

# **Entwicklung eines Aktivitätssensors für höhere Pilze bei der Terpenbiotransformation**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

***Silvia Schäfer***

***Lebensmittelchemikerin (staatl. gepr.)***

geboren am 7. Mai 1975

in Lauterbach/Hessen

2004

Referent

Prof. Dr. Dr. Berger

Korreferent

Prof. Dr. Scheper

Tag der Promotion

23.01.2004

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2001 bis November 2003 in der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des Karl-Winnacker-Institutes der DECHEMA e.V. unter der Leitung von Dr. D. Sell im Rahmen eines von dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Forschungsprojektes. Dem BMBF danke ich für die finanzielle Unterstützung.

*Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht  
mit einem Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen.*

*Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen,  
und jede von ihnen wird immer wieder von neuen Fragestellungen abgelöst.*

Hermann Hesse

## Worte des Dankes

Ich danke

- allen Institutsangehörigen der DECHEMA e.V. für die angenehme Arbeitsatmosphäre, stete Hilfsbereitschaft, interessante Gespräche und Anregungen während der praktischen Durchführung dieser Arbeit,
- Herrn Dr. Sell und Herrn Dr. Schrader für die wissenschaftliche Betreuung, stete Diskussionsbereitschaft und kritische Durchsicht der Dissertation,
- Herrn Prof. Dr. Dr. Berger von der Universität Hannover für die Betreuung der Arbeit und den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas,
- Herrn Prof. Dr. Scheper von der Universität Hannover für die Übernahme des Korreferates,
- meiner Familie für die Unterstützung während des Studiums
- und ganz besonders meinem lieben Mann, Jürgen.

---

## Zusammenfassung

Bei Terpenbiotransformationen wirken die eingesetzten Terpenkohlenwasserstoffe toxisch auf die transformierenden Mikroorganismen, so dass optimale Produktausbeuten nur unter besonderen Voraussetzungen erreicht werden können. Aufgrund dieser Substrattoxizität ist es notwendig, die Substratzugabe in Abhängigkeit der Aktivität der Mikroorganismen durchzuführen, um optimale Produktivität erreichen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Aktivitätssensor zur Bestimmung der Aktivität von höheren Pilzen entwickelt, um eine Kontrolle bzw. Regelung der Biotransformation von Terpenkohlenwasserstoffen durch Basidiomyceten und Ascomyceten zu ermöglichen. Dabei wurde mit der Übertragung des Messprinzips eines elektrochemischen Sensors begonnen, der für andere Anwendungsgebiete (Hefen und Bakterien) entwickelt worden war. Die vorgestellten Ergebnisse belegen eine prinzipielle Eignung des amperometrischen Aktivitätssensors zur Erfassung des Aktivitätszustandes Pellet bildender Submerskulturen. Eine Anwendung für ein Aktivitätsmonitoring über längere Kultivierungszeiträume ist jedoch aufgrund der physiologischen und metabolischen Eigenschaften höherer Pilze nur bedingt möglich.

Da dieses elektrochemische Prinzip auf die langfristige Aktivitätsmessung höherer Pilze nicht übertragen werden konnte, wurde als Alternative ein respirometrischer Aktivitätssensor entwickelt. Mit diesem wurden Aktivitätsveränderungen unter Zugabe von Terpenkohlenwasserstoffen untersucht, um eine aktivitätsgesteuerte Substratdosierung zur Optimierung der Transformationsleistung zu etablieren. Hierzu wurden Studien sowohl an einer bekannten Biotransformation von (+)-Limonen zu Carvon durch *Pleurotus sapidus* als auch an einer kürzlich gefundenen Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch *Chaetomium globosum* durchgeführt. Durch konstruktive Veränderungen der Sauerstoffmessung im Bioreaktor, insbesondere durch die Verwendung faseroptischer Sauerstoffsensoren, konnten Aktivitätsverläufe von Kulturen höherer Pilze unter Terpenzusatz *in situ* aufgezeigt werden. Aufgrund der stark toxischen Wirkung des (+)-Limonens und der langsamen inhibierenden Wirkung des (+)-Valencens ließ sich jedoch keine praktikable Regelungsstrategie verwirklichen. Hierzu muss sich die toxikologische Wirksamkeit schnell entfalten und eine höhere Terpentoleranz gegeben sein.

Schlagworte: *Bioaktivitätssensor, Sauerstoffzehrung, Biotransformation*

---

## **Abstract**

During terpene biotransformations the added terpene hydrocarbons show a toxic effect towards the transforming microorganisms, thus optimized yields can only be performed under special conditions. Due to the toxicity of the substrates it is essential to adjust the feeding rate to the activity of the microorganisms in order to obtain maximum productivity.

In this thesis an activity sensor to determine the activity of higher fungi was developed to enable the control and regulation of the biotransformation of terpenes with basidiomycetes and ascomycetes. Initially the measuring principle of an electrochemical sensor, originally developed for other application areas (yeasts and bacteria), was applied. The results presented demonstrate the applicability in principle of this amperometric activity sensor for determining the activity of pellet-forming higher fungi.

However, due to the physiological and metabolic properties of higher fungi its implementation for activity monitoring during long-term processes is only possible once special parameters have been determined. As the electrochemical principle could not be transferred to long-term activity measurement of higher fungi, a respirometric sensor was developed. With the aid of the respirometric sensor the changes in activity of higher fungi with the addition of terpene hydrocarbons were investigated to establish an activity controlled feeding strategy to optimize the performance of the transformation. For this purpose a study of the published biotransformation of (+)-limonene to carvone by *Pleurotus sapidus* and of a newly discovered biotransformation of (+)-valencene to (+)-nootkatone by *Chaetomium globosum* was made. By means of structural changes to the oxygen measurement in bioreactors, particularly by using fibre-optic oxygen sensors, it was possible to use *in situ* respirometric activity measurements to monitor the activity of higher fungi in the presence of terpenes. Due to the strong toxic impact of (+)-limonene and the slow inhibiting impact of (+)-valencene the automatic control of substrate feed was not feasible. For this a quick toxic impact and a higher terpene tolerance are required.

Keywords: *activity sensor, oxygen consumption rate, fungal biotransformation*

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
1.1	BIOTRANSFORMATION VON TERPENKOHLENWASSERSTOFFEN	1
1.2	AKTIVITÄTSMONITORING BIOTECHNOLOGISCHER PROZESSE	2
1.3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	3
1.4	STRUKTUR DIESER ARBEIT	4
<b>2</b>	<b><u>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</u></b>	<b>5</b>
2.1	BIOTECHNOLOGISCHE HERSTELLUNG TERPENOIDER AROMASTOFFE	5
2.1.1	AROMASTOFFE	5
2.1.1.1	Geschmackliche und geruchliche Eigenschaften von Lebensmitteln	5
2.1.1.2	Rechtliche Regelungen über Aromastoffe	7
2.1.2	TERPENE	8
2.1.2.1	Aufbau und Biosynthese der Terpene	8
2.1.2.2	Terpenoide als Aromastoffe	10
2.1.2.3	Toxische Wirkung von Terpenen auf Mikroorganismen	11
2.1.3	PILZE ALS BIOKATALYSATOREN	12
2.1.3.1	Abbau von Substanzen durch höhere Pilze	12
2.1.3.2	Biotransformation von Steroiden durch höhere Pilze	13
2.1.4	BIOTRANSFORMATIONEN ZUR HERSTELLUNG NATÜRLICHER AROMEN	14
2.2	METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON MIKROORGANISMEN	17
2.2.1	DEFINITIONEN DER MIKROBIELLEN AKTIVITÄT	17
2.2.2	PARAMETER ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	18
2.2.3	AMPEROMETRISCHE BIOAKTIVITÄTSSENSOREN	19
2.2.3.1	Allgemeines zu amperometrischen Bioaktivitätssensoren	19
2.2.3.2	Amperometrische Quantifizierung (potentiostatische Methode)	19
2.2.3.3	Amperometrische Aktivitätsmessung ohne Redoxmediatoren	22
2.2.3.4	Amperometrische Aktivitätsmessung mit Redoxmediatoren	25
2.2.4	RESPIROMETRISCHE MESSUNGEN	26
2.3	SAUERSTOFFSENSOREN	28
2.3.1	NACHWEIS- UND BESTIMMUNGSMETHODEN FÜR SAUERSTOFF	28
2.3.1.1	Amperometrische Sauerstoffmessung (Clark-Elektrode)	29

---

2.3.1.2	Optische Sauerstoffmessung (Fluoreszenzsensor)	30
2.3.2	VERWENDETE SAUERSTOFFSENSOREN	33
2.3.2.1	Sauerstoffmessgerät von Rank Brothers Ltd (Clark-Prinzip)	33
2.3.2.2	Sauerstoffelektrode von Ingold (Clark-Prinzip)	34
2.3.2.3	Sauerstoffsensoren der Comte GmbH (faseroptisch)	34
2.3.2.4	Sauerstoffsensitive Folien der Presens GmbH (faseroptisch)	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>UNTERSUCHTE BIOTRANSFORMATIONEN</b>	<b>37</b>
3.1.1	ALLGEMEINES ZU DEN UNTERSUCHTEN BIOTRANSFORMATIONEN	37
3.1.2	BIOTRANSFORMATION VON (+)-LIMONEN ZU CARVON ( <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> )	38
3.1.3	BIOTRANSFORMATION (+)-VALENCEN ZU NOOTKATON ( <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> )	38
<b>3.2</b>	<b>AKTIVITÄTSMESSUNG MIT AMPEROMETRIE</b>	<b>40</b>
3.2.1	CYCLOVOLTAMMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN VON SUBMERSKULTUREN VON <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> UND MEDIUM	40
3.2.2	EINSATZ VON REDOXMEDIATOREN IN SUBMERSKULTUREN VON <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i>	45
3.2.2.1	Redoxmediatorscreening in Submerskulturen von <i>Pleurotus sapidus</i>	45
3.2.2.2	Strom/Zeit-Kurven mit 3,6-Diamino-durol zur Aktivitätsmessung von <i>Pleurotus sapidus</i>	55
3.2.3	BEMERKUNGEN ZU DEN AKTIVITÄTSMESSUNGEN MIT AMPEROMETRIE	61
<b>3.3</b>	<b>AKTIVITÄTSMESSUNG MIT RESPIROMETRIE</b>	<b>62</b>
3.3.1	MOTIVATION ZUM EINSATZ VON RESPIROMETRIE ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	62
3.3.2	QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER SAUERSTOFFZEHRUNGSKURVEN	62
3.3.3	CHARAKTERISTIK DER MESSUNG MIT DEM ZWEI-KANAL-SAUERSTOFFMESSGERÄT	64
3.3.3.1	Verdünnungsversuche von Submerskulturen von <i>Chaetomium globosum</i> und <i>Pleurotus sapidus</i>	64
3.3.3.2	Auswirkung von Turraxen der Submerskulturen auf die Sauerstoffzehrung	65
3.3.3.3	Stabilität der Sauerstoffmessung in Gegenwart von (+)-Limonen und (+)-Valencen	67
3.3.3.4	Auswirkung der Zugabe von Toxinen und Substraten auf die Sauerstoffzehrung	68
3.3.4	CHARAKTERISTIK DER MESSUNGEN MIT DER EXTERNEN SAUERSTOFFOPTODE DER COMTE GMBH (MOPS)	71
3.3.4.1	Messcharakteristik des MOPS	71

---

---

3.3.4.2	Einfluss von (+)-Valencen auf die Messcharakteristik des MOPS	72
3.3.4.3	Beschichten des MOPS mit Teflon	74
3.3.5	CHARAKTERISTIK DER MESSUNGEN MIT DER INTERNEN SAUERSTOFFOPTODE DER PRESENS GMBH	76
3.3.5.1	Auswahl der Beschichtung der sauerstoffsensitiven Folien der Presens GmbH	76
3.3.5.2	Messung der Sauerstoffzehrung in Schüttelkolben mit sauerstoffsensitiven Folien	77
3.3.5.3	Messung der Sauerstoffzehrung in Spinnerflasks und im Bioreaktor mit sauerstoffsensitiven Folien	78
3.3.6	BEMERKUNGEN ZU DEN SAUERSTOFFZEHRUNGSMESSUNGEN	81
3.3.7	ALLGEMEINES ZU DEN AKTIVITÄTSMESSUNGEN VON <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> UND <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i>	82
3.3.8	AKTIVITÄTSMESSUNG VON <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> IN GEGENWART VON (+)-LIMONEN	83
3.3.9	AKTIVITÄTSMESSUNG VON <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> IN GEGENWART VON (+)-VALENCEN	88
3.3.10	AKTIVITÄTSMESSUNG VON <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> IN GEGENWART VON (+)-LIMONEN	90
3.3.11	AKTIVITÄTSMESSUNG VON <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> IN GEGENWART VON (+)-VALENCEN	92
3.3.12	AKTIVITÄTSMESSUNG VON <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> IN GEGENWART VON LÖSUNGSMITTELN	97
3.3.13	BEMERKUNGEN ZU DEN AKTIVITÄTSSSTUDIEN	99
<b>3.4</b>	<b>IN SITU-AKTIVITÄTSMONITORING MIT FASEROPTISCHEN SAUERSTOFFSENSOREN</b>	<b>101</b>
3.4.1	MOTIVATION ZUM EINSATZ VON SPINNERFLASK-KULTIVIERUNGEN	101
3.4.2	EINSATZ VON SAUERSTOFFSENSITIVEN FOLIEN ZUR <i>IN SITU</i> -AKTIVITÄTSMONITORING	102
3.4.3	BIOTRANSFORMATIONEN VON VALENCEN ZU NOOTKATON DURCH <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> IN SPINNERFLASKS	104
3.4.3.1	Allgemeines zu den Biotransformation von <i>Chaetomium globosum</i> in Spinnerflasks	104
3.4.3.2	Bestimmung geeigneter Kultivierungsparameter für Kultivierungen von <i>Chaetomium globosum</i> in Spinnerflasks	104
3.4.3.3	Einfluss der Belüftungsrate auf die Nootkatonbildung	105
3.4.3.4	Einsatz von Hohlfasermembranen als Belüftungseinheit	108
3.4.4	BEMERKUNGEN ZUM AKTIVITÄTSMONITORING IN DEN SPINNERFLASKS	110

---

---

<b>3.5 KULTIVIERUNG IM BIOREAKTOR</b>	<b>112</b>
3.5.1 MOTIVATION ZUR DURCHFÜHRUNG VON KULTIVIERUNGEN IM BIOREAKTOR	112
3.5.2 ALLGEMEINE BEOBACHTUNGEN BEI KULTIVIERUNGEN VON <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> UND <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> IM BIOREAKTOR	112
3.5.3 KULTIVIERUNGEN MIT <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> IN BIOREAKTOREN	113
3.5.3.1 Rieselbett-Kultivierungen von <i>Pleurotus sapidus</i>	113
3.5.3.2 Submerskultivierungen von <i>Pleurotus sapidus</i> im Bioreaktor	115
3.5.4 SUBMERS-KULTIVIERUNGEN VON <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i> IM BIOREAKTOR	117
3.5.4.1 Bestimmung geeigneter Parameter für Kultivierungen von <i>Chaetomium globosum</i> im Bioreaktor (ohne Zusatz von (+)-Valencen)	118
3.5.4.2 Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton durch <i>Chaetomium globosum</i> im Bioreaktor	118
3.5.4.3 Bemerkungen zur Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton durch <i>Chaetomium globosum</i> im Bioreaktor	122
3.5.5 BEMERKUNGEN ZU DEN KULTIVIERUNGEN IN DEN BIOREAKTOREN	123
<b>4 <u>SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK</u></b>	<b>126</b>
<b>5 <u>EXPERIMENTELLER TEIL</u></b>	<b>130</b>
<b>5.1 VERWENDETE ORGANISMEN</b>	<b>130</b>
<b>5.2 CHEMIKALIEN</b>	<b>130</b>
5.2.1 MEDIENBESTANDTEILE	130
5.2.2 REDOXMEDIATOREN	130
5.2.3 LÖSUNGSMITTEL	131
5.2.4 TERPENSUBSTRATE UND STANDARDSUBSTANZEN FÜR DIE GCMS	132
5.2.5 SONSTIGE CHEMIKALIEN	132
<b>5.3 GERÄTE</b>	<b>133</b>
5.3.1 AKTIVITÄTSMESSGERÄTE	133
5.3.1.1 Galvanostaten/Potentiostaten	133
5.3.1.2 Sauerstoffmessgeräte	133
5.3.2 BIOREAKTOREN	134
5.3.2.1 Infors ISF 100	134
5.3.2.2 Bioengineering	135

---

---

5.3.2.3	Rieselbettreaktor	136
5.3.2.4	Spinnerflask	137
5.3.3	GCMS	138
5.3.4	SONSTIGE LABORGERÄTE	138
<b>5.4</b>	<b>KULTIVIERUNG UND BIOTRANSFORMATION</b>	<b>140</b>
5.4.1	SUBMERS-KULTIVIERUNG VON <i>PLEUROTUS SAPIDUS</i> UND <i>CHAETOMIUM GLOBOSUM</i>	140
5.4.2	ZUGABE VON TERPENEN ZUM KULTIVIERUNGSMEDIUM	142
5.4.2.1	Art und Weise der Zugabe von Terpenkohlenwasserstoffen	142
5.4.2.2	Berechnung der Angaben der Konzentrationserhöhung	142
<b>5.5</b>	<b>AMPEROMETRIE</b>	<b>143</b>
5.5.1	ALLGEMEINER VERSUCHSAUFBAU FÜR AMPEROMETRISCHE MESSUNGEN	143
5.5.2	CYCLOVOLTAMMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN (REDOXMEDIATORSCREENING)	144
5.5.3	AUFNAHME VON STROM/ZEIT-KURVEN	146
<b>5.6</b>	<b>RESPIROMETRIE</b>	<b>146</b>
5.6.1	AUFNAHME DER SAUERSTOFFZEHRUNG ALS AKTIVITÄTSMESSUNG	147
5.6.2	AKTIVITÄTSMESSUNG MIT EXTERNER CLARK-ELEKTRODE	147
5.6.3	AKTIVITÄTSMESSUNG MIT INTERNER CLARK-ELEKTRODE	147
5.6.4	AKTIVITÄTSMESSUNG MIT EXTERNEM OPTISCH SENSITIVEN SAUERSTOFFSENSOR	148
5.6.5	AKTIVITÄTSMESSUNG MIT INTERNEM OPTISCH SENSITIVEN SAUERSTOFFSENSOR	148
<b>5.7</b>	<b>ANALYTIK</b>	<b>150</b>
5.7.1	BESTIMMUNG DES GEHALTES AN BIOTROCKENMASSE UND DES GLUCOSEGEHALTES	150
5.7.2	BESTIMMUNG DER GEHALTE AN TERPENKOHLENWASSERSTOFFEN MIT GCMS	150
5.7.2.1	Probenvorbereitung für die Gaschromatographie	150
5.7.2.2	Berechnung der Terpengehalte	151
5.7.2.3	Bestimmung der Gehalte an Limonen und Carvon	152
5.7.2.4	Bestimmung der Gehalte an Valencen und Nootkaton	154
5.7.2.5	Reinheitskontrolle der eingesetzten Valencen-Substrate	155
<b>5.8</b>	<b>ENTSORGUNGSHINWEISE</b>	<b>156</b>
5.8.1	ENTSORGUNG VON CHEMIKALIEN	156
5.8.2	ENTSORGEN VON BIOLOGISCHEM MATERIAL	156
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>157</b>

---

---

## Abkürzungen

% vol	Volumenprozent
AromenV	Aromenverordnung
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BTM	Gehalt an Biotrockenmasse
CoA	Coenzym A
dest.	destilliert
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
GC	Gaschromatographie
GCMS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor
GDA	Glutardialdehyd
HNQ	2-Hydroxy-1,4-naphtochinon
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IST	interner Standard
LED	Leuchtdiode ( <u>L</u> ight <u>e</u> mitting <u>d</u> iode)
MOPS	<u>m</u> ikrocontrollergesteuerter <u>o</u> ptischer <u>p</u> ortable <u>s</u> auerstoffsensordetektor
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachweisbar
NFV	Novel Food Verordnung (Verordnung über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten)
SF1	Spinnerflask 1
SF2	Spinnerflask 2
stan	Standard
SZ	Sauerstoffzehrung
VO	Verordnung
vs	versus

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Biotransformation von Terpenkohlenwasserstoffen

Die Biotechnologie wird als eine Schlüsseltechnologie des 21. Jahrhunderts angesehen. Es hängt viel davon ab, wie wir die Potentiale von biotechnologischen Anwendungen nutzen werden. Bereits im Altertum machten sich die Menschen die Fähigkeiten und Stoffwechsellleistungen von Hefen, Schimmelpilzen, Milchsäurebakterien und anderen Mikroorganismen zunutze. Schon vor ca. 8000 Jahren stellten die Sumerer und Babylonier mit Hilfe von Pilzen ein alkoholisches Getränk her, welches als Vorläufer des Bieres gilt. Myzelbildende höhere Pilze haben im Laufe der Zeit eine wichtige Bedeutung und Anwendung bei der Herstellung und Veredelung von Lebensmitteln erlangt. Pilze werden nicht nur als Biokatalysatoren verwendet, Fruchtkörper von Ständerpilzen (Basidiomyceten) dienen den Menschen zur Ernährung (z.B. Kulturchampignon, Austernseitling, Shiitake). Von den weit mehr als 100 000 bekannten verschiedenen Pilzarten (Mycobionta) werden einige zur industriellen Produktion von wichtigen Substanzen und Lebensmitteln verwendet. Im Lebensmittelbereich finden sich z.B. asiatische Fermentationsprodukte (Sojasauce, Pilzreis), Edelschimmelkäse (Roquefort, Camembert), organische Säuren (Citronen- und Gluconsäure), Vitamine (Riboflavin) und Aromastoffe. Hochwertige technische Enzyme (z.B.  $\alpha$ -Amylase, Pectinasen, Lipasen und Proteasen) werden durch Kultivierungen mit *Aspergillus*-Arten hergestellt.

Aufgrund ihres reichen Enzymarsenals können höhere Pilze Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen durchführen (Busmann & Berger 1994). In der Literatur wurde über die Fähigkeit der Basidiomyceten berichtet, Aromastoffe und eine Vielzahl von Terpenen zu synthetisieren (Sprecher & Hanssen 1985, Abraham et al. 1994).

Oxyfunktionalisierungen lipophiler Substrate stellen ein interessantes Aufgabengebiet in der Biotechnologie dar. Da diese Transformationen wegen der chemischen Inkompatibilität lipophiler und wässriger Systeme mit teils erheblichen Problemen verbunden sind, liegen noch keine konventionellen Lösungsansätze vor. In dieser Arbeit wurden Lösungsansätze für Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen durch höhere Pilze im Hinblick auf ihre industrielle Umsetzung untersucht.

Höhere Pilze sind als Biokatalysatoren für die Transformation von Terpenkohlenwasserstoffen zu höherwertigen Aromastoffen für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie (Schrader & Berger 2001) und für Biotransformationen von Steroiden (Smith 1984) geeignet (vgl. 2.1.3.2).

Die Umsetzung solcher Biotransformationen in industrielle Bioprozesse gestaltet sich jedoch äußerst schwierig.

Aufgrund der geringen Löslichkeiten in Wasser und der hohen Flüchtigkeit der Terpenkohlenwasserstoffe sind Biotransformationen mit Submerskulturen höherer Pilze erschwert. Die Substrat- und Produkteigenschaften sind von Natur aus nicht für einen biotechnologischen Prozess in Submerskultur geeignet.

Ein weitaus wichtigerer Umstand, der die Entwicklung technischer Bioprozesse erschwert, ist die Tatsache, dass Terpene in höheren Konzentrationen toxisch wirken und die transformierenden Organismen stark schädigen. Die Oxyfunktionalisierung der Terpenkohlenwasserstoffe kann als Entgiftungsreaktion der Pilze verstanden werden. Sie tritt ab einer gewissen Mindestkonzentration der toxischen Substrate auf, die dann bereits deutliche Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten im Vergleich zu einer Submerskultur ohne Zusatz von Terpenkohlenwasserstoffen zeigt. Je nach verwendetem transformierendem Organismenstamm und Art der Terpenkohlenwasserstoffe können optimale Konzentrationen für die Biotransformation und letale Substratkonzentrationen nahe beieinander liegen.

### **1.2 Aktivitätsmonitoring biotechnologischer Prozesse**

Um einen effizienten Umsatz in der Biotechnologie zu erhalten, muss die Vitalität und Aktivität der Mikroorganismen kontinuierlich kontrolliert werden. Bei konventionellen Kultivierungen ist der Gehalt an Biotrockenmasse eine der wichtigsten Messgrößen. Oft wird zu diesem Zwecke nur der Gesamtfeststoffgehalt der Kulturbrühe ermittelt, der sich aus der Biomasse der Mikroorganismen, anderen Feststoffpartikeln und toten Zellen bzw. Zelltrümmern zusammensetzt.

Die Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse ist im Bereich der Bakterien- und Hefekultivierungen etabliert und kann zum Monitoring des Wachstums eingesetzt werden. Für eine Aktivitätskontrolle ist die Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse nur bedingt geeignet, da auch tote Zellen miterfasst werden, die in der Regel keinen Beitrag mehr zum biotechnologischen Prozess leisten.

