Europe, 271-287.
- TRIONE, E. J., STOCKWELL, V., AUSTIN, H. A., 1988. The Effects of Polyamines on the Growth and Development of the Wheat Bunt Fungi. *Bot. Gaz.* 149 (2): 173-178.
- TURIAN, G., 1977. Fungal Differentiation. in: MEYRATH, J., BU'LOCK, J. D., *Biotechnology and Fungal Differentiation*, Academic Press, London, 1-15.
- VERHAGEN, F. J. M., VAN ASSEMA, FRISO, B. J., BOEKEMA, B. K. H. L., SWARTS, H. J. WIJNBERG, J. B. P. A., FIELD, J. A., 1998. Dynamics of Organohalogen Production by the Ecologically Important Fungus *Hypholoma fasciculare*. *FEMS Microbiol. Lett.* 158: 167-178.
- WALKER, M. A., ROBERTS, D. R., DUMBROFF, E. B., 1982. Convenient Apparatus for Methylating Small Samples with Diazomethane. *J. Chromatogr.* 241: 390-391.
- WAT, C.-K., TOWERS, G. H. N., 1977. Production of Methylated Phenolic Acids by Species of *Lentinus* (Basidiomycetes). *Phytochemistry* 16: 290-291.
- WEBSTER, T. M., 1995. New Perspectives on Vanilla. *Cereal Foods World* 40: 198-200.
- WHITFIELD, F. B., HELIDONIOTIS, F., SHAW, K. J., SVORONOS, D., 1997A. Distribution of Bromophenols in Australian Wild-Harvested and Cultivated Prawns (Shrimp). *J. Agric. Food Chem.* 45: 4398-4405.
- WHITFIELD, F. B., HILL, J. L., SHAW, K. J., 1997B. 2,4,6-Tribromoanisole: a Potential Cause of Mustiness in Packaged Food. *J. Agric. Food Chem.* 45: 889-893.
- WURZENBERGER, M., GROSCH, W., 1983. Bestimmung von 1-Octen-3-ol in Pilzen und Pilzprodukten. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 176: 16-19.
- WURZENBERGER, M., GROSCH, W., 1984. The Formation of 1-Octen-3-ol from the 10-Hydroperoxide Isomer of Linoleic Acid by a Hydroperoxide Lyase in Mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochim. Biophys. Acta* 794: 25-30.
- YAMAMURA, S., KUMAGAI, T., ODA, Y., 1978. Mycochrome System and Conidial Development in a Nonphotoinduced Isolate of *Helminthosporium oryzae*. *Can. J. Bot.* 56: 206-208.
- YAMAUCHI, H. OBATA, T., AMACHI, T., HARA, S., 1996. Aroma Production by *Neurospora* sp. Affected by Light Irradiation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1902-1904.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Jan Taubert
Geboren am: 03.09.1969 in Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

08/1976-07/1980 Grundschole, Bennigsen
08/1980-05/1982 Orientierungsstufe im Schulzentrum Nord, Springe
07/1982-05/1989 Otto-Hahn-Gymnasium im Schulzentrum Süd, Springe
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

09/1989-10/1990 Rettungsdienst des DRK, Rettungswache Springe

Studium

08/1990-06/1997 Studium der Biologie an der Universität Hannover
Abschluss: Diplom

05/1997-06/2000 Promotionsstudium an der Universität Hannover am Institut für Lebensmittelchemie unter der Leitung von Prof. Dr. R. G. Berger