Für höhere Pilze, die in Submerskultur zur Pelletbildung neigen, ist ein solches Verfahren als Prozesskontrolle im Sinne eines Aktivitätsmonitoring nicht geeignet, da die gebildeten Pellets im Inneren aus inaktiviertem Myzel bestehen und nur in der äußeren Peripherie aktiv sind.

Auch der Glucoseverbrauch, der gelegentlich als Aktivitätsparameter verwendet wird, ist im Falle von Kultivierungen mit höheren Pilzen nicht verwendbar, da er zu gering ist und messtechnisch weniger gut zu erfassen ist. Zur Überwachung und Steuerung der

Biotransformation ist eine *in situ*-Prozesskontrolle unabdingbar, denn so können die sich im Verlauf der Biotransformation ändernden Parameter erkannt und in geeigneter Weise reguliert werden. Für eine aktivitätsgesteuerte Zugabe der Substrate wird ein leistungsfähiger Sensor benötigt, der bei unterschiedlichen Prozessbedingungen geeignet ist, die Aktivität mit genügender Genauigkeit zu erfassen.

In der Literatur ist die Anwendung einer biochemischen Brennstoffzelle als Aktivitätsmonitor (vgl. Abb. 2-6) bereits für Bakterien, Hefen und tierische Zelllinien beschrieben worden (Holtmann & Sell 2002, Pescheck et al. 2002). Die Grundlage des Messsystems liegt in der Bildung bzw. Freisetzung reduzierter, elektroaktiver Substanzen durch stoffwechselaktive Mikroorganismen. Zur Verstärkung des Signals werden Redoxmediatoren eingesetzt, die als Elektronentransmitter zwischen Elektrode und Organismus dienen (2.2.3.4, Abb. 2-7).

### **1.3 Zielsetzung dieser Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Aktivitätssensor für Pellet bildende höhere Pilze entwickelt werden. Die dazu durchgeführten Experimente hatten nicht in erster Linie die Optimierung des Bioprozesses und die Erhöhung der Ausbeuten zum Ziel. Die Bestimmung der fungalen Aktivität in Gegenwart von Terpenkohlenwasserstoffen und die sich daraus ergebenden Rückschlüsse auf Substratdosierungsstrategien zur Maximierung der Produktausbeute war das Hauptanliegen dieses Forschungsprojektes.

Zur Entwicklung eines integrierten Bioprozesses mit maximaler Produktausbeute ist es unerlässlich, die Substratzufuhr von der Zellaktivität der Pilze abhängig zu machen. Diese Kopplung soll es ermöglichen, maximale Substratkonzentrationen im Kultivierungsmedium unter Kontrolle der Aktivität der Mikroorganismen zu gewährleisten und gleichzeitig letale Konzentrationen zu vermeiden. Eine vielversprechende Alternative zur Bestimmung mikrobieller Aktivität stellen die auf dem Prinzip der Biobrennstoffzelle basierenden amperometrischen Sensoren dar, die sich bereits zum Aktivitätsmonitoring von beispielsweise Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie und Klärschlämmen etabliert haben. Dieser Bioaktivitätssensor sollte in dieser Arbeit umgestaltet werden, dass eine Aktivitätsmessung terpenttransformierender höherer Pilze während des gesamten Bioprozesses möglich ist. Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, Aktivitätsstudien höherer Pilze (hier *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum*) in Gegenwart von Terpenkohlenwasserstoffen (hier beispielhaft (+)-Limonen und (+)-Valencen) durchzuführen.

## 1.4 Struktur dieser Arbeit

Diese Arbeit ist so strukturiert, dass zunächst in einem theoretischen Teil die Grundlagen über Aromastoffe, Biotransformationen, Aktivitätsmessung, Elektrochemie, Sauerstoffmessung und Lumineszenzsensoren zusammengestellt sind. Im darauffolgenden Kapitel sind die Ergebnisse dargestellt und die neuen Erkenntnisse über die Anwendbarkeit der behandelten Aktivitätssensoren, die jeweiligen Studien über die Aktivitätsveränderungen von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* sowie die Beobachtungen bei den Kultivierungen im jeweiligen Kontext diskutiert. Die verwendeten Materialien und Methoden sind im experimentellen Teil zusammengestellt.

Die Biotransformation von (+)-Limonen zu Carvon durch *Pleurotus sapidus* diente in der vorliegenden Arbeit als Modell, da die toxische Wirkung in diesem Falle bereits in der Literatur beschrieben wurde (3.1.2). Die über die Aktivitätssensorik gewonnenen Erkenntnisse sollten jedoch primär auf die kürzlich im Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover nachgewiesene Biotransformation von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen durch *Chaetomium globosum* (3.1.3) übertragen und für dieses System optimiert werden, da für diese Biotransformation ein weitaus größeres wirtschaftliches Interesse besteht.

Beim Übergang vom Schüttelkolben-Maßstab in den 2 L-Maßstab zeigten sich deutliche Unterschiede in der Morphologie. Die Aktivitätsmessungen wurden anschließend in größeren Kulturvolumina durchgeführt, um die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf die Biotransformation höherer Pilze im industriellen Maßstab abschätzen zu können (3.4.3 und 3.5.4.2). Für den Einsatz des respirometrischen Aktivitätssensors wurde eine Prozessentwicklung im Labormaßstab und eine Verbesserung der Belüftungstechnik erarbeitet. Die Art der Belüftung ist zur Minimierung von Substrat- und Produktverlusten wichtig. Das Ende dieser Arbeit bilden Kultivierungen in Spinnerflasks (vgl. 3.4), in denen die Aktivität *in situ* mit Hilfe faseroptischer Sauerstoffsensoren bestimmt wurde.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Biotechnologische Herstellung terpenoider Aromastoffe

#### 2.1.1 Aromastoffe

##### 2.1.1.1 Geschmackliche und geruchliche Eigenschaften von Lebensmitteln

Der Genusswert und die Bekömmlichkeit eines Lebensmittels werden in hohem Maße durch sein Aroma bestimmt. Das griechische Wort „aroma“ bedeutet ursprünglich „Gewürz“. Wesentliche Qualitätskriterien für Lebensmittel sind Geschmack und Geruch.

Durch das Zusammenwirken von Geschmacks-, Geruchs- und Tastempfindungen beim Verzehr eines Lebensmittels entsteht ein charakteristischer Gesamteindruck für jedes Lebensmittel, der mit Geschmack bezeichnet wird. Geschmackstoffe unterscheiden sich von den Aromastoffen dadurch, dass sie nicht flüchtig sind und mit den Geschmacksrezeptoren wahrgenommen werden. Aromastoffe werden als flüchtige Stoffe über die Geruchsrezeptoren in der Nase (nasal) und im Rachenraum (retronasal) wahrgenommen.

Jedes Lebensmittel enthält geschmackgebende Bestandteile, die entweder natürlicherweise vorhanden sind oder beim Verarbeitungsprozess als Aromen entstehen. Aromen werden verwendet, um den typischen Geschmack eines Lebensmittels zu erhalten, zu unterstützen oder zu verstärken. Gegenwärtig werden etwa 15% aller Lebensmittel zusätzlich aromatisiert, da die auf natürliche Weise in den Lebensmitteln vorhandenen Aromastoffe nicht immer chemisch stabil sind. Außerdem besteht ein hohes Marktpotential für aromatisierte Produkte, da diese von den Verbrauchern aufgrund ihres Geschmacks vorgezogen werden.

Lebensmittel enthalten ca. 10-50 mgkg<sup>-1</sup> flüchtige Verbindungen, die sich aus einer Vielzahl von Einzelkomponenten zusammensetzen. Bis zu 500 Aromastoffe können für einen spezifischen Geruchseindruck verantwortlich sein (z.B. Kaffee, frisches Brot oder Mandarinen). Verbindungen, die das Aroma eines bestimmten Lebensmittels prägen, werden „character impact compounds“ genannt. Benzaldehyd ist z.B. typisch für Mandel und Kirschen, 1-Octen-3-ol riecht charakteristisch nach Camembert. Durch mikrobiellen Verderb, photooxidative Prozesse oder Kultivierungsfehler können Aromafehler (off-flavour) entstehen. Orangensaft kann z.B. eine Terpennote bekommen, wenn Limonen oxidativ oder mikrobiell zu Carvon oxidiert wird.

Die Aromawirksamkeit verschiedener Substanzen wird anhand von Schwellenwerten charakterisiert. Darunter versteht man die Konzentration einer Verbindung, die zur Erkennung ihres Geruchseindrucks ausreicht (Tab. 2-1).

**Tab. 2-1 Geruchsschwellenwerte einiger Aromastoffe in Wasser (Belitz & Grosch 1992)**

<b>Verbindung</b>	<b>Schwellenwert mgL<sup>-1</sup></b>
Ethanol	100
Maltol	35
Benzaldehyd	0.35
Buttersäure	0.2
Vanillin	0.02
Himbeerketon	0.01
Limonen	0.01
Ethylbutyrat	0.001
(+)-Nootkaton	0.001
(-)-Nootkaton	1.0
Methylthiol	0.000 02
1-p-Menthen-8-thiol	0.000 000 02

Die meisten Terpene besitzen ein oder mehrere chirale Zentren. Enantiomere können sich wesentlich in der Aromaintensität und -eigenschaft unterscheiden (vgl. (+)- und (-)-Nootkaton in Tab. 2-1). Die Enantiomere bzw. Diastereomere eines Terpens unterscheiden sich in der Regel in den Geruchsnoten. (1R, 3R, 4S)-Menthol hat einen süß-minzigen, kühlen und frischen Geruch, (1S, 3S, 4R)-Menthol besitzt dagegen eine phenolisch-medizinisch dumpfe Note mit krautigem Unterton. Während (-)-Nootkaton nur einen schwachen holzigen Geruch hat, riecht (+)-Nootkaton stark nach Grapefruit. (+)-Carvon riecht kümmelähnlich und kommt als Hauptbestandteil des Kümmelöls (60%) und des Dillöls vor, während (-)-Carvon als Hauptkomponente im Spearmintöl (70-80%) eine frische, minzige Note aufweist. Der in dieser Arbeit untersuchte Basidiomycet *Pleurotus sapidus* setzt (+)-Limonen in (+)-Carvon und in (-)-Carvon um (Kaspera et al. 2002); es entsteht ein natürliches Racemat. Der Ascomycet *Chaetomium globosum* setzt (+)-Valencen stereoselektiv zu (+)-Nootkaton um.

### 2.1.1.2 Rechtliche Regelungen über Aromastoffe

Der informierte und qualitätsbewusste Verbraucher fordert den Einsatz von natürlichen Aromen, so dass versucht wird, künstliche und naturidentische Aromastoffe durch natürliche zu ersetzen, um den gestiegenen Verbraucheransprüchen gerecht zu werden.

Gemäß §1 Abs.1 AromenV (Aromenverordnung 1981) sind Aromen im Sinne dieser Verordnung Erzeugnisse und deren Mischungen, auch mit einem Gehalt an zugelassenen Zusatzstoffen, die dazu bestimmt sind, Lebensmitteln einen besonderen Geruch oder Geschmack zu verleihen. Nach §4b Abs.1 AromenV dürfen zur Kennzeichnung von Aromen das Wort „natürlich“ und gleichsinnige Angaben nur gebraucht werden, wenn die aromatisierenden Bestandteile des Aromas ausschließlich aus natürlichen Aromastoffen (Anlage 1 Nr.1) oder Aromaextrakten (Anlage 1 Nr.4) bestehen. Dementsprechend können Aromastoffe, die aus natürlichen Rohstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft mit Hilfe enzymatischer oder mikrobiologischer Verfahren bzw. herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren hergestellt werden, die Auszeichnung „natürliches Aroma“ tragen.

Natürliche Aromastoffe besitzen einige Vorzüge, wie z.B. die Gewinnung aus regenerierbaren Rohstoffquellen, umweltfreundliche Herstellung durch biologische Produktionsverfahren, höhere Qualität (enantiomerenrein und weniger Fehlparfums) und die höhere Akzeptanz beim Verbraucher. Aromastoffe für die Lebensmittelproduktion werden traditionell aus Naturprodukten gewonnen. Die Herstellung erfolgt über Zerkleinern, Auspressen, Extrahieren und/oder Destillieren von pflanzlichem oder tierischem Material. Seit den 50er Jahren werden chemisch synthetisierte Substanzen im größeren Maße zum Aromatisieren von Lebensmitteln genutzt. Die im Handel erhältlichen Aromen setzen sich oft aus mehreren chemisch synthetisierten Einzelkomponenten zusammen. Seit Anfang der 80er Jahre erlangen natürliche Aromastoffe, die mit Hilfe von biologischen Systemen gewonnen werden, immer mehr an Bedeutung.

Da in der Europäischen Wirtschaftsunion nur die Bezeichnung „Aroma“ als Verkehrsbezeichnung vorgeschrieben ist (Richtlinie 88/388/EWG), kommt es zu Informationslücken in Bezug auf den Ursprung der verwendeten Aromen. Zwar ist es dem Inverkehrbringenden erlaubt, eine genauere Bezeichnung bzw. eine Beschreibung des Aromas hinzuzufügen, aber die Auslobung von natürlichen Aromen ist außerhalb der Bundesrepublik Deutschland nicht sehr verbreitet.

Obwohl Lebensmittelzusatzstoffe, Aromen und Extraktionslösungsmittel vom Anwendungsbereich der Novel Food Verordnung (NFV, Verordnung (EG) Nr. 258/97) ausdrücklich ausgenommen sind, könnten Aromastoffe, die mit einem biotechnologisch vollständig neu entwickelten Verfahren hergestellt werden, in den Anwendungsbereich der NFV gelangen. Die NFV ist für alle Lebensmittel, die bisher noch nicht in nennenswertem Umfang für den menschlichen Verzehr eingesetzt wurden, anzuwenden. Ob Aromastoffe, die mit höheren Pilzen biotechnologisch hergestellt werden, unter die NFV fallen, bleibt abzuwarten. Derzeit ist ein Vorschlag zur Änderung der NFV zur 2. Lesung im Parlament. Mit einem Inkrafttreten der Änderung der NFV wird nicht vor Anfang 2004 gerechnet.

## 2.1.2 Terpene

### 2.1.2.1 Aufbau und Biosynthese der Terpene

Terpene lassen sich formal als Polymerisationsprodukte des Kohlenwasserstoffs Isopren ( $C_5$ ) beschreiben. Je nach Anzahl der Isopren-Einheiten unterscheidet man Monoterpene ( $C_{10}$ ), Sesquiterpene ( $C_{15}$ ), Diterpene ( $C_{20}$ ), Tetraterpene ( $C_{40}$ ) und Polyterpene.

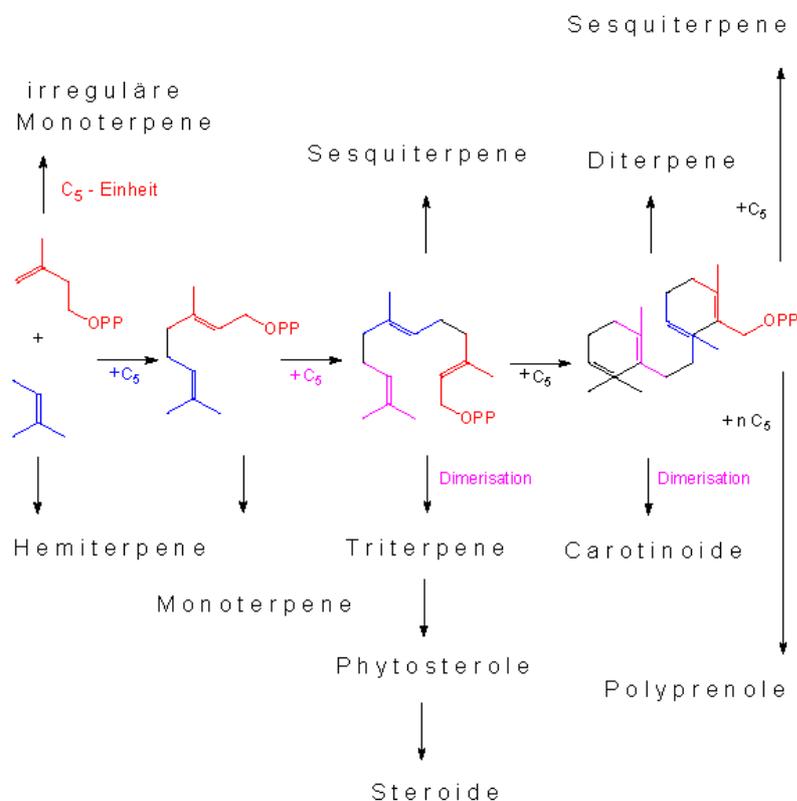


Abb. 2-1 Schematischer Aufbau der Terpene aus Isoprenmolekülen

Durch Substitutionen, Oxidationen, Cyclisierungen, Umlagerungen etc. kann eine Vielzahl von Verbindungen gebildet werden. In der Natur kommen viele unterschiedliche Terpene vor. Ihre Derivate (Alkohole, Ketone, Aldehyde und Ester) werden ebenfalls unter dem Sammelbegriff Terpene zusammengefasst (alternative Bezeichnungsweise: Terpenoide). In der Pflanzenwelt sind Terpene weit verbreitet, wobei junge Pflanzen im Allgemeinen größere Anteile an Terpenkohlenwasserstoffen, ältere dagegen größere Mengen an Terpenalkoholen und Oxidationsprodukten enthalten. Biosynthesewege, wie z.B. der des Menthofurans in *Mentha*-Spezies, können mit isotoopenmarkierten Syntheseexperimenten aufgeklärt werden (Fuchs et al. 1999).

Die Biosynthese der Terpene kann nur von Pflanzen und einigen Mikroorganismen durchgeführt werden. Hierbei kondensieren drei Moleküle Acetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, das nach Hydrolyse und Reduktion in Mevalonsäure übergeht. Durch anschließende Phosphorylierung, Decarboxylierung und Dehydratisierung kommt man zum Isopentenylpyrophosphat (IPP), welches teilweise in Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) umgelagert wird. Die Biosynthese der meisten Verbindungen geht von zwei C<sub>5</sub>-Einheiten, dem Isopentenylpyrophosphat und dem Dimethylallylpyrophosphat (Prenylpyrophosphat) aus. Das protonierte Dimethylallylpyrophosphat reagiert mit der Doppelbindung von Isopentenylpyrophosphat. Durch Eliminierung eines Protons entsteht die Schlüsselsubstanz Geranylpyrophosphat. Aus Geranylpyrophosphat können direkt Monoterpene gebildet werden, während die Sesquiterpene vom Farnesylpyrophosphat (durch Addition von Isopentenylpyrophosphat an Geranylpyrophosphat) abstammen.

Die Bildung cyclischer Monoterpene erfolgt nach *trans/cis*-Isomerisierung von Geranylpyrophosphat zu Nerylpyrophosphat, die anschließende Cyclisierung wird von einer Cyclase katalysiert. Der Ringschluss erfolgt über ein Kation, von dem sich sowohl die Terpene mit dem Menthan-Gerüst als auch  $\alpha$ -Terpineol, Limonen, bicyclische Pinane, Bornane und Thujane ableiten.

IPP und DMAPP sind die Grundbausteine der Terpenoide. Erst kürzlich hat man entdeckt, dass nicht nur Mevalonsäure, sondern auch 1-Deoxy-D-xylulose als Präkursor für IPP und DMAPP dienen kann (Piel & Boland 1997). Die Bildung der zentralen Zwischenstufe 1-Deoxy-D-xylulose erfolgt über eine aldolähnliche Kondensation von einem aktiviertem Acetatrest (Hydroxyethylthiamindiphosphat) mit Glycerinaldehyd-3-phosphat (Lichtenthaler et al. 1997).

### 2.1.2.2 *Terpenoide als Aromastoffe*

In Blüten vieler Pflanzen dienen Terpenoide als Aromastoffe zum Anlocken von Insekten. Einige Monoterpene besitzen bioaktive und antikanzerogene Wirkung (Loza-Travera 1999). Etherische Öle vieler Pflanzen besitzen eine antimikrobielle Wirkung, welche die Früchte vor mikrobiellem Verderb schützen. Die Schalen von Citrusfrüchten dürfen aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung nicht in Biokompostieranlagen eingebracht werden und sind als „Abfall“ zu entsorgen (Richtlinie 98/73/EG).

Als Duft- und Aromastoffe kommen Terpenoide in vielen etherischen Ölen höherer Pflanzen vor. Im Gegensatz zu Monoterpenkohlenwasserstoffen besitzen monofunktionalisierte cyclische und acyclische Monoterpenoide mit interessanten sensorischen Eigenschaften eine große Bedeutung als Aromastoffe (Bauer et al. 2001). Dies liegt in ihrer Struktur begründet, da aromaktive Substanzen sich durch einen hydrophoben und hydrophilen Molekülteil auszeichnen und einen hohen Dampfdruck besitzen. Aufgrund der intensiven Aromaeigenschaften werden Terpenoide als blumige Düfte in Parfum und Kosmetika industriell eingesetzt (Kraft et al. 2000). Citrus- und Minzaromen finden außerdem in Haushaltsprodukten (Reinigungsmittel, Raumaromatisierer u.ä.) sowie in Lebensmitteln (z.B. Limonade, Liköre und Süßwaren) Verwendung. Der hohe Bedarf an aromatisierenden Substanzen lässt sich nicht wirtschaftlich aus natürlichen Quellen decken, da die Gehalte an etherischen Ölen in Pflanzen mit maximal 10% zu gering sind. In den 80er Jahren wurden bereits 84% der zugesetzten Aromastoffe mittels chemischer Synthese gewonnen (Luckner 1990). Gerade terpenoide Aromastoffe werden chemisch hergestellt, da die Rohstoffe (Terpenkohlenwasserstoffe) kostengünstig zur Verfügung stehen. R-(+)-Limonen, das bis zu 97% in Orangenöl vorkommt (Ohloff 1994), wird durch Auspressen von Orangenschalen, die bei der Herstellung von Orangensaft in großen Mengen anfallen, gewonnen. Orangenöl hat eine Weltjahresproduktion von ca. 20 000 t (Ohloff 1994) gewonnen. Die industrielle Herstellung der Carvone geschieht über chemische Synthese aus enantiomerenreinen Limonenen, die als Abfallprodukte der Citrusindustrie preisgünstig zur Verfügung stehen. Dabei wird Nitrosylchlorid an die endocyclische Doppelbindung addiert, Chlorwasserstoff basenkatalysiert entfernt, so dass Carvonoxim entsteht. Aus diesem kann anschließend über eine säurekatalysierte Hydrolyse enantiomerenreines Carvon gewonnen werden (Bauer et al. 2001). In der citrusverarbeitenden Industrie fallen eine Reihe von Terpenkohlenwasserstoffen als „Abfall“ an. Limonen wird als umweltgefährlich eingeschätzt (Richtlinie 98/73/EG).

Durch geeignete Biotransformationen von Monoterpenen (Van der Werft et al. 1997) könnte dieses bisher kaum genutzte Rohstoffpotential genutzt werden. Bereits vorgebildete Aromastrukturen können in definierte, höherwertige Aromastoffe überführt werden. Die Verwendung von „Abfallprodukten“ stellt einen integrierten Umweltschutz dar, denn großvolumige industrielle Abfallströme könnten auf diese Weise verringert und Produktionsprozessen zugeführt werden.

### 2.1.2.3 Toxische Wirkung von Terpenen auf Mikroorganismen

Terpenkohlenwasserstoffe wirken auf Membransysteme von Mikroorganismen toxisch, so dass effiziente biotechnologische Umsetzungen daran scheitern, dass die Aktivität der Mikroorganismen durch das Substrat herabgesetzt wird. Generell zeigen lipophile Substanzen einen toxischen Effekt gegenüber Mikroorganismen, die toxische Wirkung korreliert oft mit dem Verteilungskoeffizienten der Substanz in einem Octanol/Wasser Gemisch. Versuche mit Monoterpenen an Bakterien zeigten, dass der Verteilungskoeffizient von Limonen im System Cytoplasma-Membran/Wasser 5300 beträgt. Bei einer Löslichkeit von ca. 0,1 mM Limonen könnte die Konzentration an Limonen in den Membranen der Bakterien 530 mM betragen, was für den Organismus schädlich ist (Berger et al. 1999). Die toxische Wirkung beruht auf den zerstörenden Effekt der Substanzen auf die Zellmembranen, welche am Beispiel von Kohlenwasserstoffen beschrieben wurden (Sikkema et al. 1995). Terpene wirken nicht nur auf Pilzmyzel, sondern auch auf Pilzsporen toxisch (Wolken et al. 2002), obwohl diese als metabolisch inert angesehen werden. Mit Sporen von *Penicillium digitatum* konnten Biotransformationen von Terpenen nachgewiesen werden (Wolken et al. 2002).

Gerade die Oxyfunktionalisierung ist eine häufige Abwehrreaktion höherer Pilze, um sich in den Mikroorganismus eingedrungene Terpenkohlenwasserstoffe durch den Einbau hydrophiler Gruppen zu entledigen und sich vor der toxischen Wirkung auf das Membransystem (Heipieper et al. 1994) zu schützen. Daneben könnten membrangebundene Enzymkomplexe durch die Erhöhung der Membranfluidität und der damit verbundenen Desintegration inaktiviert werden. Bei Biotransformationen kann die Produkttoxizität meist vernachlässigt werden, da die Produkte zu einem Großteil aus den Zellen in die wässrige Phase übergehen. Wenn die Produkte eine hohe Toxizität gegenüber dem transformierenden Organismus aufweisen, können diese inhibierenden Produkte über eine zweite Phase als Extraktions- oder Absorptionsmittel mittels ISPR (*in situ* product removal) abgetrennt werden (Straathof 2003).

### 2.1.3 Pilze als Biokatalysatoren

#### 2.1.3.1 Abbau von Substanzen durch höhere Pilze

Vergleicht man die Anzahl der bisher veröffentlichten Forschungsarbeiten über höhere Pilze mit der immensen Anzahl bekannter Pilzarten, so sind Pilze immer noch sehr wenig erforscht. Oftmals wird in der Literatur lediglich die Isolierung und Identifizierung von Pilzstämmen beschrieben, die z.B. beim Holzabbau gefunden wurden (Gibbs & Gulliver 1977). Die Nutzungsmöglichkeiten höherer Pilze sind im Wesentlichen noch unbekannt.

Im Rahmen von Bodensanierungsprojekten fand man heraus, dass Basidiomyceten die Eigenschaft besitzen, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe abzubauen. Aufgrund ihres Enzymsystems haben sie die Fähigkeit, Ligninstrukturen und weitere hochmolekulare Moleküle in lösliche depolymerisierte Verbindungen zu überführen (vgl. Hammel et al. 1986).

Diese besondere Eigenschaft führt man auf die besondere Enzymausstattung der höheren Pilze zurück. Extrazelluläre Ligninperoxidasen, Manganoxidasen und Laccasen scheinen an diesem Prozess beteiligt zu sein (Hatakka 1994, Heinzkill & Messner 1997). Höhere Pilze können eine Vielzahl organischer Stoffe oxidieren (vgl. Rosenbrock et al. 1997, Martens et al. 1996), da ihre Enzyme unspezifisch wirken (Glenn et al. 1983).

Die Abteilung Eumycota (Echte Pilze), deren Vertreter Zellwände aus Chitin bilden, untergliedert sich in drei Klassen: die Phycomycetes (Algenpilze), die Ascomycetes (Schlauchpilze) und die Basidiomycetes (Ständerpilze). Obwohl höhere Pilze keine Speichermöglichkeiten für terpenoide Aromastoffe aufweisen, haben sie die Fähigkeit, verschiedene Terpenoide *de novo* zu synthetisieren. Monoterpenkohlenwasserstoffe, Sesquiterpene und weitere Terpenoide konnten als Produkte von höheren Pilzen identifiziert werden (Sprecher & Hanssen 1985).

Da höhere Pilze nicht zur Photosynthese befähigt sind, sondern eine polyphyletische Gruppe chlorophyllfreier, heterotropher, eukaryontischer Organismen sind, ernähren sie sich chemoorganoheterotroph. Dementsprechend haben sie im Laufe der Evolution ein reiches Arsenal an Enzymen zum oxidativen Abbau organischer Substanzen (auch für aromatische Systeme) herausgebildet. Basidiomyceten eignen sich besonders, um natürliche Aromastoffe biotechnologisch für die Lebensmittelindustrie herzustellen (Lomascolo et al. 1999, Abraham et al. 1994). Die einzigartigen terpenmetabolisierenden Enzymsysteme ermöglichen es, effektive Biotransformationen exogener Terpene durchzuführen.

### 2.1.3.2 Biotransformation von Steroiden durch höhere Pilze

Die Steroide sind eine umfangreiche Gruppe von Verbindungen mit dem charakteristischen Grundgerüst des Gonans (perhydriertes Cyclopenta[a]phenanthrens), die natürlich und synthetisch hergestellt werden. Seit den 1960er Jahren wurden immer mehr Antibiotika bekannt und durch Pilzkultivierung hergestellt, die auf der Biotransformationen von Steroiden basieren. Durch die Anwendung von Biotransformationen in der pharmazeutischen Industrie können mehrstufige Syntheseprozesse erheblich verkürzt werden. Höhere Pilze können Sterine und/oder deren Seitenketten mikrobiell ab- und umbauen. Die auf diese Weise gebildeten Steroide sind in der Medizin von größter Bedeutung. Aus der Vielzahl der beschriebenen Biotransformationen sind eine Reihe von Prozessen in industrieller Anwendung. Fungale Biotransformationen werden bei  $11\alpha$ -Hydroxylierungs- und 1-Dehydrierungsreaktionen industriell angewendet. Peterson erreichte Ausbeuten um 90% bei der Umsetzung von Progesteron zu  $11\alpha$ -Hydroxyprogesteron mit *Rhizopus nigricans* ATCC 6227b (Peterson et al. 1952).  $15\alpha$ -Hydroxylierung von  $13\beta$ -Ethylgon-4-ene-3,17-dione mit *Penicillium sp.* oder *Fusarium sp.* führt zu 15-dehydro-Derivaten, aus denen Empfängnisverhütungsmittel synthetisiert werden können (Petzold & Wiechard 1976). Zu den Biotransformationen von Steroiden gibt es zahlreiche Patente, die auf kommerzielle Prozesse ausgerichtet sind.

Das Auffinden von Organismen, die die gewünschten Biotransformationen effektiv durchführen, ist entscheidend. Eine ebenso wichtige Rolle spielt die Etablierung geeigneter Kultivierungsparameter, die für eine biotechnologische Anwendung der gewünschten Biotransformation im industriellen Maßstab notwendig sind. Die relevanten Stämme wurden oft durch gezielte Mutagenese verändert, um die Transformationsleistung zu erhöhen. Ist ein potentieller Organismenstamm gefunden, dauert die Entwicklung eines industriell anwendbaren Prozesses oft mehrere Jahre. Oft eignen sich aus ca. 2000 Mikroorganismen, die die gewünschte Biotransformation durchführen können, nur wenige Organismen für einen industriellen Prozess (Smith 1984).

Bei der Optimierung der Kultivierungsparameter werden meistens zwei Stufen unterschieden. Vor der Zugabe von Substrat wurden Parameter zum optimalen Wachstum von Pilzmyzel eingestellt, nach Zugabe des Substrates werden optimale Bedingungen für die gewünschte Biotransformation eingestellt. Die Substrate werden als Pulver oder als Lösung in Aceton, Ethanol oder einem organischem Lösungsmittel zugegeben, wobei die Endkonzentration an Lösungsmittel in der Kultivierung nicht höher als 1% des Gesamtvolumens beträgt, um toxische Effekte gegenüber den Organismen zu vermeiden. Während der Biotransformation

sind zeitnahe Analysen der Kultivierungsbrühe notwendig, um die Ausbeuten zu optimieren. Bei 11 $\alpha$ -Hydroxylierungsreaktionen spielt die Begasungsrate eine große Rolle. Die Sauerstoffversorgung kann über die Rührerdrehzahl gesteuert werden, durch die auftretenden Scherkräfte wird ein Teil des Myzels zerstört. Eine vermehrte Schaumbildung stellte bei hohen Begasungsraten ein Problem dar. Bei niedrigen Rührerdrehzahlen wurde beobachtet, dass das Myzel zusammenklumpte. Dass Deacetylierungsreaktionen generell bei einer niedrigeren Temperatur (26-29°C) als Dehydrogenierungsreaktionen (32-37°C) ablaufen, wurde bei der Herstellung von Dienen mit *Corynebacteria* festgestellt (Nobile 1958). Die Endprodukte werden meist mit organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylenchlorid oder Ethylacetat direkt aus der Submerskultur extrahiert. Biotransformationen mit mehreren Reaktionsritten wurden durch Mischen von Submerskulturen zweier Organismen, die für die einzelnen Stufen optimiert wurden, untersucht. Es konnte z.B. Triamcinolon direkt aus 9 $\alpha$ -Fluorhydrocortison mit einer Mischung aus Submerskulturen von *Streptomyces roseochromogenes* und *Arthrobacter simplex* gewonnen werden (Lee et al. 1969).

Zu den industriellen Biotransformationen von Steroiden gibt es zahlreiche Veröffentlichungen und Patente, die aus mehreren Jahrzehnten Forschungsarbeit resultieren. Sie belegen, dass für die verwendeten Organismen und für die gewünschten Biotransformationen jeweils konkrete individuelle Kultivierungsparameter notwendig sind, um einen effizienten Prozess zu entwickeln. Die etablierten Bioprozesse zur Herstellung von Antibiotika, Empfängnisverhütungsmitteln und Steroiden zeigen, dass mit Hilfe industrieller Biotransformationen mit höheren Pilzen nach intensiven Forschungsarbeiten kommerzielle Produkte effizient hergestellt werden können.

#### **2.1.4 Biotransformationen zur Herstellung natürlicher Aromen**

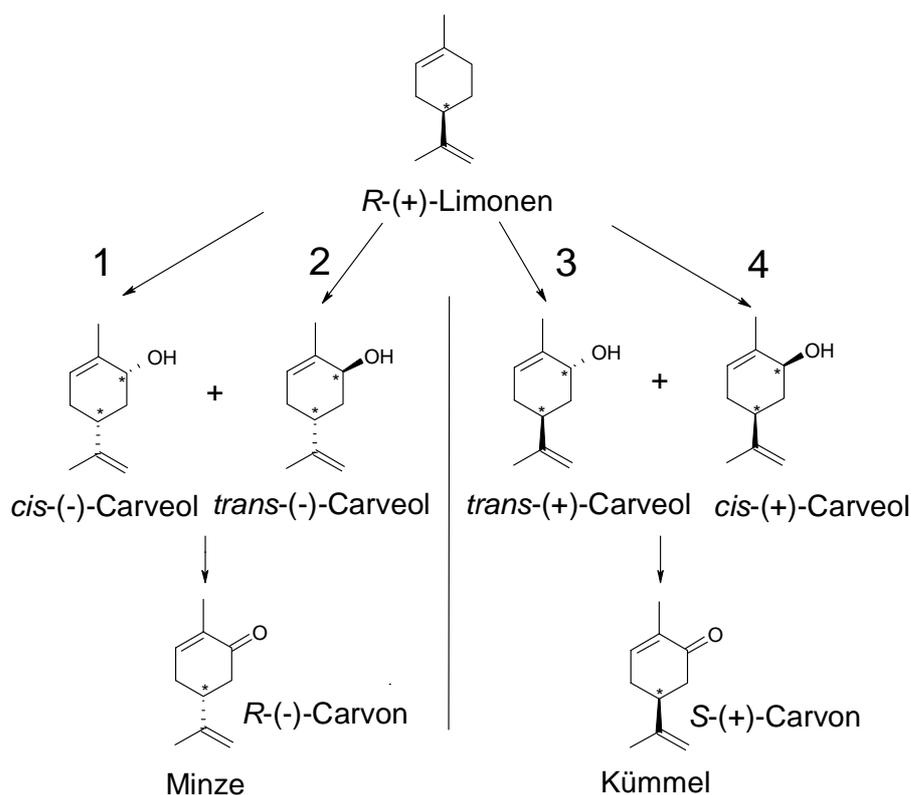
Bei der biotechnologischen Forschung geht man davon aus, dass beim Ablauf von aromabildenden Stoffwechselprodukten die für das entstehende Aroma verantwortlichen Zwischen- und Endprodukte in optimaler Zusammensetzung synthetisiert werden. Zur Aromabildung eignen sich Enzyme, Mikroorganismen, Pflanzenextrakte, sowie pflanzliche Zell- und Gewebekulturen.

Bakterien, Hefen und höhere Pilze besitzen ein beachtliches Potential, natürliche Aromen über eine Biokatalyse (Biotransformation) aus natürlichen Quellen oder *de novo* herzustellen (Vandamme & Soetaert 2002). Einige mikrobiologische Prozesse zur biotechnologischen Herstellung von Lebensmittelaromen aus natürlichen Präkursoren sind in der Literatur beschrieben worden (Janssens 1992, Krings & Berger 1998). Die Gattung *Pleurotus*, die zum

Abbau von Holz (Cellulose, Lignin) befähigt ist, besitzt ein Potential für biotechnologische Anwendungen (Cohen et al. 2002). Mit immobilisierten Zellen von *Penicillium digitatum* ließ sich in einem kontinuierlichen Prozess  $\alpha$ -Terpineol aus (+)-Limonen gewinnen (Tan & Day 1998).

Die Biotransformation von Limonen mit höheren Pilzen wurde mit einem Screening von über 60 Pilzkulturen untersucht (Demyttenaere et al. 2001). Eine umfassende Beschreibung der Biotransformation von Limonen durch Bakterien, Hefen, höhere Pilze und Pflanzen wurde von Duetz et al. (2003) publiziert.

Aus Limonen können die beiden Carvonisomere als allylische Oxidationsprodukte gewonnen werden. Sie unterscheiden sich in ihren sensorischen Eigenschaften. Als Hauptbestandteil des Kümmelöls und des Dillöls besitzt (+)-Carvon eine typische kümmelähnliche Note, während (-)-Carvon als Hauptbestandteil des Spearmintöls einen frischen, minzigen Geruch aufweist. Beide Enantiomere lassen sich sowohl durch S-(-)-Limonen als auch durch R-(+)-Limonen gewinnen (Abb. 2-2).



**Abb. 2-2**      **Synthesewege von Carvon aus (+)-Limonen durch *Pleurotus sapidus* (Kaspera 2002)**

Eine biotechnologische Anwendung zur Gewinnung von Nootkaton mit Submerskulturen von höheren Pilzen ist nicht bekannt. Kürzlich wurden Patente zur Herstellung von Nootkaton aus

Valencen durch Katalyse mit Laccase (Huang et al. 2001) und durch *Chlorella* (Hashimoto et al. 2003) veröffentlicht.

Terpenkohlenwasserstoffe sind aufgrund ihrer lipophilen Struktur nur zu einem geringen Teil in Wasser löslich. Die Wasserlöslichkeit von R-(+)-Limonen beträgt bei 25°C nur 13 mgL<sup>-1</sup> (0,10 mM), während sich Carvon bis zu 596 mgL<sup>-1</sup> (3,97 mM) in Wasser löst (Weidenhamer et al. 1993). Die Löslichkeit (+)-Valencen wurde zu 0,5 mgL<sup>-1</sup> (0,002 mM) berechnet. Bei Biotransformationen werden die Terpenkohlenwasserstoffe oft oberhalb dieser Löslichkeit (Sättigungskonzentration) eingesetzt, was zu Emulsionsbildung und/oder Ausbildung einer zweiten (lipophilen) Phase beiträgt. Eine exakte Bestimmung der Substratkonzentration im Kultivierungsmedium scheidet oftmals an diesem Phänomen.

Eine weitere physikalische Eigenschaft der Terpenkohlenwasserstoffe ist ihr hoher Dampfdruck und die damit verbundene hohe Flüchtigkeit, welche biotechnologische Prozesse erschweren. Bei Biotransformationen von Terpenkohlenwasserstoffen durch höhere Pilze handelt es sich um aerobe Prozesse, bei denen die Kulturen ausreichend belüftet werden müssen. Hierdurch werden während des Prozesses erhebliche Mengen des Substrates (weniger des polaren Produktes) über die Gasphase ausgetrieben, was dazu führt, dass die Konzentration der Terpenkohlenwasserstoffe im Medium stark variieren kann.

Blindwerte zeigen, dass ungesättigte Terpenkohlenwasserstoffe je nach Kultivierungsbedingungen (Temperatur, pH, Lichteinfluss, Sauerstoffgehalt) der Autoxidation unterliegen. Des Weiteren können säurekatalysierte Hydratisierungen und Umlagerungen auftreten. Eine Kontrolle der Biotransformationsprodukte ist daher beim Einsatz von technischem Substrat notwendig, da bei unterschiedlichen Substrateinheiten deutliche Unterschiede in der Produktzusammensetzung auftreten können.

Pilzmyzel ist hervorragend geeignet, schlecht wasserlösliche Terpene in einem beträchtlichen Maße in den lipophilen Membranen zu speichern. Je nach Gesamtmenge an Membranlipiden, die nicht nur von der Gesamtmenge an Myzel, sondern auch von der Größe und Gestalt der Pellets abhängt (Oberflächeneffekt), wird die Konzentration an Substraten in der wässrigen Phase beeinflusst. Dies hat nicht nur einen Einfluss auf die Verfügbarkeit der Terpenkohlenwasserstoffe in der wässrigen Phase, sondern zeigt auch Auswirkungen auf die Stabilität der Pellets und verändert die Aktivität der transformierenden höheren Pilze aufgrund der membrantoxischen Eigenschaften.

## 2.2 Methoden zur Bestimmung der Aktivität von Mikroorganismen

### 2.2.1 Definitionen der mikrobiellen Aktivität

In dieser Arbeit sollte ein Sensorsystem zur Bestimmung der Aktivität von höheren Pilzen entwickelt werden. Dabei stellt sich die Frage, welche Art von Aktivität bestimmt werden soll. Die Abbaugeschwindigkeit bestimmter Substrate (Katabolismus), die Zunahme an Biomasse (Wachstum) oder der Sauerstoffverbrauch (Stoffwechselaktivität) sind als Maß für die Aktivität denkbar. In der Literatur werden verschiedene Begriffe als mikrobielle Aktivität (z.B. Stoffwechsel, Metabolismus, physiologische Aktivität) verwendet. Unter „Stoffwechsel“ wird die Gesamtheit (bio)chemischer Reaktionen im Körper der Lebewesen verstanden. Nach einer weiteren Definition wird unter dem Stoffwechsel die Menge der chemischen Umsetzungen im Organismus verstanden, die zur Aufrechterhaltung der Lebensvorgänge notwendig sind. Demnach würden nicht alle Abbaureaktionen unter den Begriff Metabolismus fallen. Reaktionen, die nur dem Abbau bestimmter Stoffe ohne Energiegewinnung dienen, werden als Katabolismus bezeichnet. Konzentration der Substrate, Enzymsysteme der Mikroorganismen, Zellzahl, Kultivierungsbedingungen (Temperatur, pH, Sauerstoffgehalt) und der physiologische Zustand der Kultur beeinflussen die mikrobielle Aktivität. In der Literatur ist der Begriff der mikrobiellen Aktivität nicht einheitlich definiert. In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff Aktivität im Sinne des Energiestoffwechsels verwendet. Es wird jeweils das Vermögen der Mikroorganismen, Reduktionsäquivalente (z.B. Elektronen) abzugeben, bestimmt. Bei dem amperometrischen Messsystem dient der Redoxmediator zur Aufnahme der Reduktionsäquivalente, bei dem respirometrischen Messsystem dient Sauerstoff als Oxidationsmittel. Zu welchem Zweck die Energiegewinnung der Mikroorganismen im Rahmen der Endoxidation dient, wird hierbei nicht weiter verfolgt. Die Aktivität höherer Pilze könnte ohne Supplementierung von Terpenkohlenwasserstoffen auf den Abbau von Glucose, in Gegenwart von Terpenkohlenwasserstoffen aber auf die Biotransformation bezogen werden. Sinn und Zweck einer aktivitätsgesteuerten Biotransformation ist, dass inaktive bzw. letale Zustände der Kultur durch Zugabe von Terpenkohlenwasserstoffe vermieden werden.

### 2.2.2 Parameter zur Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse ist eine der wichtigsten Messgrößen, die für die biotechnologische Prozesskontrolle angewendet wird. In Nahrungsmittel- und medizinischen Proben soll eine möglichst niedrige Keimzahl (Biomasse) nachgewiesen werden, wohingegen in der Mikrobiologie, Biotechnologie oder in der Abwasserreinigung höhere Gehalte an Biomasse gemessen werden sollen.

Die Messung der Biotrockenmasse erfasst allerdings neben der aktiven, vitalen Biomasse auch abgestorbene Zellen und Zelltrümmer. Während für Prozesse, die die Produktion von Biomasse zum Ziel haben (Futterhefe), die Bestimmung der Gesamtbiomasse zur Prozesskontrolle genügt, ist bei der biotechnologischen Herstellung höherwertiger Produkte (z.B. Antibiotika, Insulin oder Aromastoffe) eine Unterscheidung in aktive und letale Biomasse notwendig. Um das biologische Potential optimal zu nutzen, muss die Aktivität und Vitalität der Organismen direkt und kontinuierlich analysiert werden, damit der Prozess bei Bedarf durch gezielte Maßnahmen gesteuert werden kann.

Für höhere Pilze, die in Submerskultur zur Pelletbildung neigen, ist die Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse nicht aussagekräftig, um ein Aktivitätsmonitoring zur Prozesskontrolle durchzuführen. Der Gehalt an Biotrockenmasse in Submerskulturen setzt sich hier aus lebenden und toten Zellen zusammen, da auf Grund des Messsystems (Gravimetrie) lebende nicht von toten Zellen unterschieden werden können. Da der Sauerstoffgehalt in den Pellets in einer Tiefe von ca. 100  $\mu\text{m}$  stark abnimmt (Huang & Bungay 1973), besteht das Innere der Pellets aus nicht aktivem Myzel (Camici et al. 1952). Vergrößern sich die Pellets im Laufe der Kultivierung, so nimmt zwar die aktive Oberfläche zu, aber die Zunahme an inaktivem Myzel fällt stärker ins Gewicht (Oberfläche  $\sim r^2$ ; Volumen  $\sim r^3$ ). Je nach Durchmesser und Form der Pellets kommt es zu Messfehlern. Des weiteren könnte eine Kultur mit hoher Biomasse vollständig inaktiv sein. Zum Aktivitätsmonitoring höherer Pilze bei der Terpenbiotransformation müssen also Methoden eingesetzt werden, die aktive Zellen von inaktiven unterscheiden können. Aus der kalorimetrischen Messung der abgegebenen Wärme können Rückschlüsse auf die vorhandene Biomassekonzentration gezogen werden (Birou et al. 1987). Es sind verschiedene elektrochemische Methoden zur Bestimmung des Gehaltes an aktiver Biotrockenmasse beschrieben worden (Ramsay et al. 1985, Patchett et al. 1989). Potentiometrie, Sensoren auf der Basis von Brennstoffzellen, Impedanzmessung und Amperometrie sind als elektrochemische Messverfahren unabhängig von der Trübung oder Eigenfarbe der Probe. Im vorliegenden Prozess scheidet eine Trübungsmessung aufgrund der

Pelletbildung aus, optische Methoden zur Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse dürften wahrscheinlich aufgrund der sich während des Kultivierungsprozesses ändernden Farbe und Zusammensetzung des Mediums scheitern. Durch die Unabhängigkeit der elektrochemischen Messverfahren von diesen Parametern sollte eine elektrochemische Methode weiterentwickelt werden.

### 2.2.3 Amperometrische Bioaktivitätssensoren

#### 2.2.3.1 Allgemeines zu amperometrischen Bioaktivitätssensoren

Bei den amperometrischen Bioaktivitätssensoren werden zwei Varianten unterschieden. Es gibt Messsysteme, die die reduktiven Substanzen aus dem Stoffwechsel der Mikroorganismen direkt nachweisen können (Messprinzip ohne Redoxmediator). Um die Empfindlichkeit der Messung zu erhöhen, werden Redoxmediatoren als Elektronentransmitter eingesetzt, die das Stromsignal erhöhen (Messprinzip mit Redoxmediator).

#### 2.2.3.2 Amperometrische Quantifizierung (potentiostatische Methode)

Die amperometrische Quantifizierung ist eine elektrochemische Methode, die eine einfache Bestimmung elektrochemisch aktiver Substanzen in wässrigen Lösungen ermöglicht. Sie beruht auf einem linearen Zusammenhang zwischen Messsignal und Analytkonzentration. Aus dem Zusammenhang zwischen angelegter Spannung und dem dabei fließenden Strom kann auf die Konzentration der elektroaktiven Substanzen geschlossen werden, bei konstanter Spannung ist der Stromfluss proportional zur Konzentration des Analyten. Die galvanostatische Methode, bei konstantem Strom die Spannung aufzuzeichnen und darüber Rückschlüsse auf die Konzentration zu ziehen, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht angewendet. Zur Messung des Stromes wird ein Dreielektrodensystem verwendet (Abb. 2-3).

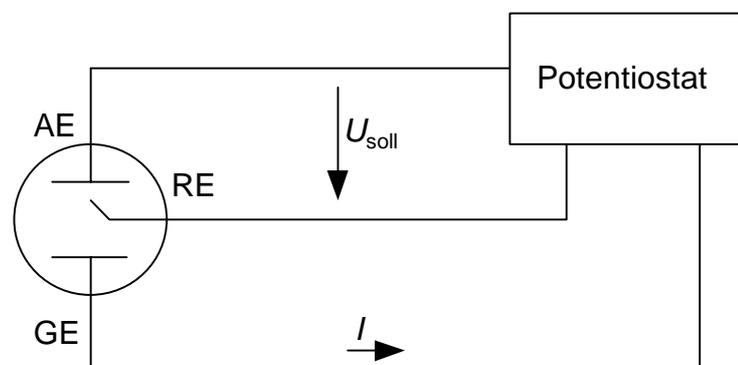


Abb. 2-3 Dreielektrodensystem in der Amperometrie

Zur Messung wird ein konstantes Potential zwischen Arbeits- (AE) und Referenzelektrode (RE) aufrechterhalten und der Strom, der zwischen Arbeits- und Gegenelektrode (GE) fließt, als Messsignal verwendet. Platin, platiniertes Titan und Glaskohlenstoff eignen sich gleichgut als Anodenmaterial und zeigen vergleichbare Stromsignale (Lämmel 1999). Für diese Arbeit wurden ausschließlich Anoden und Kathoden aus Platin eingesetzt.

Ein Potentiostat hält die Arbeitselektrode auf einem konstanten Potential (Sollspannung zwischen Arbeitselektrode und Referenzelektrode), indem die Spannung zwischen Arbeits- und Gegenelektrode reguliert wird und dabei der Stromfluss zwischen Arbeits- und Gegenelektrode variiert wird (Messsignal). Mit Hilfe der Referenzelektrode ist es möglich, das sich an der Arbeitselektrode einstellende Potential im nahezu stromfreien Zustand zu bestimmen. Das sogenannte Ruhepotential wird über die Nernstsche Gleichung durch das Verhältnis von oxidierten und reduzierten Substanzen (Stoffwechselmetabolite oder Redoxmediatormolekülen) bestimmt. Die Nernstsche Gleichung (Gleichung 1) zur Berechnung des Potentials in wässrigen Lösungen ist am Beispiel von 2-Hydroxy-1,4-naphtochinon (HNQ) dargestellt (vgl. Abb. 2-8).

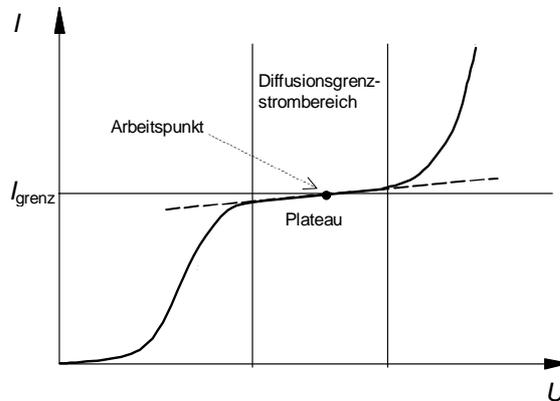
$$\varepsilon = \varepsilon^{\ominus} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[HNQ] \cdot [H^+]^2}{[HNQH_2]} \quad (1)$$

$\varepsilon$	Potential in Lösung
$\varepsilon^{\ominus}$	Standardpotential
$R$	allgemeine Gaskonstante
$T$	Temperatur in Kelvin
$F$	Faradaysche Konstante
$n$	Anzahl der übertragenen Elektronen
$[HNQ]$	Konzentration der oxidierten Form des Redoxmediators HNQ
$[H^+]$	Protonenkonzentration
$[HNQH_2]$	Konzentration der reduzierten Form des Redoxmediators HNQ

Aus der Höhe des Ruhepotentials kann nur bedingt auf die Konzentration des Analyten geschlossen werden, da sich geringfügige Änderungen im System (z.B. pH-Wert) stark auf das Potential auswirken.

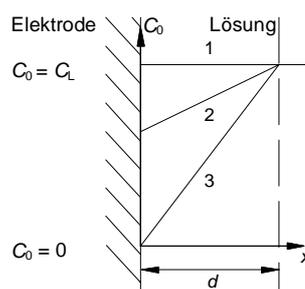
Das System befindet sich im diffusionskontrollierten Bereich, wenn alle an der Anode ankommenden Moleküle oxidiert werden. Dabei kommen überwiegend drei Transportmechanismen, nämlich Migration, Konvektion und Diffusion zur Versorgung der Anode mit elektroaktiven Substanzen in Betracht. Im diffusionskontrollierten Bereich ist der Stromfluss durch die Anzahl der Moleküle limitiert, die aufgrund der Diffusion die Elektrode

erreichen, und wird Grenzstrom genannt. Seine Höhe hängt von der Versorgung der Anode mit elektroaktiven Substanzen ab. Abb. 2-4 verdeutlicht den Diffusionsgrenzstrombereich, der sich als Plateau des Stroms in der Strom-Spannungs-Kennlinie zeigt.



**Abb. 2-4 Diffusionsgrenzstrom  $I_{\text{grenz}}$  in einer Strom-Spannungs-Kennlinie (idealisiert)**

Der diffusionskontrollierte Teil der Cyclovoltammogramme ist vom Redoxpotential des Analytmoleküls abhängig, dort werden alle an die Elektrodenoberfläche gelangenden Moleküle umgesetzt. In diesem Bereich ist der Stromfluss annähernd unabhängig vom angelegten Potential, die Nachlieferung von Analytmolekülen aus der Lösung zur Elektrodenoberfläche bestimmt weitgehend den Stromfluss. Da die diffusionsbedingte Nachlieferung proportional zur Konzentration in der Lösung ist (Abb. 2-5), besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe des Diffusionsgrenzstromes und der Konzentration der Analytmoleküle.



- 1 ohne Strom
- 2 bei kleinen Strömen
- 3 im Grenzstrombereich
- $C_L$  Konzentration der Ionen im Inneren der Lösung
- $C_0$  Konzentration der Ionen an der Elektrodenoberfläche ( $x = 0$ )
- $d$  Dicke der Nernstschen Diffusionsgrenzschicht

**Abb. 2-5 Nernstsche Diffusionsgrenzschicht in Abhängigkeit vom Konzentrationsgradient**

Die Dicke der Diffusionsgrenzschicht kann durch intensives Rühren verringert werden, was dazu führt, dass die Empfindlichkeit des Systems aufgrund einer Erhöhung der Diffusionsgrenzstromdichte zunimmt.

Der lineare Zusammenhang zwischen Diffusionsgrenzstrom und der Konzentration an reduzierten Substanzen beschreibt Gleichung 2:

$$I_{\text{grenz}} = \frac{z \cdot F \cdot D \cdot A}{d} \cdot C_D \quad (2)$$

$$\frac{I_{\text{grenz}}}{C_D} = \frac{z \cdot F \cdot D \cdot A}{d} = \text{konst.} \quad (3)$$

$I_{\text{grenz}}$	Diffusionsgrenzstrom
$z$	Anzahl der an der Elektrodenreaktion beteiligten Elektronen
$F$	Faradaysche Konstante
$D$	Diffusionskoeffizient
$A$	Fläche der Arbeitselektrode
$d$	Dicke der Diffusionsgrenzschicht
$C_D$	Konzentration der elektroaktiven Substanz im Plateaubereich der Strom-Spannungs-Kennlinie

Wird die Fläche der Arbeitselektrode, der Diffusionskoeffizient und die Dicke der Diffusionsgrenzschicht (durch gleichbleibende Anströmgeschwindigkeit) bei einer bekannten Umsatzreaktion konstant gehalten, ist die Höhe des Grenzstromes direkt proportional zur Konzentration der elektroaktiven Substanz. Dieser Zusammenhang wird in der Massentransportgleichung beschrieben (Gleichung 3).

### 2.2.3.3 Amperometrische Aktivitätsmessung ohne Redoxmediatoren

In den letzten Jahren war die Entwicklung leistungsfähiger Sensoren zur biotechnologischen Prozesskontrolle Gegenstand mehrerer Forschungs- und Projektarbeiten. Während Chemosensoren chemische Verbindungen selektiv und reversibel erfassen, erfolgt die Analytumsetzung bzw. -erkennung in den Biosensoren mit Hilfe einer biologischen Komponente. Mit einem Sensor, der durch den Umbau einer Brennstoffzelle entstand, lässt sich die Aktivität von Mikroorganismen elektrochemisch bestimmen.

Schon im Jahre 1911 führte der britische Botaniker Potter Versuche zur bioelektrischen Brennstoffzelle mit Bäckerhefe und *Escherichia coli* durch (Potter 1911). In der Weltraumforschung sollte die biochemische Brennstoffzelle zur Energiegewinnung aus Abfällen genutzt werden (Cohn 1965). Daneben finden sich noch weitere Ansätze zur Energiegewinnung und im Bereich der Bioanalytik (Karube 1981). Es gibt in der Literatur

bekannte elektrochemische Verfahren zur Bestimmung der Biotrockenmasse (Ramsay et al. 1985, Bennetto et al. 1987). Hier sollen jedoch nur Sensoren für die Bestimmung der Aktivität nach dem Prinzip von Brennstoffzellen erläutert werden (Matsunaga et al. 1979, Becker 1994). Seit 1988 werden in der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik am Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA e.V. Untersuchungen auf dem Gebiet der Biobrennstoffzelle als Aktivitätsmonitor durchgeführt (Sell 2001). Die Biobrennstoffzelle ist eine elektrochemische Zelle, mit der elektrische Energie aus physiologischen Redoxreaktionen von Mikroorganismen in wässrigen Medien gewonnen werden kann. Veränderungen im Aktivitätszustand von Mikroorganismen konnten durch Zusatz von Substraten und Stoffwechselgiften mit Hilfe der Biobrennstoffzelle nachgewiesen werden (Kreysa et al. 1990, Sell 1991). Die Bestimmung der Lebendzellzahl in Abwässern (Holtmann & Sell 2001) und in der Lebensmittelindustrie z.B. bei Aktivitätstests von Starterkulturen (Pescheck et al. 2002) sind mögliche Anwendungsgebiete derartiger Sensoren. Sie erfassen nur aktive Zellen, und die generierten Signale sind unabhängig von der Größe und Form der Mikroorganismen. Bei der Auswertung der Messung ist es unerheblich, ob das Signal von wenigen stark aktiven Zellen oder einer Vielzahl kleiner wenig aktiver Zellen herrührt. Durch diese Unabhängigkeit des Messsystems von der Größe der aktiven Mikroorganismen ist eine amperometrische Messung für das Aktivitätsmonitoring höherer Pilze geeignet. Um amperometrische Messungen direkt in der Submerskultur durchführen zu können, muss das System eine entsprechende Mindestleitfähigkeit aufweisen.

Durch seinen einfachen Aufbau, die leichte Handhabbarkeit und aufgrund seines Funktionsprinzips ist dieser Sensor unempfindlich gegen Störfaktoren. Mit der Brennstoffzelle als Aktivitätssensor kann ein durch Mikroorganismen indirekt verursachter Stromfluss amperometrisch erfasst werden. Für die Messung wird lediglich vorausgesetzt, dass das biologische System reduzierte, elektroaktive Substanzen generiert, die an der Arbeitselektrode elektrochemisch oxidiert werden können und somit den Stromfluss erzeugen. Während des Stoffwechsels von Mikroorganismen finden zahlreiche Reduktionen und Oxidationen oder Redoxreaktionsketten statt, die als exergones System an Elektronenträger geknüpft sind. Der Elektronenübergang vom biologischen System direkt zu einer Elektrode findet nur im geringen Maße statt (Higgins 1979). Solange noch reduzierbare Substrate im Kultivierungsmedium vorhanden sind, hält die Reduktion dieser Verbindungen an und der dabei fließende Strom kann als Maß für die Konzentration der Mikroorganismen dienen (Becker 1994). Da die Anwesenheit eines Redoxmediators in vielen Produkten nicht erwünscht ist, muss dieser nach der Kultivierung wieder abgetrennt werden.

Die Brennstoffzelle besteht neben der Anode (Graphit) und der Sauerstoffdiffusionskathode noch aus einer mikrobiologischen Kultur. Durch eine amperometrische Messung des Stromflusses werden aktive Mikroorganismen detektiert. Das Funktionsprinzip der biochemischen Brennstoffzelle ist in Abb. 2-6 dargestellt:

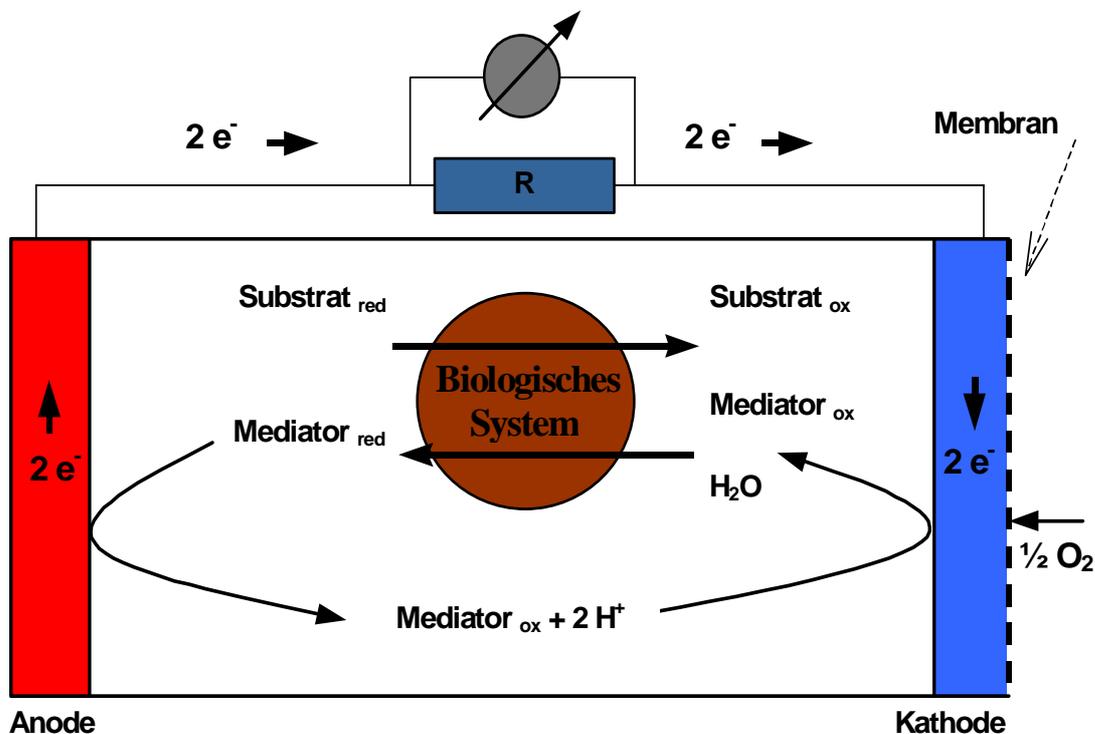


Abb. 2-6 Prinzip der biochemischen Brennstoffzelle, Darstellung nach Lämmel 1999

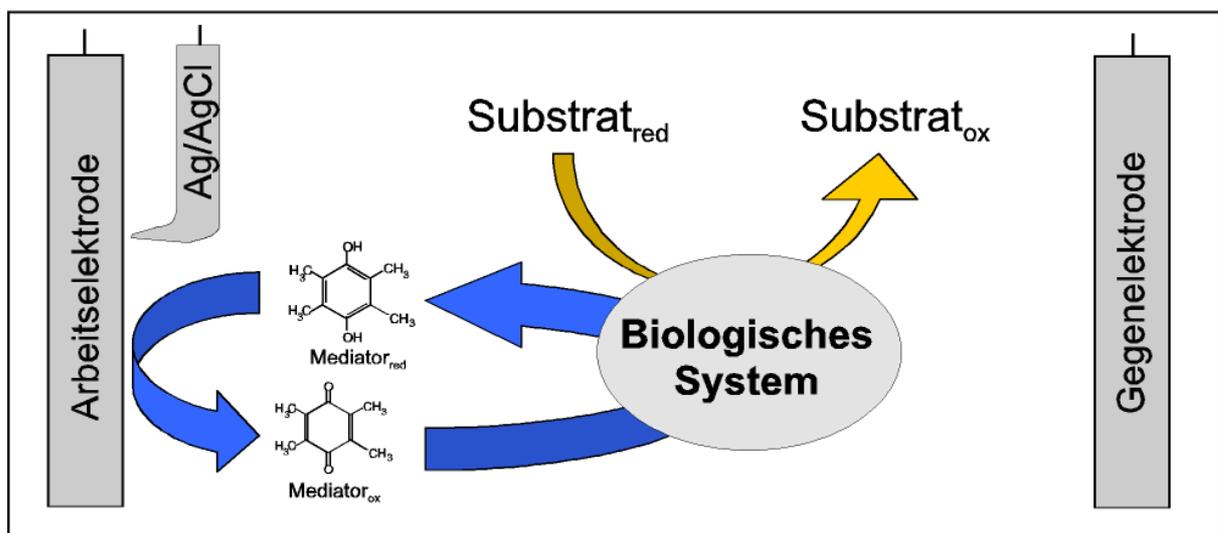
Basierend auf diesem Prinzip wurde ein Aktivitätssensor zum Monitoring der Aktivität von Klärschlammorganismen entwickelt (Holtmann & Sell 2002). Wird ein konstanter Widerstand eingeführt, kann das Signal als entsprechende Spannungsdifferenz registriert werden. In einer Laborkläranlage konnte mit Sprungsignalen in der Abwasserzusammensetzung eine proportionale Änderung des Signals des Bioaktivitätssensors zum Substratangebot festgestellt werden. Damit konnte die Toxizität von physiologisch wirksamen Substanzen auf Belebtschlamm gezeigt werden, so dass sich Möglichkeiten zur Verfahrensoptimierung von Kläranlagen ergeben. Dies ist im vorliegenden Fall von Terpenbiotransformationen ebenfalls notwendig, die Aktivität muss mit möglichst geringer zeitlicher Verzögerung und *in situ* überwacht werden, um möglichst schnell auf kritische Aktivitätszustände reagieren zu können. Die kurzfristige Verfügbarkeit der Messdaten ermöglicht einen schnellen Eingriff in den Prozessablauf. Dies stellt einen großen Vorteil der Aktivitätsbestimmung mit dem Sensor gegenüber herkömmlichen Methoden dar. In der vorliegenden Arbeit sollte die Übertragbarkeit

dieses bioelektrochemischen Aktivitätsmesssystems auf höhere Pilze überprüft werden, eine Regelung der Dosierung des toxischen Substrates für die fungalen Zellen sollte ermöglicht werden.

#### 2.2.3.4 Amperometrische Aktivitätsmessung mit Redoxmediatoren

Bei der amperometrischen Aktivitätsmessung kann ein Redoxmediator in oxidierter Form zugegeben werden, der den Elektronentransport von den Mikroorganismen zur Elektrode beschleunigt und das Stromsignal verstärkt. Dabei wird der Redoxmediator von den Mikroorganismen reduziert und an der Anode wieder oxidiert, er dient als Elektronentransmitter. Die exakten Vorgänge bei der mikrobiellen Redoxmediatorreduktion sind noch nicht vollständig geklärt.

Da die Redoxmediatoren als redoxaktive Substanzen ein definiertes Potential in der Spannungsreihe haben, können sie bei den bekannten Potentialen nachgewiesen werden. Das Redoxmediatorsignal kann als Summensignal aller reduktiven Verbindungen im Medium verstanden werden, die den Redoxmediator reduzieren. Das Prinzip der Redoxmediatormessung als Elektronentransmitter, das in Abb. 2-7 gezeigt ist, sollte überprüft werden.



**Abb. 2-7 Schematische Darstellung der potentiostatischen Messung über ein Dreielektrodensystem zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität**

Beginnend muss ein Potential bestimmt werden, bei dem die Reaktion freiwillig abläuft. Die Höhe des Diffusionsgrenzstromes ist um so größer, je kleiner die Diffusionsgrenzschicht ist, so dass die Empfindlichkeit des Systems durch starke Konvektion erhöht werden kann. Zur

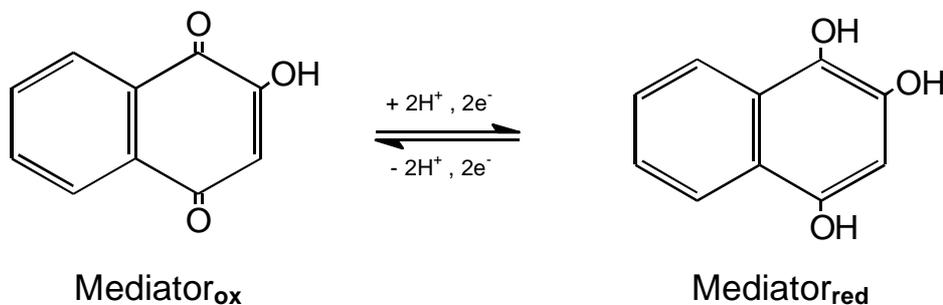
Konzentrationsbestimmung und Charakterisierung von elektrochemisch aktiven Substanzen wird ein Dreielektrodensystem (Abb. 2-3 und Abb. 2-7) verwendet.

Werden Redoxmediatoren als Elektronenüberträger eingesetzt, kommt der Wechselwirkung zwischen Organismus und Redoxmediator eine zentrale Bedeutung zu. Geeignete Redoxmediatoren sollten die in Tab. 2-2 angegebenen Eigenschaften aufweisen (verändert und ergänzt nach Bennetto et al. 1983).

**Tab. 2-2 Erforderliche Eigenschaften von redoxaktiven Substanzen zum Einsatz als Redoxmediator (verändert und ergänzt nach Bennetto et al. 1983)**

Wasserlöslichkeit
Reduzierbarkeit durch die Mikroorganismen
Reoxidierbarkeit an der Elektrodenoberfläche
Fähigkeit, Zellwand und Zellmembran in oxidiertes und reduziertem Form zu passieren
keine Toxizität gegenüber dem biologischen System
kein Ab- oder Umbau durch das biologische System

In Abb. 2-8 ist am Beispiel von 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon das Mediator-Redoxsystem beispielhaft erläutert:



**Abb. 2-8 Oxidation und Reduktion am Beispiel von 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon; ox: oxidierte Form (orange); red: reduzierte Form (farblos)**

Durch Aufnahme von zwei Protonen und zwei Elektronen dienen die Redoxmediatoren als Sauerstoffersatz in der Endoxidation des mikrobiellen Stoffwechsels. Die auf diese Weise reduzierten Redoxmediatormoleküle werden an der Arbeitselektrode quantitativ erfasst.

#### 2.2.4 Respirometrische Messungen

Die Aktivität von Mikroorganismen kann über Messungen des Sauerstoffverbrauchs bestimmt werden. Für biochemische Stoffwechselforgänge ist die Anwesenheit von Sauerstoff

unabdingbar, da er sich als Endglied in der Atmungskette zur Aufnahme der Elektronen bzw. Reduktionsäquivalente etabliert hat. Bei dieser Reaktion geht Sauerstoff durch Aufnahme von Elektronen und Protonen in Wasser über und wird verbraucht. Somit ist es möglich, aus der Menge des verbrauchten Sauerstoffs auf die Anzahl der vitalen Mikroorganismen und ihre Stoffwechselaktivität zu schließen. Die Sauerstofftransferate wird häufig genutzt, um den physiologischen Zustand einer Kultur zu bestimmen. Anderlei entwickelte einen *online*-Sensor für Schüttelkolbenkulturen, der den Sauerstoffverbrauch in der Gasphase ermittelt (Anderlei & Büchs 2000).

Die Messung der Sauerstoffzehrung zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität hat weite Verbreitung gefunden. Auf diesem Prinzip beruhen z.B. ein BSB-Sensor (Riedel et al. 1993), Toxizitätstests (Pagga 1985, Vogel & Binz 1997), Bestimmung der Sauerstofftransferate in Schüttelkolben (Anderlei & Büchs 2000) und weitere Messgeräte als Aktivitäts- und Toxizitätsmonitor. Bei der Hydroxylierung von Toluol durch *Pseudomonas putida* UV4 wurde die Substratdosierung von Toluol über die Sauerstoffzehrung kontrolliert (Carragher et al. 2001). Für Steuerungs- und Regelungsfunktionen ist der Einsatz von Respirometern bislang nur begrenzt eingesetzt worden (Köhne & Schuhen 1996).

Die Löslichkeit des Sauerstoffs beträgt in reinem Wasser bei 25°C 41,2 mgL<sup>-1</sup> (1,3 mM). In den meisten biotechnologischen Prozessen wird jedoch kein reiner Sauerstoff, sondern sterilfiltrierte Luft zur Belüftung der Kulturen eingesetzt. Bei einem Luftdruck von 1 bar und einem Sauerstoffpartialdruck von 0,212 bar ist folglich mit einer maximalen Konzentration von 8,7 mgL<sup>-1</sup> (0,28 mM) zu rechnen.

Der Sauerstoff dient bei den betrachteten Biotransformationen als Cosubstrat. Bei der Messung der Sauerstoffzehrung wird nicht nur der Sauerstoff, der den Mikroorganismen als Oxidationsmittel für den Energiestoffwechsel dient, erfasst. Es wird ein Gesamtparameter bestimmt, der biologische und chemische sauerstoffverbrauchende Prozesse (z.B. durch Substratumbau oder photooxidative Prozesse) erfasst. Bei der Messung der Sauerstoffzehrung kann nicht unterschieden werden, ob der Sauerstoff chemisch oder biologisch verbraucht wird. Insbesondere kann nicht zwischen der Sauerstoffzehrung durch Abbau von internen Speicherstoffen und der Sauerstoffzehrung durch Abbau von Substraten (z.B. Biotransformationen) im Medium unterschieden werden.

Die individuelle Sauerstoffaufnahme eines Mikroorganismus hängt von dessen Wachstumsphase ab, so dass es wichtig erscheint, den aktuellen physiologischen Zustand der Organismen und die aktuelle Wachstumsphase zu kennen. Dieses Messverfahren lässt sich nur bei aeroben Prozessen einsetzen, wie sie bei der Biotransformation mit fungalen

Mikroorganismen vorliegen. Weitere Probleme bei der Sauerstoffzehrungsmessung (vgl. Braha 2000) können auftreten, wenn Toxine nicht in die Endoxidation eingreifen oder wenn sich Inhaltsstoffe auf den Sauerstoffverbrauch auswirken. Die Sauerstoffversorgung hat einen großen Einfluss auf den Sekundärmetabolismus höherer Pilze (Barberel & Walker 2000). Die Cellulaseproduktion von *Chaetomium globosum* wird von der Sauerstoffversorgung beeinflusst (Umikalsom et al. 1998).

Für die Oxyfunktionalisierung der Substrate ist die Anwesenheit von Sauerstoff notwendig. Sauerstoff wird also als Cosubstrat und zur Aufrechterhaltung der Stoffwechselforgänge gebraucht. Der Sauerstoff für die Biotransformation wird messtechnisch miterfasst. Da die Biotransformation nur in sehr geringem Masse abläuft (Produktausbeute in Bereich  $\text{mgL}^{-1}$ ), ist der damit verbundene Sauerstoffverbrauch vernachlässigbar, da die Stoffwechselforgänge ein Vielfaches davon ausmachen. Respirometrische Messungen kommen theoretisch als Methode zum Aktivitätsmonitoring für terpenttransformierende Submerskulturen von höheren Pilzen in Betracht.

## 2.3 Sauerstoffsensoren

### 2.3.1 Nachweis- und Bestimmungsmethoden für Sauerstoff

Für Routinemessungen der Sauerstoffkonzentration in Gasen und Flüssigkeiten sind verschiedene Geräte entwickelt worden, die z.B. auf der elektrochemischen Sauerstoffmessung nach Tödt und auf dem sog. Clark-Effekt mit polarisierten Membranelektroden beruhen. Die Lambda-Sonde dient zur Messung des Sauerstoffgehaltes auf magnetochemischen oder galvanischem Weg in Verbrennungsgasen. Chemische Verfahren zur Abtrennung von Sauerstoff (alkalische Pyrogallollösung) und Nachweise auf kolorimetrischer Basis (saure  $\text{CrCl}_2$ -Lösung, Umsetzung von  $\text{TiCl}_3$  zu  $\text{TiCl}_4$ ) werden angewendet.

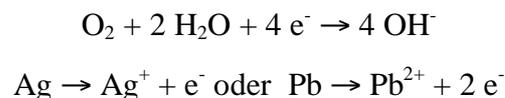
Bei Mikroorganismen, die einen langsamen Stoffwechsel besitzen, wie z.B. höhere Pilze, ist das Sauerstoffzehrungsvermögen sehr gering. In diesem Falle kommt der Nachdiffusion von Sauerstoff in das Kulturmedium eine größere Bedeutung zu. Der Eintrag von Sauerstoff über die Flüssigkeitsoberfläche trägt zu Verfälschungen der Messung bei, so dass die Submerskulturen mit einem sauerstoffundurchlässigen Material überschichtet werden müssen, um nur die aktive Kultur zu erfassen. Diese Methode, Kulturen mit sauerstoffundurchlässigen Materialien zu überschichten, fand bereits beim Viabilitätstest von Hefen mit faseroptischen Sauerstoffsensoren erfolgreich Anwendung (O`Riordan et al. 2000).

---

Da in dieser Arbeit nur Sensoren basierend auf dem Clark-Prinzip und faseroptische Sauerstoffsensoren verwendet wurden, sollen diese genauer erläutert werden.

### 2.3.1.1 Amperometrische Sauerstoffmessung (Clark-Elektrode)

Der von Leyland C. Clark 1956 entwickelte Detektor für Sauerstoff (Clark 1956) dient in der heutigen Bioprozesstechnik als Clark-Elektrode der Überwachung des Gehaltes an gelöstem Sauerstoff. Grundprinzip der elektrochemischen Bestimmung sind membranbedeckte elektrochemische Sensoren. Sie sind aus einer Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode aufgebaut, die von einer sauerstoffdurchlässigen Membran gegenüber der Kulturbrühe geschützt wird. Diese Membran verhindert ein Austreten des Elektrolyten, der für die amperometrische Messung zwischen den Elektroden notwendig ist. Zwischen der Arbeitselektrode (meistens eine Goldkathode) und der Gegenelektrode (Silber- oder Bleianode) wird eine Spannung angelegt, die Sauerstoff elektrochemisch reagieren lässt. Der Sauerstoff wird an der Kathode reduziert, und an der Anode werden Silberatome, bzw. Bleiatome oxidiert. Es laufen folgende Reaktionen ab (Abb. 2-9):



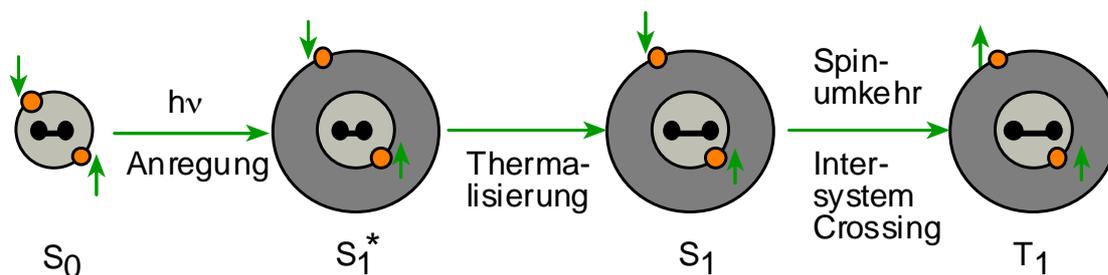
#### **Abb. 2-9 Chemische Reaktionen zur Detektion von molekularem Sauerstoff**

Die gebildeten Ionen werden durch Bestandteile der Elektrolytlösung gebunden, so dass eine Versilberung, bzw. Verbleiung der Goldkathode verhindert wird. Da der fließende Strom der Sauerstoffkonzentration proportional ist, wird aus der Messgröße Stromstärke die Konzentration an gelöstem Sauerstoff berechnet. Aufgrund der elektrochemischen Reaktion wird während der Messung Sauerstoff verbraucht (Eigenverbrauch der Elektrode), der jedoch für die meisten Anwendungen vernachlässigbar ist.

### 2.3.1.2 Optische Sauerstoffmessung (Fluoreszenzsensor)

Eine gute Zusammenstellung der Anwendungsgebiete faseroptischer Sensoren in der Umwelttechnik enthält z.B. das „Handbook of Optical Fibre Sensing Technology“ (Holst & Mizaikoff 2002). Faseroptische Sauerstoffsensoren werden in der Wasserbiologie eingesetzt (Klimant et al. 1995). Faseroptische Sauerstoffsensoren können in Mikrotiterplatten eingebaut werden (John et al. 2003), so dass Sauerstoffzehrungen bei Screeningversuchen im Mikromaßstab durchgeführt werden können. Messungen des biologischen Sauerstoffbedarfs wurden mit optischen Sauerstoffsensoren durchgeführt (Xiang-Ming et al. 1994).

Optische Sauerstoffsensoren zeigen keinen Eigenverbrauch an Sauerstoff und sind von der Anströmgeschwindigkeit unabhängig, so dass sie gegenüber den konventionellen Clark-Elektroden Vorteile aufweisen. Die optische Sauerstoffmessung beruht auf dem Phänomen der Lumineszenz. Unter Lumineszenz versteht man die Lichtemission im sichtbaren, UV- und IR-Spektralbereich von Gasen, Flüssigkeiten und Festkörpern nach Energiezufuhr. Dieses Phänomen beruht auf einem Übergang eines Elektrons aus einem energetisch höheren Zustand in einen unbesetzten, energetisch tiefer liegenden Zustand (Abb. 2-10).



**Abb. 2-10** Übergang eines Moleküls vom Grund- in den (angeregten) Singulett- und Triplettzustand (Darstellung nach Römpp)

Je nach Art der Energiezufuhr unterscheidet man zwischen Photo-, Elektro-, Chemo-, Thermo- und Radiolumineszenz. Im Falle der optischen Sauerstoffmessung werden die Elektronen durch optische Anregung in den angeregten Zustand gebracht. Die zur Lumineszenz befähigten Stoffe werden als Lumiphore oder Leuchtstoffe bezeichnet. Bei Quecksilber- und Natrium-Dampflampen erfolgt die Anregung der Gase überwiegend elektrisch in Gasentladungen.

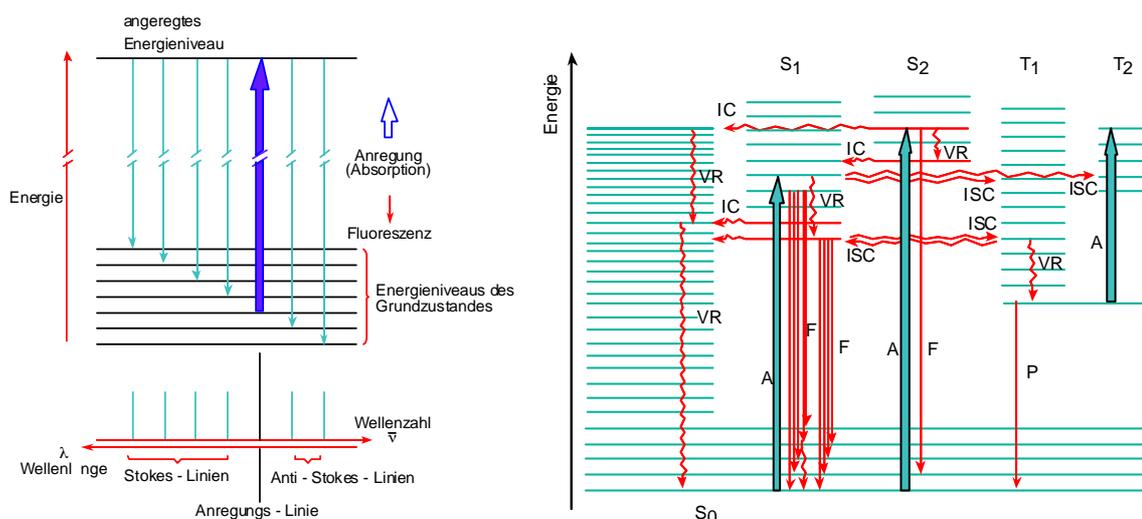
Anfang des 20. Jahrhunderts setzte eine stürmische Entwicklung bei der Erforschung und Herstellung von Leuchtstoffen ein, von denen heute mehrere Tonnen weltweit produziert werden. Lumiphore finden in Fernseh- und Computerbildschirmen (blau:  $ZnS:Ag$ ; grün:

ZnS:Cu; rot: Y<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Eu), Leuchtstofflampen und Leuchtstoff-Werberöhren Anwendung. Die Leuchtstoffe werden nach der gewünschten Emissionsfarbe ausgewählt.

Fluoreszenz ist eine Erscheinungsform der Lumineszenz, die dadurch gekennzeichnet ist, dass diese innerhalb von  $10^{-10}$  bis  $10^{-7}$  s nach der Anregung die absorbierte Energie in Form von Strahlung wieder abgegeben wird.

Unter Phosphoreszenz als weiterer Erscheinungsform der Lumineszenz versteht man Emissionsprozesse mit langen Abklingzeitkonstanten ( $> 10^{-3}$  s, langlebiger Triplettzustand, paralleler Spin der Elektronen) bzw. solche mit temperaturabhängigem, exponentiellem oder nichtexponentiellem Zeitverhalten. Die Unterscheidung zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz ist obsolet, heute wird meist nur noch von Lumineszenz gesprochen.

Die Stokes-Regel besagt, dass bei Lichtabsorption und -emission die abgestrahlte Fluoreszenz- und Phosphoreszenz-Strahlung stets längerwellig als die absorbierte Strahlung ist (Stokes-Linien). In einem Jablonski-Termschema werden Grund-, Singulett- und Triplettzustände der betreffenden Substanzen schematisch dargestellt (Abb. 2-11).



A	Absorption	VR	Vibrationsrelaxation
F	Fluoreszenz	IC	innere Umwandlung (internal conversion)
P	Phosphoreszenz	ISC	Interkombinationsübergänge (intersystem crossing)

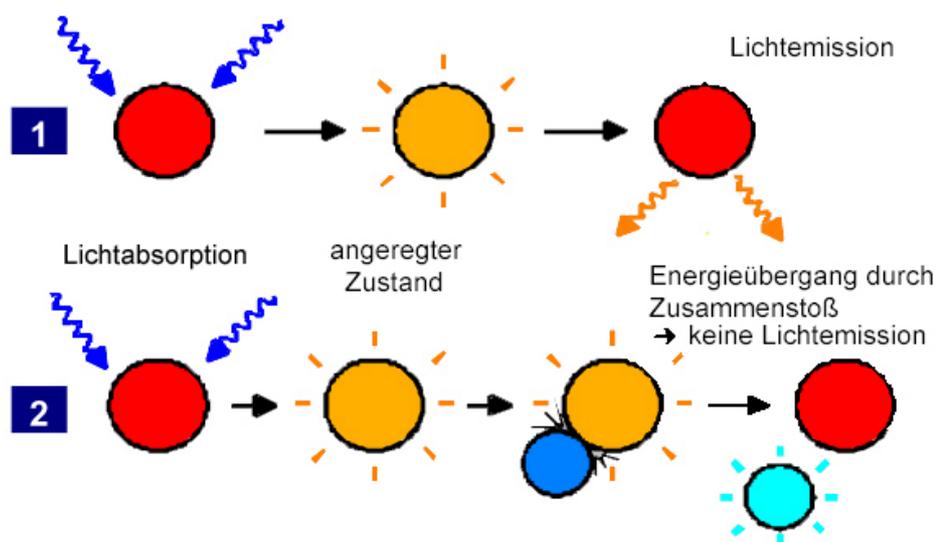
**Abb. 2-11 Entstehung der Stokes- bzw. Anti-Stokes-Linien (links) und vereinfachtes Jablonski Termschema (rechts, Darstellung nach Römpp)**

Aus Abb. 2-11 ist ersichtlich, dass die Stokes-Regel immer gilt, solange die Anregung aus dem energetisch am tiefsten liegenden Niveau erfolgt.

In optischen Sensoren kommt es zu einer Wechselwirkung des Analyten mit den Leuchtstoffen (Lumiphoren), so dass die optischen Eigenschaften verändert werden. Dies kann zu einer Änderung der Lumineszenzeigenschaften (Intensität, Abklingzeit oder Polarisation) führen. Bei

allen Veränderungen dient das Licht als Informationsträger, die Messsignale werden optisch ausgewertet. Ein faseroptisches Sensorsystem besteht aus einer Lichtquelle zum Anregen des Lumiphors, einem Glasfaserkabel zur Übertragung der Signale, einem Detektor und aus dem optischen Sensor, der aus immobilisierten Lumiphoren bekannter Zusammensetzung besteht. Indikatorfarbstoffe zum Nachweis von Sauerstoff sind beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Übergangsmetallkomplexe von Ru(II), Os(II) und Rh(II) oder phosphoreszierenden Porphyrinen mit Pt(II) oder Pd(II) als Zentralionen.

Das Prinzip der optischen Sauerstoffmessung beruht darauf, dass molekularer Sauerstoff in der Lage ist, Leuchtstoffe zu „quenchen“. Das Prinzip des „dynamic quenching“ (Abb. 2-12) beruht auf einer Energieübertragung durch Zusammenstoß. Stößt also ein angeregtes Lumiphormolekül mit Sauerstoff zusammen, wird es deaktiviert, d.h. es geht strahlungslos in seinen Grundzustand über.



**Abb. 2-12 Prinzip des „dynamic quenching“ der Lumineszenz bei molekularem Sauerstoff (Presens GmbH);**  
**1) Lumineszenz in Abwesenheit von Sauerstoff;**  
**2) Deaktivierung des Lumiphors durch molekularen Sauerstoff**

Der Sauerstoff, der die Energie des Lumiphors übernommen hat, wird aus seinem Grundzustand (Triplet) in den angeregten Zustand (Singulett) überführt. Kehrt er in seinen Grundzustand zurück, wird kein Lumineszenzlicht ausgesendet. Diese strahlungslose Energieübertragung führt dazu, dass das messbare Lumineszenzsignal abnimmt. Als

Emissionslicht kann also nur ein Bruchteil des eingesetzten Anregungslichtes detektiert werden.

Untersuchungen zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen dem Sauerstoffgehalt in der Probe und der Lumineszenzintensität bzw. Abklingzeitkonstante des Lumineszenzzustandes besteht. Dieser Zusammenhang beschreibt die Stern-Volmer-Gleichung (Gleichung 4):

$$1 + K_{SV} \cdot [O_2] = \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I} \Rightarrow I = f([O_2]) \quad \text{und} \quad \tau = f([O_2]) \quad (4)$$

I	Lumineszenzintensität in Gegenwart von Sauerstoff
I <sub>0</sub>	Lumineszenzintensität in Abwesenheit von Sauerstoff
τ	Lumineszenzabklingzeit in Gegenwart von Sauerstoff
τ <sub>0</sub>	Lumineszenzabklingzeit in Abwesenheit von Sauerstoff
K <sub>SV</sub>	Stern-Volmer-Konstante
[O <sub>2</sub> ]	Sauerstoffkonzentration

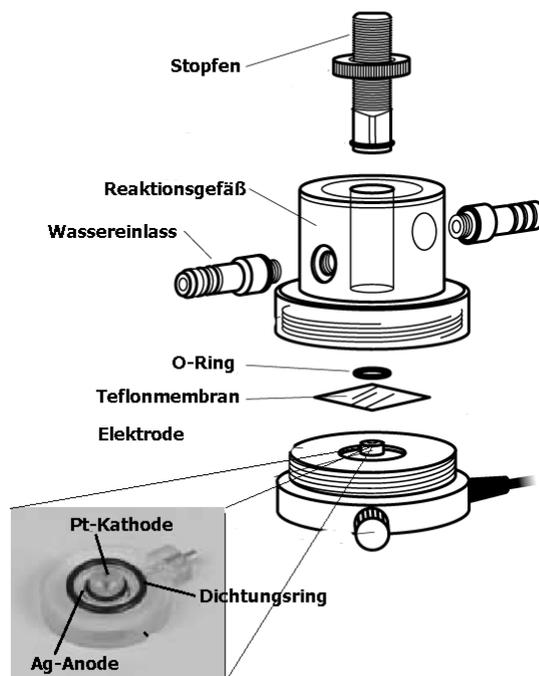
Die Vorteile von faseroptischen Sauerstoffsensoren sind die Unabhängigkeit des Signals von der Anströmgeschwindigkeit, kein Eigenverbrauch des Sensors, Empfindlichkeit bis in den ppt-Bereich und die Langzeitstabilität des Sensormaterials. Das Sensorsystem der Presens GmbH ist für *online*-Messungen von gelöstem Sauerstoff in Schüttelkolbenkulturen geeignet und wurde bereits bei der Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (Wittmann et al. 2003).

### 2.3.2 Verwendete Sauerstoffsensoren

Im folgenden Kapitel werden die Funktionsweisen und technische Ausführungen der Sauerstoffsensoren erläutert. Die detaillierten Angaben (Hard- und Software) zu den in dieser Arbeit verwendeten Sauerstoffmessgeräten sind im experimentellen Teil (5.3.1.2) angegeben.

#### 2.3.2.1 Sauerstoffmessgerät von Rank Brothers Ltd (Clark-Prinzip)

Das Sauerstoffmessgerät von Rank Brothers Ltd besteht aus zwei Elektroden: einer Platinelektrode von 2 mm Durchmesser als Arbeitselektrode und einer Silberelektrode (10fache Elektrodenfläche) als Referenz- und Gegenelektrode. Die Platinelektrode wird mit -0,6 V polarisiert. Zur Abtrennung von der Probenflüssigkeit dient eine 12,7 µm dicke Teflonmembran, darunter werden die Elektroden mit Kaliumchlorid (3 M) als Stromschlüssel verbunden (Abb. 2-13).



**Abb. 2-13** Schematischer Aufbau der Sauerstoffmesszelle von Rank Brothers Ltd

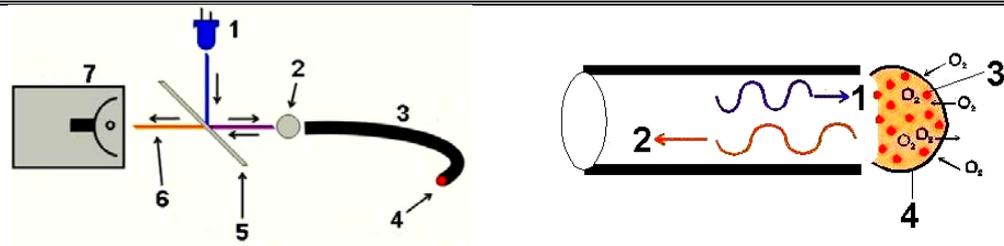
### 2.3.2.2 Sauerstoffelektrode von Ingold (Clark-Prinzip)

Die Messung der Sauerstoffkonzentration geschieht nach dem Clark-Prinzip, wobei alle erforderlichen Elektroden in einer Einstabmesskette vereinigt sind.

Die sauerstoffdurchlässige Membran, die die Elektroden vor dem Kultivierungsmedium schützen und den Austritt von Elektrolytlösung verhindern soll, besteht aus Silikon. Im Handel waren keine Teflonmembranen erhältlich, die Mettler-Toledo GmbH stellte ihre Produktion von Teflonmembranen wegen zu geringer Nachfrage ein.

### 2.3.2.3 Sauerstoffsensoren der Comte GmbH (faseroptisch)

Bei dem mikrocontroller gesteuerten optischen portablen Sauerstoffsensoren (MOPS) der Comte GmbH ist der optisch aktive Farbstoff (Lumiphor) direkt auf die Spitze des Glasfaserkabels aufgebracht und mit schwarzem Silikon optisch gegen Streulicht von außen isoliert. Je dicker diese Isolationsschicht ist, desto länger ist die Ansprechzeit des Sensors, da die Sauerstoffmoleküle über eine weitere Strecke diffundieren müssen, bevor sie mit dem optischen Indikator wechselwirken können.



- |   |                           |
|---|---------------------------|
| 1 | blaue LED                 |
| 2 | Linse                     |
| 3 | Glasfaser                 |
| 4 | Optode                    |
| 5 | halbdurchlässiger Spiegel |
| 6 | Fluoreszenzlicht          |
| 7 | Detektoreinheit           |

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 1 | 470 nm Anregungslicht                |
| 2 | 590 nm Emissionslicht                |
| 3 | in Silikon immobilisierter Farbstoff |
| 4 | schwarzer Silikonüberzug             |

**Abb. 2-14 MOPS der Comte GmbH; Bestandteile eines faseroptischen Sensors (links) und direkt auf dem Glasfaserleiter immobilisierte Lumiphore (rechts)**

In Abb. 2-14 links ist der schematische Aufbau der optischen Einheit dargestellt. Das Glasfaserkabel dient zur Leitung des Anregungs- und des Emissionslichtes. Durch den halbdurchlässigen Spiegel wird das Anregungslicht aus der Diode (1) reflektiert, und das Emissionslicht gelangt (ohne Reflexion) in die Detektoreinheit. Im rechten Abschnitt ist die Spitze des Sensors mit dem in Silikon immobilisierten sauerstoffsensitiven Indikator gezeigt. Das Anregungslicht (470 nm) für diesen Indikator, und das Emissionslicht (590 nm) werden gleichzeitig entgegengesetzt über das Glasfaserkabel übertragen.

#### 2.3.2.4 Sauerstoffsensitive Folien der Presens GmbH (faseroptisch)

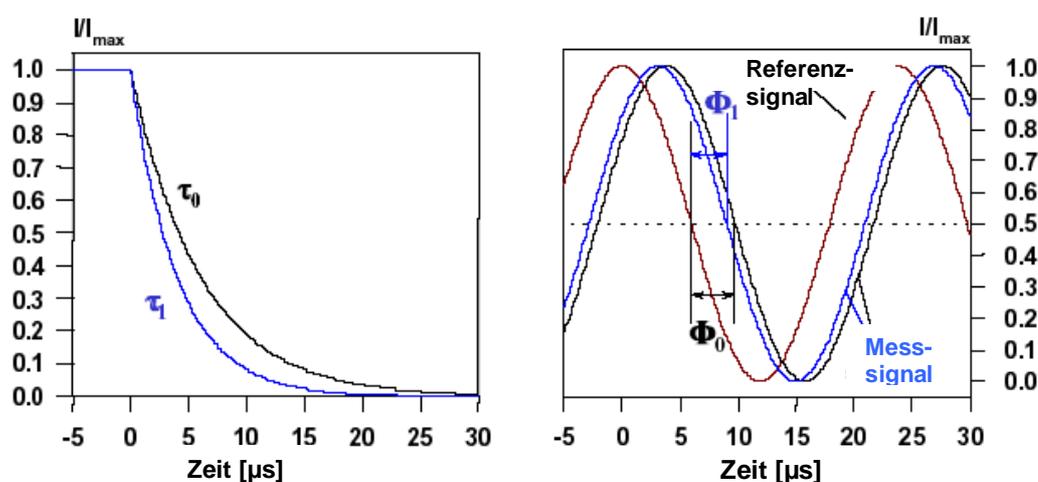
Das Messprinzip des Fibox 2-Systems mit sauerstoffsensitiven Folien der Presens GmbH beruht ebenfalls auf einer faseroptischen Messung. Im Unterschied zum MOPS der Comte GmbH sind die Lumiphore auf einem Glasplättchen oder einer Folie in einer Silikonmatrix immobilisiert, die mit verschiedenen Schutzbezügen beschichtet werden kann. Die Auslesung der Messsignale erfolgt ebenfalls über ein Glasfaserkabel, welches nicht direkt mit der Lumiphorschicht verbunden ist (vgl. Abb. 5-4).

Diese Anordnung hat mehrere Vorteile: Die sauerstoffsensitiven Folien (auf einem Glasplättchen als Trägermaterial) können ca. 100mal autoklaviert werden und die Auslesung der Signale kann extern durch die Glaswand bzw. die Bioreaktorwand erfolgen. Dies setzt jedoch die Lichtdurchlässigkeit der Reaktorwand voraus. Das Fibox 2-Gerät bestimmt die Lumineszenzabklingzeit eines immobilisierten Lumiphors als sauerstoffabhängigen Parameter. Die Abklingzeit ist eine Funktion des Sauerstoffgehaltes. Wenn der Leuchtstoff mit sinusförmig moduliertem Licht angeregt wird, resultiert eine Zeitverschiebung des

Emissionssignals aufgrund der Abklingzeit des Übergangszustandes. Diese Verschiebung kann als Phasenwinkel zwischen dem anregenden und dem emittierten Licht gemessen werden. In der folgenden Gleichung ist der Zusammenhang zwischen der Abklingzeit  $\tau$  und dem Phasenwinkel  $\Phi$  mathematisch (Gleichung 5) und graphisch (Abb. 2-15) dargestellt.

$$\tau = f([O_2]) \Rightarrow \tau = \frac{\tan \Phi}{2\pi \cdot f_{\text{mod}}} \Rightarrow \tan \Phi = 2\pi \cdot f_{\text{mod}} \cdot \tau \Rightarrow \Phi = f([O_2]) \quad (5)$$

$\tau$  Lumineszenzabklingzeit  
 $\Phi$  Phasenwinkel  
 $f_{\text{mod}}$  Modulierte Frequenz



**Abb. 2-15 Schematische Darstellung (Presens GmbH) der exponentiellen Abnahme (links) und verzögerte Emission der Phase (rechts)**

Die Emission des Lumineszenzlichtes erfolgt zeitverzögert, bei Anregung mit sinusförmig modulierte Licht kommt es folglich zu einer Verschiebung des Phasenwinkels. Die Verzögerung wird durch die Abklingzeitkonstante des angeregten Zustandes verursacht und kann über die Verschiebung des Phasenwinkels detektiert werden.

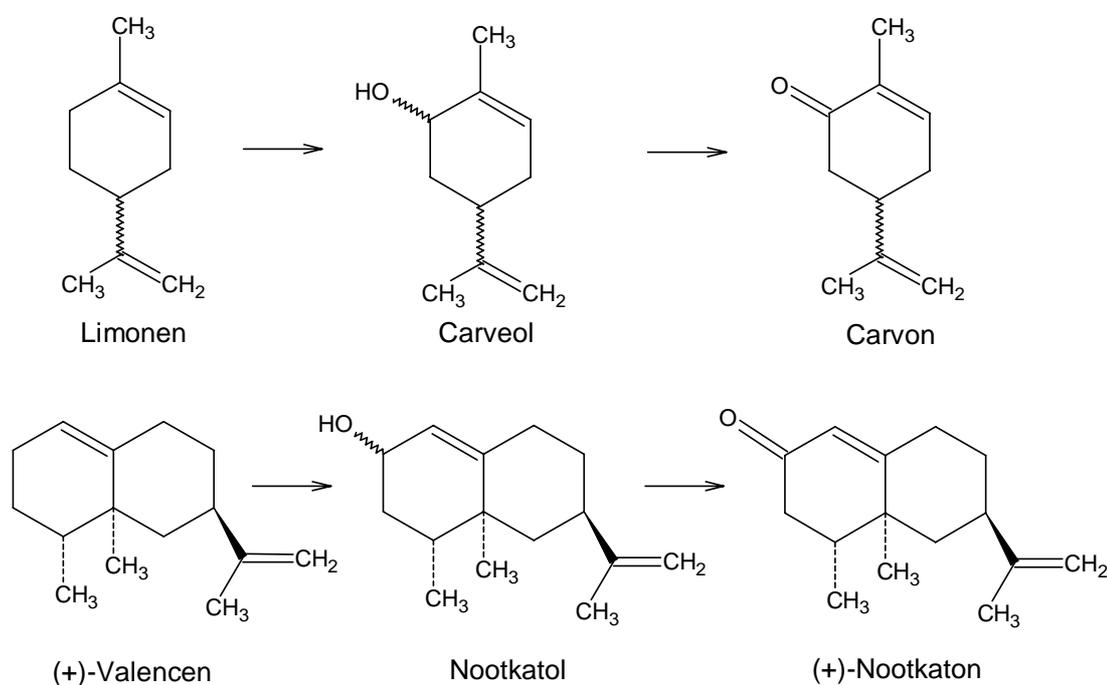
Gegenüber der konventionellen Intensitätsmessung hat die Messung der Abklingzeit mehrere Vorteile (Trettnak et al. 1998, Costa-Fernández et al. 2000). Zum einen wirken sich Unterschiede in der Intensität der Lichtquelle, Abweichungen der Intensität durch verschiedene Krümmungen des Lichtleiters und zufällige Intensitätsschwankungen nicht auf die Abklingzeit aus. Die Messung der Abklingzeitkonstante ist größtenteils unabhängig von der Konzentration des Lumiphors in der immobilisierten Schicht, so dass geringfügige Elutionen vernachlässigbar sind und eventuelles Photobleichen des Leuchtstoffs bei längeren Messzeiten weniger starke Auswirkungen hat als bei der Intensitätsmessung.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Untersuchte Biotransformationen

#### 3.1.1 Allgemeines zu den untersuchten Biotransformationen

Die Entwicklung eines Aktivitätssensors für höhere Pilze bei der Terpenbiotransformation wurde anhand zweier Modellsysteme durchgeführt. Die Biotransformationen von (+)-Limonen zu Carvon durch *Pleurotus sapidus* und von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch *Chaetomium globosum* wurden beispielhaft untersucht (Abb. 3-1).



**Abb. 3-1** Untersuchte Biotransformationen von Limonen und (+)-Valencen

Für die in der vorliegenden Arbeit betrachtete Biotransformation von (+)-Limonen durch *Pleurotus sapidus* (Abb. 3-1 bzw. Abb. 2-2) wurden bereits in der Literatur (Onken 1998) beschriebene Bedingungen und Dosierungen übernommen.

Die Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch *Chaetomium globosum* wurde während der Projektlaufzeit im Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover bearbeitet. Eine Optimierung der Ausbeute sollte durch eine aktivitätskontrollierte Dosierung erreicht werden. Die Zugaben an Terpenkohlenwasserstoffen sind in Konzentrationserhöhungen angegeben (Definition s. 5.4.2).

### **3.1.2 Biotransformation von (+)-Limonen zu Carvon (*Pleurotus sapidus*)**

Bei der Biotransformation von (+)-Limonen handelt es sich um zum Teil bekannte Reaktionen, die in der Literatur beschrieben sind (Duetz et al. 2003). Speziell die Biotransformation von (+)-Limonen zu Carvon (Onken & Berger 1999) ist gut untersucht, so dass auf diesbezügliche Transformationsversuche im Schüttelkolbenmaßstab verzichtet wurde. Diese Biotransformationen wurden direkt im Bioreaktor durchgeführt. Im Bioreaktor konnten bis ca.  $5 \text{ mgL}^{-1}$  Carvon (nach 238 h, Gehalt an Biotrockenmasse ca.  $4,5 \text{ gL}^{-1}$ ) nachgewiesen werden (3.5.3.2).

### **3.1.3 Biotransformation (+)-Valencen zu Nootkaton (*Chaetomium globosum*)**

Die Transformationsleistung von *Chaetomium globosum*, (+)-Valencen in (+)-Nootkaton umzusetzen, wurde kürzlich im Rahmen eines Stamm-Screenings im Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover optimiert. Diese Biotransformation sollte mit einem Aktivitätssensor überwacht und im größeren Maßstab (2 L-Bioreaktor) durchgeführt und optimiert werden.

Dazu wurde eine Submerskultur von *Chaetomium globosum* (100 mL) täglich mit (+)-Valencen (4 mM, s. 5.4.2) versetzt. Vor jeder Zugabe wurden die Produktkonzentrationen mittels GCMS bestimmt. Bei dieser Transformation konnten maximal ca.  $1,2 \text{ mgL}^{-1}$  Nootkaton im Medium nachgewiesen werden (nach 72 h bei einer Biotrockenmasse von ca.  $4 \text{ gL}^{-1}$ ). Ob die Transformationsleistung bei längeren Transformationszeiten konstant gehalten bzw. erhöht werden kann, sollte überprüft werden. Eine weitere Submerskultur von *Chaetomium globosum* wurde mit (+)-Valencen wie in Tab. 3-1 beschrieben versetzt und die Gehalte an Nootkaton im Medium bestimmt.

**Tab. 3-1 Dosierung von (+)-Valencen zu einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* und die Gehalte an Nootkaton im Medium**

<b>Zeit</b>	<b>Konzentrationserhöhung an (+)-Valencen</b>	<b>Nootkatongehalt im Medium</b>
<b>h</b>	<b>mM</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>
0	4	0
24	4	0
48	4	1,23
72	4	2,68
168	4	n.b.
192	4	0,94
216	4	1,00
240	4	1,51
264	4	1,06
288	4	1,00
312	0	1,48

Nach 72 h Transformationsdauer konnten 2,68 mgL<sup>-1</sup> Nootkaton nachgewiesen werden. Der Nootkatongehalt nahm nach 192 h wieder auf ca. 1 mgL<sup>-1</sup> ab. Bei längeren Transformationszeiten konnten keine wesentlich höheren Gehalte gemessen werden, so dass versucht wurde, die Ausbeute an Nootkaton durch eine Konzentration des Myzels zu steigern. Dazu wurden zwei 72 h alte 400 mL-Kulturen von *Chaetomium globosum* durch Dekantieren des Mediums auf 100 mL Gesamtvolumen konzentriert (im Folgenden Myzelkonzentrat genannt) und in einem 300 mL-Kolben mit (+)-Valencen (40 mM) versetzt. Dieses Myzelkonzentrat wurde bei 200 rpm kultiviert, um eine gute Durchmischung der hochviskosen Kultur zu gewährleisten. Die höhere Konzentration an (+)-Valencen wurde aufgrund der höheren Biotrockenmasse (ca. 10 gL<sup>-1</sup>) im Myzelkonzentrat gewählt.

Bis ca. 100 h Transformationsdauer konnte bei den Filtratextrakten ein maximaler Gehalt von 4 mgL<sup>-1</sup> Nootkaton bestimmt werden. Nach 192 h wurde als maximale Produktkonzentration der gesamten Transformationsleistung ca. 13 mgL<sup>-1</sup> bestimmt. Weitere Biotransformationsversuche von Valencen finden sich bei den Kultivierungen im Bioreaktor (3.5.4.2) und bei den *in situ*-Aktivitätsmessungen in der Spinnerflask (3.4.3).

## 3.2 Aktivitätsmessung mit Amperometrie

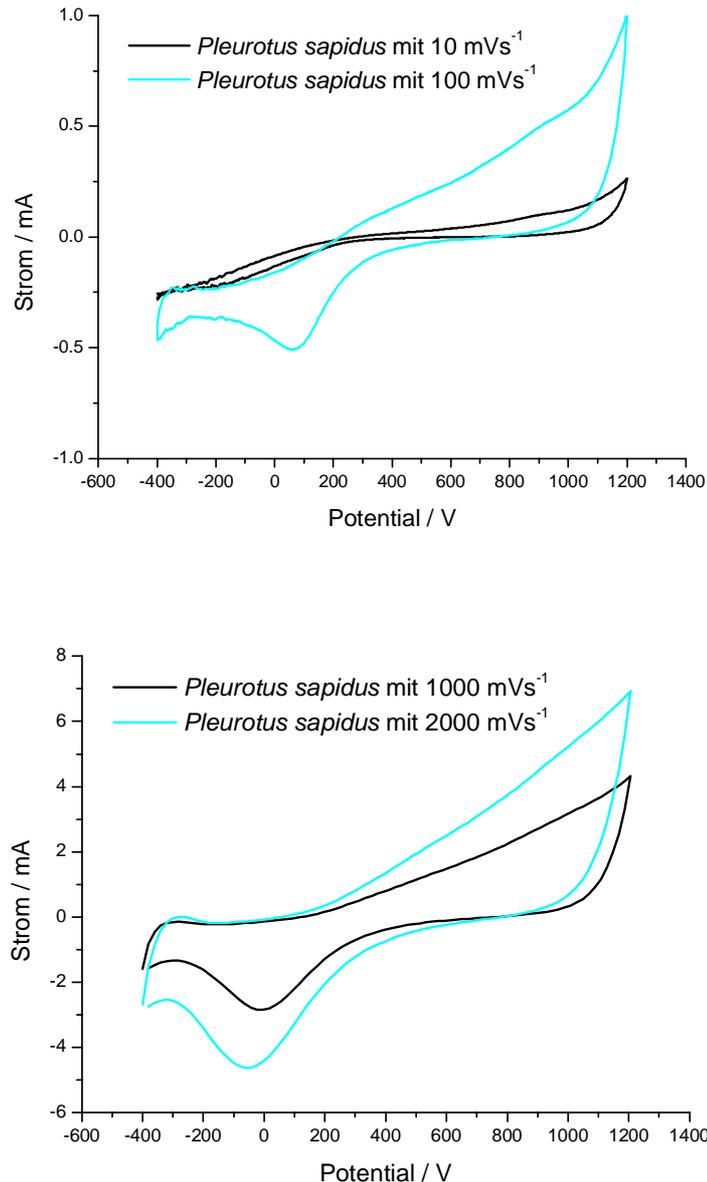
### 3.2.1 Cyclovoltammetrische Untersuchungen von Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* und Medium

Das grundlegende Prinzip der elektrochemischen Messung ist in 2.2.3 ausführlich erläutert. Die Versuche wurden nur mit Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* durchgeführt.

Eine Voraussetzung zur Durchführung elektrochemischer Messungen ist eine ausreichende Leitfähigkeit des Mediums. Es wurde die Leitfähigkeit von Medium, Puffer und einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* bei Zimmertemperatur gemessen. Das Medium zeigte mit einer Leitfähigkeit von etwa  $2,6 \text{ mScm}^{-1}$  eine generelle Eignung für elektrochemische Messungen. Eine Submerskultur von *Pleurotus sapidus* zeigte eine Leitfähigkeit von  $4,5 \text{ mScm}^{-1}$ . Die Leitfähigkeit des Mediums und die der Submerskulturen reichte generell aus, um cyclovoltammetrische Messungen durchzuführen.

Um die Notwendigkeit eines signalverstärkenden Redoxmediators (siehe 2.2.3.4) zu überprüfen, wurden zunächst Cyclovoltammogramme ohne Redoxmediatorzusatz erstellt. Unterschiede im Cyclovoltammogramm von Medium verglichen mit in Medium kultiviertem *Pleurotus sapidus* sollten analysiert werden. Durch Aufnahme von Cyclovoltammogrammen wurde untersucht, ob *Pleurotus sapidus* in Submerskultur reduzierte Verbindungen (mit einem entsprechenden Standardpotential) und in einer ausreichenden Menge bildet, so dass diese direkt mit einem Drei-Elektrodensystem detektiert werden können. Der Einfluss von (+)-Limonen auf die Messsignale sollte jeweils in Medium und in einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* untersucht werden.

Dazu wurden zwei 48 h alte 100 mL-Kulturen von *Pleurotus sapidus* mit Medium auf 200 mL aufgefüllt. Eine Kultur wurde mit (+)-Limonen (6 mM) versetzt, bevor beide Kolben weitere 24 h kultiviert wurden. Als Blindprobe hierzu wurde zum einen Medium und zum anderen Medium mit (+)-Limonen (6 mM) angesetzt. Zur Messung wurden von den vier Ansätzen jeweils 100 mL Submerskultur mit Puffer auf 200 mL aufgefüllt und von  $-0,4$  bis  $1,2 \text{ V}$  jeweils mit einer Scangeschwindigkeit von  $10$ ,  $100$ ,  $1000$  und  $2000 \text{ mVs}^{-1}$  cyclovoltammetrisch vermessen. In Abb. 3-2 sind exemplarisch die Cyclovoltammogramme einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* dargestellt.

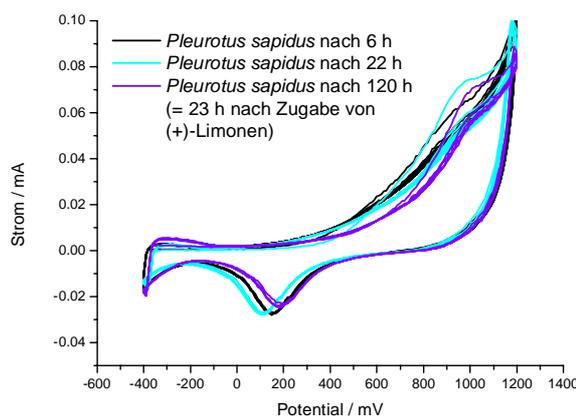


**Abb. 3-2**      **Cyclovoltammogramme einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* mit Scangeschwindigkeiten von 10 und 100 mVs<sup>-1</sup> (oben) und 1000 und 2000 mVs<sup>-1</sup> (unten)**

Es zeigten sich keine signifikanten Signale bei unterschiedlichen Scangeschwindigkeiten. Auch bei purem Medium und bei den jeweiligen Ansätzen mit (+)-Limonen konnten keine signifikanten Unterschiede in den Cyclovoltammogrammen festgestellt werden. Die Cyclovoltammogramme aller vier Ansätze verliefen ähnlich wie die in Abb. 3-2 dargestellten. Auch bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten zeigten sich keine reduzierten oder oxidierten Metabolite, die für eine Aktivitätsbestimmung herangezogen werden konnten. Bei dem untersuchten Organismus *Pleurotus sapidus* war eine direkte Messung der Stoffwechselaktivität daher nicht möglich. Als Scangeschwindigkeit für die Aufnahme der

folgenden Cyclovoltammogramme wurde  $10 \text{ mVs}^{-1}$  gewählt, um den Diffusionsgrenzstrombereich (für die spätere Quantifizierung der Metabolite) gut zu erkennen. Auch bei weiteren Ansätzen aus anderen Kultivierungsphasen ließen sich keine Unterschiede bei gleicher Scangeschwindigkeit erkennen. Hier stellte sich die Frage, ob sich die Konzentration an reduzierenden Substanzen während einer Kultivierung von *Pleurotus sapidus* verändert, da sich der Stoffwechsel und die Aktivität während der Kultivierung verändert. Um Unterschiede in den Cyclovoltammogrammen von verschiedenen Wachstumsphasen von *Pleurotus sapidus* festzustellen, wurden Cyclovoltammogramme einer wachsenden Kultur von *Pleurotus sapidus* nach Versetzen mit frischem Medium aufgenommen. Unter sterilen Bedingungen wurde von einer 216 h alten 100 mL-Vorkultur von *Pleurotus sapidus* das Medium abdekantiert, die Pellets in einen Minireaktor überführt und mit Medium auf 200 mL aufgefüllt (experimentelle Kultur, siehe 5.4.1). Im Minireaktor wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Cyclovoltammogramme aufgenommen.

Da die Aktivitätsmessung in Gegenwart von Terpenkohlenwasserstoffen (hier (+)-Limonen) stattfinden sollte, wurde untersucht, ob unter Transformationsbedingungen (also in Anwesenheit von (+)-Limonen) Metabolite gebildet werden, die sich als Aktivitätsindikator verwenden lassen würden. Da sich die Cyclovoltammogramme nach 97 h trotz Zunahme der Biomasse nicht signifikant veränderten, wurde nach 97 h die Konzentration an (+)-Limonen um 30 mM erhöht. Auch 23 h nach (+)-Limonenzugabe (120 h Gesamtkultivierungsdauer) traten keine signifikanten Unterschiede auf. In Abb. 3-3 sind beispielhaft die Cyclovoltammogramme von 6, 22 und 120 h dargestellt.



**Abb. 3-3** Cyclovoltammogramme ( $10 \text{ mVs}^{-1}$ ) einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* (ohne Redoxmediatorzusatz) während der Kultivierung im Minireaktor nach 6, 22 und 120 h (23 h nach Zugabe von (+)-Limonen)

Bei den Experimenten zu unterschiedlichen Kultivierungszeiten mit einer konkreten Kultur von *Pleurotus sapidus* zeigte sich, dass keine Metabolite gebildet wurden, die quantifiziert werden könnten. Bei dem hier behandelten Mikroorganismus *Pleurotus sapidus* zeigte sich, dass in Abwesenheit von Redoxmediatoren keine signifikanten Unterschiede in den Cyclovoltammogrammen gemessen werden konnten. Während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* unter Luftzufuhr wurde beobachtet, dass sich das Ruhepotential der Kulturbrühe (jeweils nach 10 min Stickstoffbegasung gemessen) mit steigender Kultivierungsdauer veränderte (Tab. 3-2).

**Tab. 3-2** Verlauf des Ruhepotentials während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* im Minireaktor, jeweils nach 10 min Stickstoffbegasung gemessen

<b>Zeit</b>	<b>Ruhepotential</b>
<b>h</b>	<b>mV vs Ag/AgCl</b>
2	89
4	11
6	-57
9	-79
23	-30
27	-340
94	-391

Es konnte beobachtet werden, dass sich das Ruhepotential während einer Kultivierung von *Pleurotus sapidus* in Abwesenheit von Redoxmediatoren zu negativen Potentialen hin veränderte. Dies war ein Zeichen dafür, dass Veränderungen in der Submerskultur stattgefunden haben. Die Änderung des Ruhepotentials wird von allen anwesenden redoxaktiven Stoffen beeinflusst, zu einer quantitativen Auswertung müssten sich bestimmte Stoffe durch Oxidation oder Reduktion in den Cyclovoltammogrammen der Kultur zeigen. Auch während einer Kultivierung von *Pleurotus sapidus* konnten keine signifikanten Unterschiede in den Cyclovoltammogrammen, die eine Aussage über die Aktivität der Submerskultur zulassen würden, gefunden werden.

Zwischenzusammenfassung 3.2.1:

- Die Leitfähigkeit von Medium und Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* reichte aus, um elektrochemische Messungen durchzuführen.
- Das Medium und eine Submerskultur von *Pleurotus sapidus* lieferten gleichartige Cyclovoltammogramme, bei verschiedenen Scangeschwindigkeiten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Cyclovoltammogrammen.
- Eine Zugabe von (+)-Limonen veränderte die Cyclovoltammogramme nicht.
- Auch während einer Kultivierung von *Pleurotus sapidus* zeigten sich zu verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede in den Cyclovoltammogrammen.
- Während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* sank das Ruhepotential stetig ab.
- Unter den gegebenen Versuchsbedingungen war keine direkte elektrochemische Messung der Aktivität von *Pleurotus sapidus* möglich.

### 3.2.2 Einsatz von Redoxmediatoren in Submerskulturen von *Pleurotus sapidus*

#### 3.2.2.1 Redoxmediatorscreening in Submerskulturen von *Pleurotus sapidus*

Das Prinzip der Aktivitätsmessung in Anwesenheit von Redoxmediatoren ist ausführlich in 2.2.3.4 erläutert. Da die Cyclovoltammogramme sich in verschiedenen Kultivierungsstadien nicht signifikant unterschieden, wurden die Auswirkungen von Redoxmediatoren auf die Cyclovoltammogramme der Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* untersucht. Dazu wurden mehrere lipophile und hydrophile redoxaktive Substanzen (siehe Tab. 5-4 in 5.5.2) ausgewählt und überprüft, ob diese als Elektronentransmitter zwischen dem aktiven Organismus und der Elektrode dienen können.

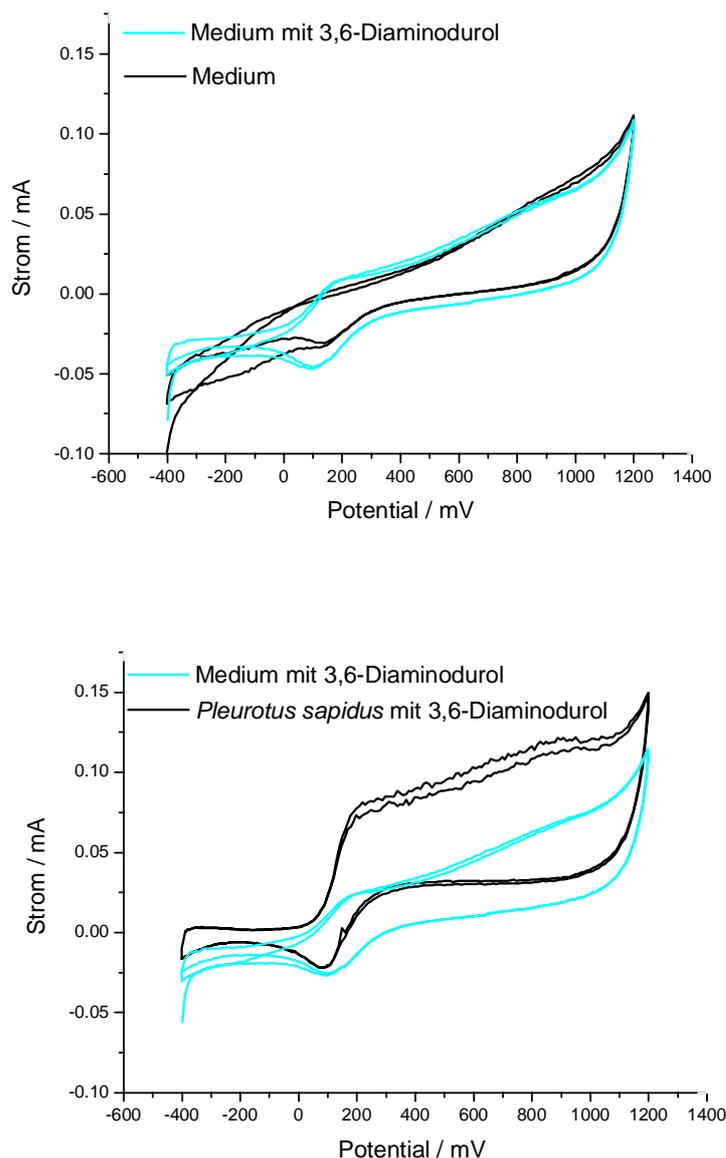
Da zum einen die Wasserlöslichkeit zum Transport in der wässrigen Phase zum anderen aber die Lipophilie zum Eindringen in die Organismen notwendig war, wurden Redoxmediatoren (vgl. Tab. 5-4) in das Screening aufgenommen, die das gesamte Löslichkeits-Spektrum abdeckten. Für das Screening wurden 14 jeweils 96 h alte 100 mL-Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* je mit Puffer auf 200 mL aufgefüllt und in Gegenwart von jeweils einem Redoxmediator vermessen (5.5.2). Es zeigte sich, dass einige lipophile Redoxmediatoren sich nicht ausreichend in der wässrigen Phase lösten, während andere bei Anwesenheit von *Pleurotus sapidus* größtenteils vom Myzel absorbiert wurden.

Aus den Cyclovoltammogrammen, die während des Redoxmediator-Screenings aufgenommen wurden, konnten Hinweise auf den Einsatz von Redoxmediatoren zur Aktivitätsbestimmung höherer Pilze gewonnen werden. Es konnte beobachtet werden, dass die Redoxmediatoren unabhängig von ihrer Lipophilie teilweise reduziert wurden. So zeigte z.B. Kaliumhexacyanoferrat III als hydrophiler Mediator keinerlei Veränderungen im Cyclovoltammogramm, dagegen konnte bei N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid eine Veränderung des Cyclovoltammogramms registriert werden.

Bei den eher lipophilen Redoxmediatoren konnten vergleichbare Ergebnisse gewonnen werden. Während 5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinon keinerlei Veränderungen am Cyclovoltammogramm einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* bewirkte, war bei 3,6-Diamino-durol ein deutlicher Oxidationsstrom nachzuweisen.

Die Redoxmediatoren, bei deren Zugabe sich signifikante Änderungen in den Cyclovoltammogrammen einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* zeigten, wurden anschließend mit Medium auf die gleiche Weise vermessen. Diese Versuche dienten dazu, die Abhängigkeit der Cyclovoltammogramme vom eingesetzten Mediator ohne die Anwesenheit

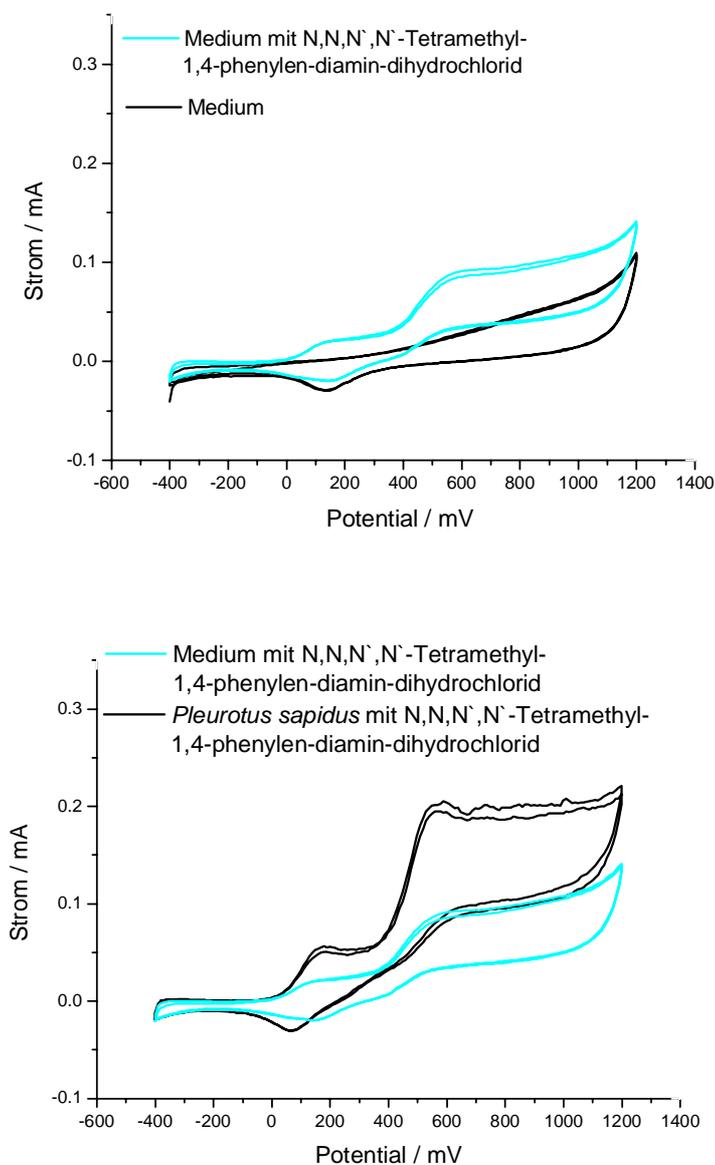
eines Organismus zu ermitteln. Dabei war zu erkennen, wie der Mediator alleine (ohne *Pleurotus sapidus*) die Cyclovoltammogramme beeinflusste. Bei den Redoxmediatoren 3,6-Diamino-durol (Abb. 3-4) und N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid (Abb. 3-5) zeigten sich die deutlichsten Veränderungen der Cyclovoltammogramme nach Zugabe des Redoxmediators.



**Abb. 3-4** Cyclovoltammogramme ( $10 \text{ mVs}^{-1}$ ) von Medium mit und ohne 3,6-Diamino-durol (oben) und Medium mit 3,6-Diamino-durol (1 mM) mit und ohne *Pleurotus sapidus* (unten)

Bei Medium zeigten die Cyclovoltammogramme mit und ohne 3,6-Diamino-durol nur sehr geringe Unterschiede, bei Anwesenheit von *Pleurotus sapidus* und 3,6-Diamino-durol waren

jedoch deutliche Unterschiede im Vergleich zu Medium mit 3,6-Diamino-durol und einer Kultur von *Pleurotus sapidus* mit 3,6-Diamino-durol zu beobachten.



**Abb. 3-5** Cyclovoltammogramme ( $10 \text{ mVs}^{-1}$ ) von Medium mit und ohne N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid (oben) und Medium mit N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid (1 mM) mit und ohne *Pleurotus sapidus* (unten)

Im Falle von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid konnten deutliche Unterschiede im Cyclovoltammogramm mit Medium im Vergleich zu dem mit purem Medium festgestellt werden. Das Cyclovoltammogramm einer Kultur von *Pleurotus sapidus* mit N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid zeigte jedoch noch höhere

Ströme als das Cyclovoltammogramm von Medium mit N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid. Aus der Menge der untersuchten redoxaktiven Substanzen wurden die in Tab. 3-3 angegebenen Redoxmediatoren als zur Aktivitätsmessung von *Pleurotus sapidus* geeignet eingestuft.

**Tab. 3-3**      **Ausgewählte Redoxmediatoren zur weiteren Analyse mit Submerskulturen von *Pleurotus sapidus***

2-Hydroxy-1,4-naphtochinon
Thionin
3,6-Diamino-durol
2,3,5,6-Tetramethyl-p-benzochinon (Durochinon)
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid
N-Methylphenazoniummethylsulfat
1,2-Napthochinon

Bei den restlichen Redoxmediatoren wurde der zugegebene Mediator zu wenig oder gar nicht reduziert, so dass sie von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. 1,4-Benzochinon wurde aufgrund der starken Toxizität nicht verwendet.

Aus dem Redoxmediatorscreening war ersichtlich, dass die in Tab. 3-3 angegebenen Redoxmediatoren eine Veränderung des Cyclovoltammogramms bewirkten. Im Vergleich zu purem Medium zeigte Medium mit Zusatz von Redoxmediator schon eine Veränderung des Cyclovoltammogramms. Bei der Messung in einer hochgewachsenen 48 h alten Submerskultur von *Pleurotus sapidus* wurde ein noch höherer Strom bei positiven Potentialen gemessen. Es sollte untersucht werden, ob diese Veränderungen auf der Aktivität von *Pleurotus sapidus* beruhten oder ob sie durch die Veränderungen im Medium während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* hervorgerufen wurden.

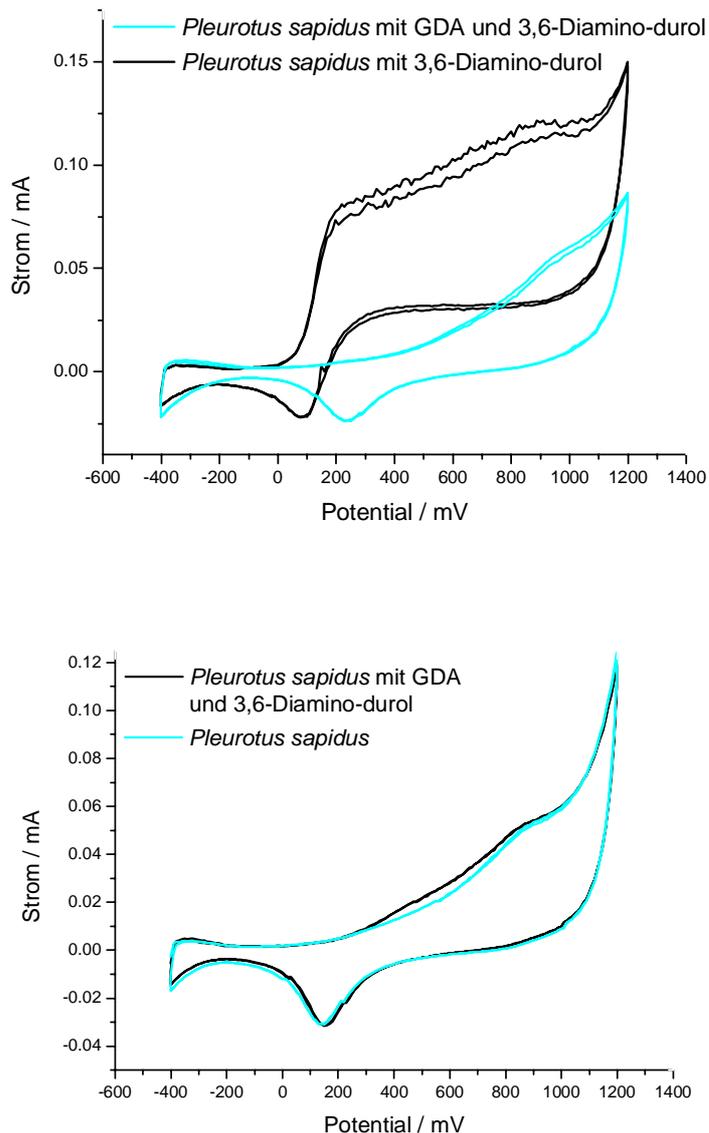
Wenn das Signal auf die Stoffwechselaktivität von *Pleurotus sapidus* zurückzuführen wäre, müsste der positive Oxidationsstrom im Falle einer abgetöteten Kultur nicht mehr nachzuweisen sein. Um dies experimentell zu überprüfen, wurden von ausgewählten Redoxmediatoren jeweils Cyclovoltammogramme einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* aufgenommen, diese dann durch ein Inaktivierungsreagenz abgetötet und im selben Ansatz weitere Cyclovoltammogramme aufgenommen und verglichen.

Zur Durchführung dieser Versuche wurden Inaktivierungsreagenzien verwendet, die nicht redoxaktiv sind, um Wechselwirkungen des Inaktivierungsreagenzes mit den Redoxmediatoren

oder der Elektrode zu vermeiden. Es wurden keine autoklavierten Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* eingesetzt, da der Redoxzustand der Kulturen durch Hitze- und Druckeinwirkung wesentlich beeinflusst wird und aufgrund der ablaufenden Maillardreaktion weitere redoxaktive Substanzen entstehen könnten, die die Untersuchungen verfälschen könnten.

Vorversuche mit m-Kresol und Protectol+GDA (50% Glutardialdehyd) zeigten, dass GDA besser als Inaktivierungsreagenz für den vorgesehenen Versuchsaufbau geeignet ist, da es keine Wechselwirkungen mit dem Elektrodenmaterial zeigte.

Zur Überprüfung, ob inaktiviertes Myzel ebenfalls eine Veränderung der Cyclovoltammogramme bewirkt, wurden die Kulturen mit 1 mL Protectol+GDA (50% Glutardialdehyd) inaktiviert. Es wurde zuvor getestet, ob das Reagenz (Protectol) selbst Reaktionen mit den Redoxmediatoren zeigt. Dies war nicht der Fall, in Medium mit Redoxmediator zeigte sich keine Änderung des Cyclovoltammogramms durch Zugabe von GDA. Für das Screening wurden 48 h alte 100 mL Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* verwendet (Standardbedingungen 5.5.2). Befand sich 3,6-Diamino-durol in der Kultur, zeigte die Kultur nach Zugabe von GDA einen ähnlichen Verlauf wie ohne Zusatz von Redoxmediator (Abb. 3-6).

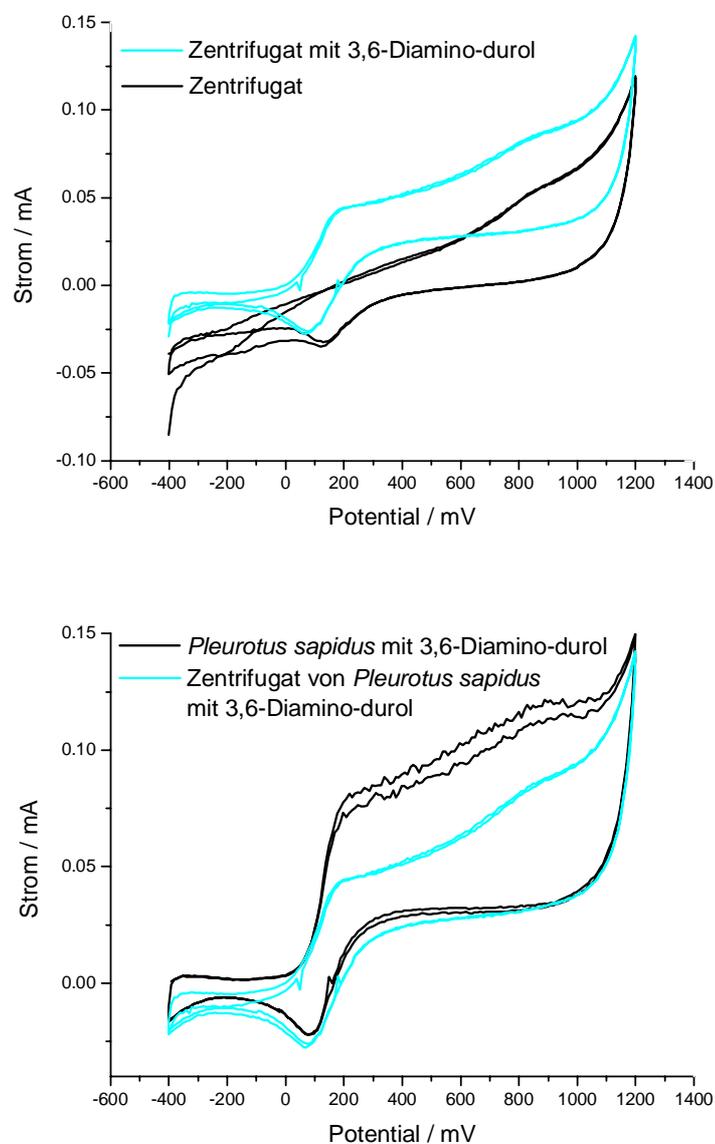


**Abb. 3-6** Cyclovoltammogramme ( $10 \text{ mVs}^{-1}$ ) einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* mit 3,6-Diamino-durol mit und ohne GDA (oben) und einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* mit 3,6-Diamino-durol und GDA vs Submerskultur von *Pleurotus sapidus* ohne 3,6-Diamino-durol (unten)

Da im Falle von  $\text{N,N,N',N'}$ -Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid die Cyclovoltammogramme von lebendem und inaktiviertem Organismus annähernd identisch waren, lag die Vermutung nahe, dass das Signal in diesem Falle nicht von aktiven *Pleurotus sapidus*, sondern von anderen redoxaktiven Substanzen im Medium herrührten. Dies sollte überprüft werden, indem Kulturbrühe ohne Myzel untersucht wurde.

144 h alte Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* wurden 15 min mit 7000 g zentrifugiert und der Überstand (Zentrifugat) abgegossen. Je 100 mL Zentrifugat wurde jeweils mit Puffer auf 200 mL aufgefüllt und wie in 5.5.2 beschrieben analysiert. In Abb. 3-7 sind die

Cyclovoltammogramme von 3,6-Diamino-durol mit einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* und 3,6-Diamino-durol mit dem Zentrifugat der Submerskultur von *Pleurotus sapidus* dargestellt.

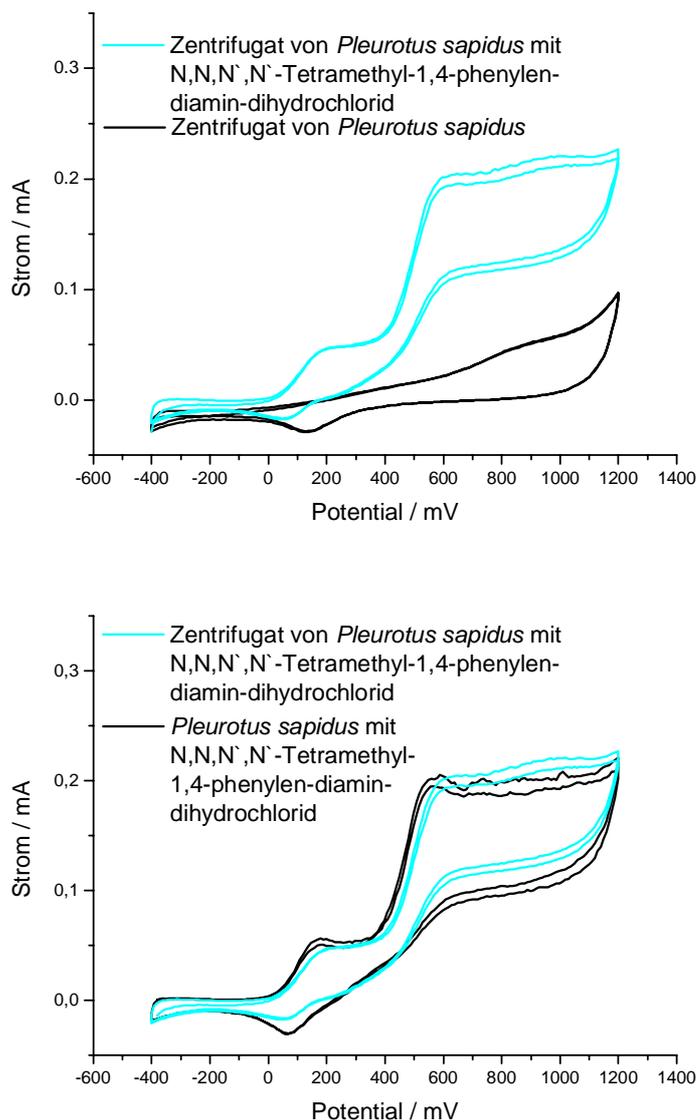


**Abb. 3-7** Cyclovoltammogramme ( $10 \text{ mVs}^{-1}$ ) eines Zentrifugates von *Pleurotus sapidus* mit und ohne 3,6-Diamino-durol (oben) und 3,6-Diamino-durol mit *Pleurotus sapidus* und dem Zentrifugat von *Pleurotus sapidus* (unten)

Bei Zusatz von 3,6-Diamino-durol zeigte sich, dass der Strom im Cyclovoltammogramm einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* höher war als der im Cyclovoltammogramm des Filtrates der Submerskultur von *Pleurotus sapidus*. Der Nachweis von reduzierenden Substanzen im sterilfiltrierten Filtrat (Abtrennung in diesem Fall mit  $0,22 \mu\text{m}$  GP Express Membran von Millipore, Massachusetts) einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* deutete darauf hin, dass

*Pleurotus sapidus* redoxaktive Substanzen in einem gewissen Maße ins Medium abgibt, wie sich an den Cyclovoltammogrammen erkennen ließ. Wurde die Kultur geteilt, einmal komplett mit 3,6-Diamino-durol vermessen und anschließend nur das Filtrat mit 3,6-Diamino-durol vermessen, zeigte sich, dass im Falle der kompletten Submerskultur deutlich mehr reduzierte Substanzen nachweisbar waren.

Auch mit dem Mediator N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylen-diamin-dihydrochlorid wurden Cyclovoltammogramme vom Filtrat der Kultur aufgenommen (Abb. 3-8).



**Abb. 3-8** Cyclovoltammogramme ( $10 \text{ mVs}^{-1}$ ) eines Zentrifugates von *Pleurotus sapidus* mit und ohne N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid (oben) und N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid mit *Pleurotus sapidus* und dem Zentrifugat von *Pleurotus sapidus* (unten)

---

In Abb. 3-8 sind die Cyclovoltammogramme von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid mit einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* und N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid mit dem Zentrifugat der Submerskultur von *Pleurotus sapidus* dargestellt. Bei N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid zeigte sich, dass der Strom im Cyclovoltammogramm des Filtrates ebenso hoch war, wie der im Cyclovoltammogramm der lebenden Kultur. Dieser Versuch zeigte erneut, dass N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid mit Stoffen aus der Kulturbrühe reagierte, denn ohne *Pleurotus sapidus* war ebenfalls reduzierter Redoxmediator nachweisbar.

Aufgrund der Salzstruktur von N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid ist anzunehmen, dass dieser Redoxmediator die fungalen Membranen nicht optimal passieren kann und sich somit kaum Reaktionsmöglichkeiten zwischen aktivem *Pleurotus sapidus* und N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid ergeben. N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid wurde demzufolge nicht weiter zur Aktivitätsmessung von *Pleurotus sapidus* verwendet.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass einige Redoxmediatoren eine Signalverstärkung bewirkten, so dass dieses elektrochemisch detektiert werden konnte. Die Stoffe aus dem mikrobiellen Stoffwechsel, die die Reduktion der Elektronendonatoren bewirken, konnten bisher noch nicht identifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass dieses System der Reduktion von Redoxmediatoren bei Bakterien, Hefen, tierischen Zellen und wie hier gezeigt bei höheren Pilzen anwendbar ist, könnte die Reduktion entweder auf unspezifischen Redoxreaktionen oder auf einem bestimmten Redoxsystem im Metabolismus von Mikroorganismen basieren. Viele Redoxmediatoren ähneln den Koenzymen in der Atmungskette. Unter Ausschluss von Sauerstoff dienen sie als Sauerstoffersatz, um die Elektronen (Reduktionsäquivalente) aus der Atmungskette zu übernehmen.

**Tab. 3-4 Beurteilung der ausgewählten Redoxmediatoren**

<b>Name des Redoxmediators</b>	<b>Bemerkung</b>
2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	schlecht wasserlöslich
Thionin	schlecht wasserlöslich, mäßiges Signal, greift die Elektrode an
3,6-Diamino-durol	geeignet
2,3,5,6-Tetramethyl-p-benzochinon (Durochinon)	schlecht wasserlöslich
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin- dihydrochlorid	komplett wasserlöslich, Reaktion nur mit Bestandteilen in der Kulturbrühe
N-Methylphenazoniummethylsulfat	komplett wasserlöslich, wird von <i>Pleurotus sapidus</i> nicht absorbiert
1,2-Naphthochinon	schlecht wasserlöslich

Es konnte festgestellt werden, dass *Pleurotus sapidus* in der Lage war, verschiedene in oxidierter Form vorliegende Redoxmediatoren zu reduzieren, und somit ein Einsatz des Bioaktivitätssensors zur Aktivitätsbestimmung in Frage kam. Aus den in Tab. 3-4 angegebenen Redoxmediatoren zeigte 3,6-Diamino-durol die besten Ergebnisse. Aufgrund der Stoffwechselaktivität von *Pleurotus sapidus* stieg die Konzentration an reduziertem 3,6-Diamino-durol an, welches an der Höhe des Grenzstromsignals erkennbar war. Als Ergebnis des Redoxmediatorscreenings konnte 3,6-Diamino-durol als Favorit für die Aktivitätsmessungen gefunden werden. Dieser Mediator wurde für weitere Untersuchung mit Strom/Zeit-Kurven ausgewählt. Zur Quantifizierung kann ein Potential im Bereich von 200 bis 800 mV vs Ag/AgCl herangezogen werden.

Zwischenzusammenfassung 3.2.2.1:

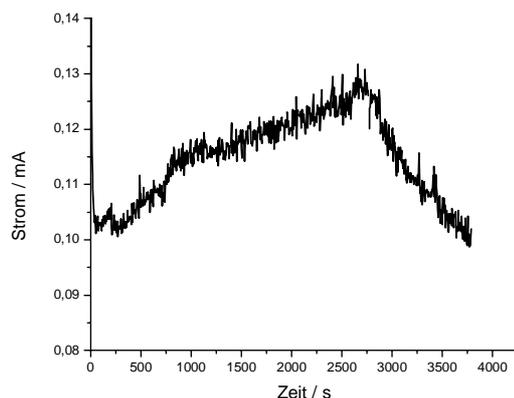
- Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* konnten ausgewählte Redoxmediatoren in Abwesenheit von Sauerstoff reduzieren. Die reduzierten Redoxmediatoren waren mit einem Drei-Elektroden-System nachweisbar.
- Bei abgetötetem *Pleurotus sapidus* zeigte sich keine hohe Menge an reduzierenden Substanzen mehr (Ausnahme N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin-dihydrochlorid).
- Der Redoxmediator 3,6-Diamino-durol wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt.

3.2.2.2 *Strom/Zeit-Kurven mit 3,6-Diamino-durol zur Aktivitätsmessung von Pleurotus sapidus*

Die Wachstumskontrolle mit Hilfe des amperometrischen Bioaktivitätssensors war Aufgabe der folgenden Experimente. Es sollte überprüft werden, wie sich das Stromsignal von *Pleurotus sapidus* im Verlauf einer Kultivierung bzw. verschiedenen Wachstumsphasen verändert. Für die amperometrischen Messungen mit 3,6-Diamino-durol wurde ein Potential von 300 mV vs Ag/AgCl zur Quantifizierung festgelegt, um den Einfluss von Störsubstanzen, die ein höheres Standardpotential besitzen, möglichst gering zu halten. Nach Festlegung dieser Spannung im Grenzstrombereich wurden Strom/Zeit-Kurven mit *Pleurotus sapidus* bei 300 mV aufgenommen.

200 mL einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* wurden nach 144 h Kultivierung unter sterilen Bedingungen mit 3,6-Diamino-durol (1 mM) in den Minireaktor gegeben. Es wurde ein Belüftungsrohr mit Sterilfilter, eine Doppelblechelektrode und eine Referenzelektrode eingesetzt. Um den Redoxmediator möglichst vollständig zu lösen, wurde 10 min intensiv gerührt. Unter Luftausschluss wurde ein Cyclovoltammogramm aufgenommen (Cyclovoltammogramm bei 0 h in Abb. 3-10).

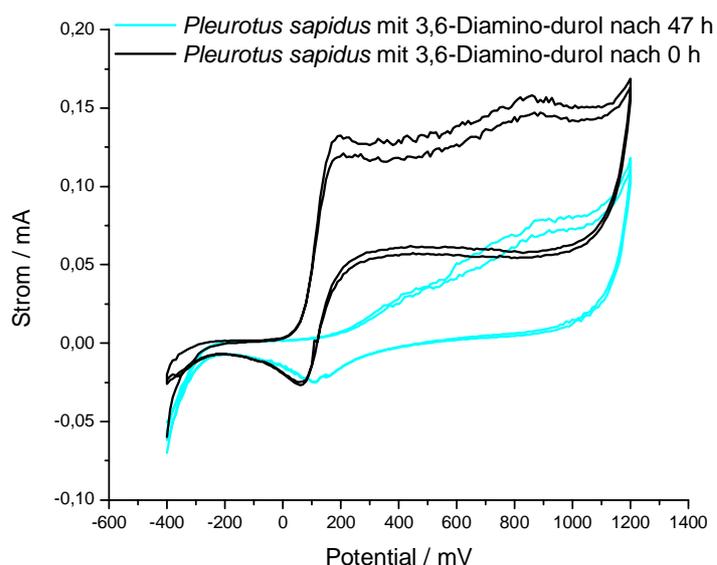
Bei einem konstanten Potential von 300 mV wurde unter Stickstoffbegasung eine Strom/Zeit-Kurve aufgenommen. Nach Belüftung sank die Stromstärke ab (Abb. 3-9), da der reduzierte Redoxmediator durch die eintretende Luft oxidiert wurde und nicht mehr an der Elektrode nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 3-9** Strom/Zeit-Kurve (300 mV) einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* mit 3,6-Diamino-durol; nach 2600 s wurde die Begasung von Stickstoff auf Luft umgestellt

Die aufgenommenen Strom/Zeit-Kurven zeigten, dass der gemessene Strom nach Belüftung absank. Nach 20 h Kultivierung unter Belüftung wurde bei erneuter Stickstoffbegasung der ursprüngliche Strom nicht mehr erreicht, sondern nur etwa 0,03 mA (ca. 30% bezogen auf den Ausgangswert von 0,1 mA in Abb. 3-9). Es wurde nach 42 h nochmals 3,6-Diamino-durol (1,5 mM) zugegeben, welches einen Stromanstieg bis auf 0,18 mA bewirkte. Dies zeigte, dass erneut reduzierter Redoxmediator nachgewiesen werden konnte.

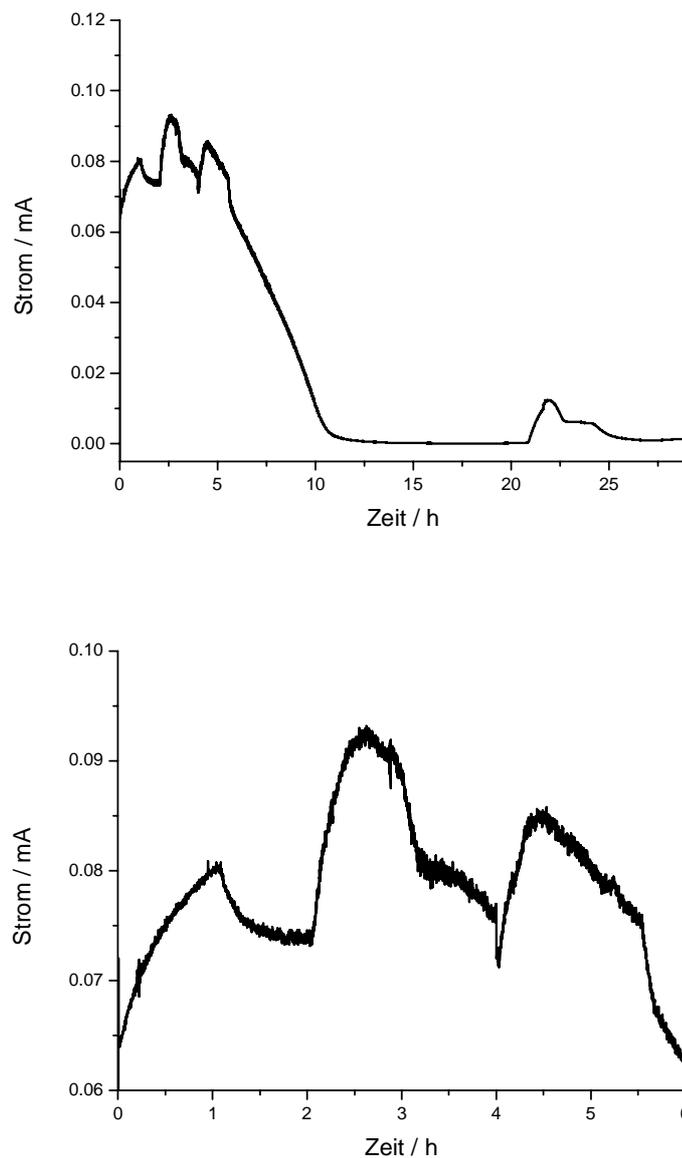
Nach 47 h wurde ein weiteres Cyclovoltammogramm unter Stickstoff aufgenommen. Dieses und das Cyclovoltammogramm nach 0 h sind in Abb. 3-10 dargestellt.



**Abb. 3-10** Cyclovoltammogramme ( $10 \text{ mVs}^{-1}$ ) nach Zugabe von 3,6-Diamino-durol nach 0 und nach 47 h Kultivierung einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* unter Belüftung (0,17 vvm)

Das Cyclovoltammogramm nach 47 h zeigte einen niedrigeren Oxidationsstrom, obwohl die Submerskultur von *Pleurotus sapidus* gewachsen und noch aktiv war (Sauerstoffzehrung positiv). Dies deutete darauf hin, dass die Mediatorkonzentration abgenommen hatte.

Eine weitere 48 h alte 200 mL Submerskultur von *Pleurotus sapidus* wurde in den Minireaktor gegeben. Nachdem 3,6-Diamino-durol dazugegeben wurde (1 mM), wurde ein Strom/Zeit-Diagramm (Abb. 3-11) bei einem konstanten Potential von 300 mV unter Wechselbegasung (Tab. 3-5) aufgenommen.



**Abb. 3-11** Strom/Zeit-Kurve einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* mit 3,6-Diamino-durol: 0-30 h (oben) und 0-6 h, stündlicher Wechsel von Luft- zu Stickstoffbegasung (unten)

**Tab. 3-5 Wechselbegasung einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* in Anwesenheit von 3,6-Diamino-durol (1 mM)**

<b>Zeit</b>	<b>Begasungsart</b>
<b>h</b>	
0	Stickstoff
1	Luft
2	Stickstoff
3	Luft
4	Stickstoff
5	Luft
21	Stickstoff
22,5	Luft
24	Stickstoff
27	Luft
28,5	Stickstoff

Zur Überprüfung des Messsystems mit 3,6-Diamino-durol wurden Strom/Zeit-Kurven unter Wechselbegasung aufgenommen, um die Aktivität einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* unter monoseptischen Bedingungen über mehrere Stunden zu beobachten. Es wurde beobachtet, dass in Gegenwart von Stickstoff der Strom bis zum maximalen Grenzstrom zunahm und bei Belüften des Minireaktors wieder abnahm, da der generierte reduzierte Redoxmediator durch den Luftsauerstoff oxidiert wurde, so dass keine Oxidation an der Elektrode erfolgen konnte.

Es zeigte sich, dass unter Stickstoffbegasung der Grenzstrom anstieg, und in Anwesenheit von Sauerstoff wieder durch Oxidation des Redoxmediators abfiel. Dieses Verhalten war reversibel (Abb. 3-11 unten).

Als nach ca. 21 h die Kultur wieder mit Stickstoff begast wurde, konnte nicht mehr der ursprüngliche Diffusionsgrenzstrom, sondern nur etwa 10% des Anfangsgrenzstromes (~ 0,01 mA) gemessen werden (Abb. 3-11 oben). Im Verlaufe einer Kultivierung sollte man erwarten, dass in Abwesenheit von inhibierenden Stoffen die Aktivität der Kultur aufgrund der Zunahme an Biomasse steigt und mehr reduzierter Redoxmediator nachgewiesen werden kann. Die Experimente zeigten jedoch das Gegenteil: Schon nach ca. 20 h wurde der ursprüngliche Strom nicht mehr erreicht, obwohl die Kultur weiterhin eine Sauerstoffzehrung zeigte. In weiteren Versuchen zeigte sich immer eine Abnahme des Stromes im Verlauf der Kultivierung.

Dies ließ die Vermutung zu, dass die Menge an Redoxmediator im Verlaufe der Kultivierung abnahm.

Bevor dieses Phänomen des geringeren Stromes nach längeren Kultivierungszeiten untersucht wurde, fand zunächst die Überprüfung des Mediums statt, ob es in Abwesenheit von *Pleurotus sapidus* ebenfalls zu Schwankungen des Stromes in Abhängigkeit von der Begasungsart (Luft/Stickstoff) kommt. Es sollte untersucht werden, ob das Ab- und Zunehmen der Stromstärke spezifisch auf die Aktivität von *Pleurotus sapidus* zurückzuführen ist.

Dazu wurden 200 mL Medium im Minireaktor mit 3,6-Diamino-durol (1 mM) versetzt und anschließend eine Strom/Zeit-Kurve (bei 300 mV) unter wechselnder Begasung aufgenommen, um eventuelle Abbaureaktionen festzustellen und diese mit der Strom/Zeit-Kurve von *Pleurotus sapidus* und 3,6-Diamino-durol zu vergleichen.

Bei purem Medium zeigte sich, dass ein Anstieg des Stromes unter Stickstoff nicht zu beobachten war, da in Abwesenheit von *Pleurotus sapidus* die Konzentration an reduziertem Redoxmediator nicht erhöht wurde. Dies war ein weiterer Beweis dafür, dass die gemessenen Signale auf lebenden *Pleurotus sapidus* zurückzuführen waren.

Das Medium zeigte nicht die mit *Pleurotus sapidus* gemessenen Maxima und Minima (vgl. Abb. 3-11 unten). Ein Anstieg des Stromes unter Stickstoff war nicht zu beobachten.

Im Strom/Zeit-Diagramm einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* (Abb. 3-11) war zu erkennen, dass der Strom während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* abfiel. Es sollte überprüft werden, ob der Abfall des Grenzstromes durch eine Abnahme der Redoxmediatorkonzentration in der wässrigen Phase bedingt ist. Um zu klären, ob die Konzentration an 3,6-Diamino-durol in der wässrigen Phase in Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* abnimmt, wurde die photometrische Absorption einer Lösung von 3,6-Diamino-durol mit und ohne *Pleurotus sapidus* bestimmt. Dazu wurden 3,6-Diamino-durol (0,5 mM) in 100 mL EtOH/H<sub>2</sub>O (1/5) gelöst und in Quarzküvetten die photometrische Absorption gegen dest. H<sub>2</sub>O bestimmt.

Es wurde ein Scanlauf von  $\lambda=500-200$  nm durchgeführt und als Absorptionsmaximum 330 nm bestimmt. Pellets einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* wurden abfiltriert, vollständig von der anhaftenden Lösung befreit und zur Redoxmediatorlösung gegeben.

Die photometrische Absorption der Redoxmediatorlösung bei 330 nm wurde vor und nach Einwirkung der Pellets gemessen. Es wurde mit isolierten Pellets gearbeitet, da die Kulturbrühe im Bereich der Messung (330 nm) ebenfalls eine starke Absorption zeigte.

Die Absorption der 3,6-Diamino-durol-Lösung sank nach 20minütiger Einwirkung von *Pleurotus sapidus* ab. Eine Aufnahme des Redoxmediators vom Organismus konnte durch

---

photometrische Messungen bestätigt werden. Da während einer Kultivierung die absolute Menge an Zellen und Zellmembranen zunimmt, kann eine größere Menge Redoxmediator in den fungalen Zellen aufgenommen werden. Daneben ist ein Abbau von 3,6-Diamino-durol durch das fungale Enzymsystem denkbar (vgl. 2.1.3.1). Für die Messung ist es wichtig, dass der Mediator aus der wässrigen Lösung verschwindet. Ob ein Abbau des Mediators stattfindet, wurde nicht weiter untersucht und ist unerheblich für die amperometrische Messung.

### Zwischenzusammenfassung 3.2.2.2:

- Eine Bestimmung des unter Abwesenheit von Sauerstoff gebildeten reduzierten Redoxmediators war möglich.
- Durch Wechselbegasung ließen sich Oxidation und Reduktion des Redoxmediators nachweisen.
- Bei Medium ohne *Pleurotus sapidus* konnte keine Reduktion/Oxidation des Redoxmediators nachgewiesen werden (konstanter Diffusionsgrenzstrom).

### 3.2.3 Bemerkungen zu den Aktivitätsmessungen mit Amperometrie

Zur Anwendung des Messsystems, insbesondere für ein Langzeitmonitoring der Aktivität ist eine bekannte Redoxmediatorkonzentration Voraussetzung. Obwohl das Messsystem generell auf höhere Pilze übertragbar wäre, scheitert eine dauerhafte Anwendung an den absorptiven und/oder metabolischen Fähigkeiten des Pilzmyzels. Eine direkte definierte Zugabe von Redoxmediator unmittelbar vor der Messung ist nicht praktikabel, da die Organismen schon nach wenigen Minuten 3,6-Diamino-durol aufnehmen. Die Absorption an 3,6-Diamino-durol in die Membranen findet in einem stärkeren Ausmaß als bei Bakterien und Hefen statt.

Beim Wachstum von Hyphen liegt ein nicht durch eine Zellwand geschützter Spitzenkörper (Weber & Pitt 2001) vor, an dem fungale Membranen (Lipid Doppelschichten) direkt in Kontakt mit der Kulturbrühe kommen. Auf diese Weise ist eine Aufnahme von lipophilen Substanzen direkt in das Membransystem möglich.

Das vorgestellte Messsystem ist auf Bakterien und Hefen anwendbar, da die Redoxmediatoren weder abgebaut noch in beträchtlichen Maße absorbiert werden. Bei Bakterien und Hefen erfolgt bei Teilung der Aufbau einer neuen Zellwand im Innern der Zelle, so dass kein direkter Kontakt der Lipidmembranen mit dem Kulturmedium erfolgt. Da höhere Pilze Enzyme zum Abbau von aromatischen Systemen, z.B. Lignin (Glenn et al. 1983), besitzen (2.1.3.1) wäre es möglich, dass die Redoxmediatoren, die ebenfalls benzoide und chinoide Strukturen enthalten, durch das fungale Enzymsystem abgebaut werden.

Die Anwendung eines amperometrischen Messsystems für höhere Pilze wäre nur durchzuführen, wenn parallel zur Strommessung eine Quantifizierung des Gesamtreduxmediators (reduzierte und oxidierte Form) in der wässrigen Phase vorgenommen würde.

#### Zwischenzusammenfassung 3.2:

- Mit dem amperometrischen System ist die Bestimmung der Aktivität möglich, wenn die Gesamtkonzentration an Redoxmediator in der wässrigen Phase bekannt ist.
- Das Messprinzip eignete sich nicht für Langzeitmessungen, da die Konzentration an Redoxmediator in der wässrigen Lösung nicht konstant blieb und nicht ohne weiteres konstant gehalten werden konnte.

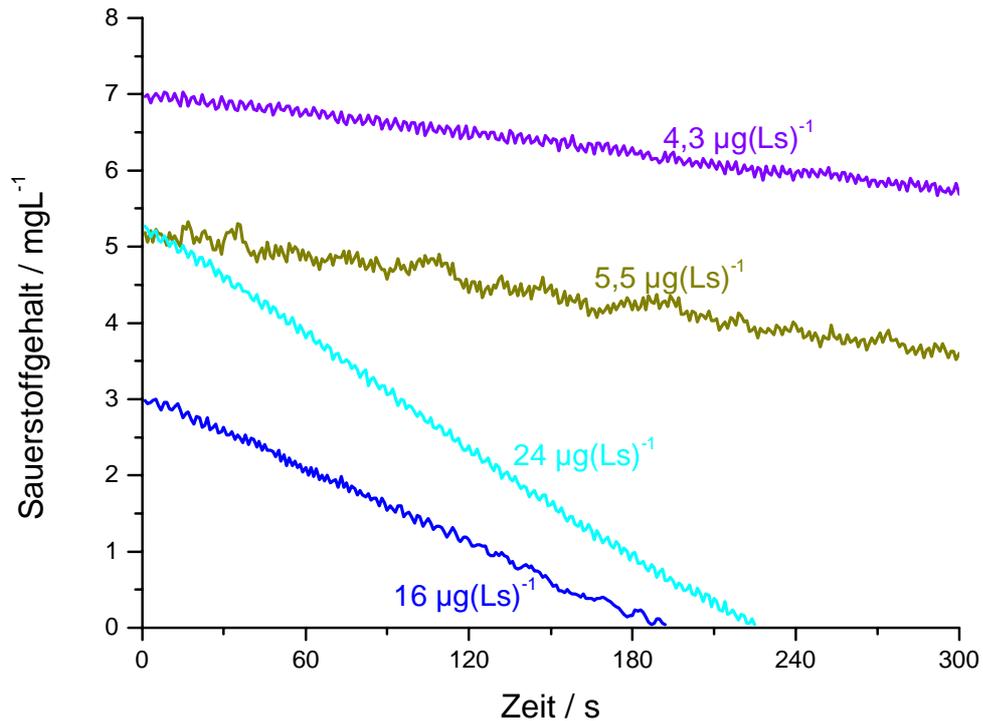
### **3.3 Aktivitätsmessung mit Respirometrie**

#### **3.3.1 Motivation zum Einsatz von Respirometrie zur Aktivitätsbestimmung**

Die Ergebnisse mit dem amperometrischen Aktivitätssensor (3.2) zeigten, dass dieser Sensortyp sich nicht für Aktivitätsmessungen über einen längeren Zeitraum bei Kultivierungen höherer Pilze im Bioreaktor eignet. Sauerstoffzehrungsmessungen (Respirometrie) dienen in der Biotechnologie, Umwelttechnik, Lebensmittelindustrie und weiteren Bereichen als Nachweis für mikrobielle Kontaminationen. Mit der Respirometrie ist es möglich, kleinste Mengen an aktiven Mikroorganismen nachzuweisen, so dass sie als Alternative zur amperometrischen Aktivitätsmessung untersucht wurde. Wie sich die Aktivität höherer Pilze über die Respirometrie nachweisen lässt und welche Auswirkungen eine Dosierung an toxischen Substraten auf die Sauerstoffzehrung hat, wird in diesem Kapitel beschrieben. Für die respirometrischen Messungen wurden verschiedene Sauerstoffmessgeräte eingesetzt (5.3.1.2). Die ersten respirometrischen Untersuchungen wurden mit einem externen Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät (5.6.2) durchgeführt, weitere Messungen mit sauerstoffsensitiven Optoden (5.6.4) folgten. Eine interne Messung im Kulturgefäß erfolgte schließlich mit den konventionellen Clark-Elektroden im Bioreaktor (5.6.3) und mit sauerstoffsensitiven Folien (5.6.5).

#### **3.3.2 Quantitative Auswertung der Sauerstoffzehrungskurven**

Die in dieser Arbeit bestimmten Sauerstoffzehrungsraten wurden als der negative Wert der ersten Ableitung der Sauerstoffkonzentration nach der Zeit in der Einheit  $\mu\text{g pro Liter und Sekunde } [\mu\text{g(Ls)}^{-1}]$  angegeben. Durch die Abnahme des Sauerstoffgehaltes während der Messung resultiert eine negative Steigung (Abb. 3-12), welche einer Sauerstoffzehrung (Sauerstoffverbrauch) der Submerskultur entspricht.



**Abb. 3-12** Ableitung des Messwertes der Sauerstoffzehrung in  $\mu\text{g}(\text{Ls})^{-1}$  aus den Sauerstoffzehrungskurven einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* zu verschiedenen Kultivierungszeiten

Im Falle der Sauerstoffzehrungsmessung im Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät wurden die Proben mit einem Stempel vom Luftsauerstoff isoliert (5.6.2). Die meist linearen Sauerstoffzehrungskurven konnten über lineare Regression ausgewertet werden. Bei den Sauerstoffzehrungen in den Spinnerflasks (5.6.5) und im Bioreaktor, die ohne Übersichtung mit einem sauerstoffundurchlässigen Material (als Stempelersatz) aufgenommen wurden, wurde zur Auswertung jeweils der lineare Teil zu Beginn der Messung verwendet. Je geringer der Sauerstoffgehalt in der Kultur, desto höher war die Eindiffusion von Sauerstoff aus dem überstehenden Gasraum und die Steigungswerte nahmen folglich ab. In Proben, bei denen der Sauerstoffgehalt während der Messung nicht linear abnahm, sondern aufgrund von Pelletterfall zunahm, konnte nur eine halbquantitative Auswertung erfolgen. Bei älteren Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* war häufig zu beobachten, dass die brüchigen Pellets durch die Scherkräfte des Rührers zerfielen und die Sauerstoffzehrung während der Messung zunahm.

### 3.3.3 Charakteristik der Messung mit dem Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät

#### 3.3.3.1 Verdünnungsversuche von Submerskulturen von *Chaetomium globosum* und *Pleurotus sapidus*

Da der Gehalt an aktiver Biomasse von der Pelletform abhängig ist, und der Gehalt an Biomasse nicht mit der Aktivität korreliert, wurde überprüft, ob die Sauerstoffzehrung bei gleicher Pelletform und Größe annähernd proportional zur Biomasse ist.

Dazu wurde je eine Submerskultur von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* mit gleicher Pelletverteilung ausgesucht (Tab. 3-6), um davon verschiedene Konzentrationen an Biotrockenmasse durch Verdünnen mit Medium herzustellen.

**Tab. 3-6 Ausgangskulturen für den Verdünnungsversuch**

	<b>Kultivierungsdauer</b>	<b>Glucosegehalt</b>	<b>Gehalt an Biotrockenmasse</b>
	<b>h</b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>
<i>Pleurotus sapidus</i>	96	23,4	3,42
<i>Chaetomium globosum</i>	96	20,2	3,78

Der Gehalt an Biotrockenmasse der Verdünnungen sowie die gemessenen Sauerstoffzehrungen sind in Tab. 3-7 angegeben.

**Tab. 3-7 Sauerstoffzehrungsraten und berechnete Gehalte an Biotrockenmasse der Verdünnungen von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum***

	<b>Gehalt an Biotrockenmasse</b>	<b>Sauerstoffzehrung</b>
	<b>gL<sup>-1</sup></b>	<b>µg(Ls)<sup>-1</sup></b>
<i>Pleurotus sapidus</i>	1,51	1,6
	2,27	5,4
	3,02	8,8
	3,78	11,6
<i>Chaetomium globosum</i>	0,68	1,8
	1,37	2,7
	2,05	3,6
	2,74	4,7

Bei gleicher Pelletverteilung und gleichem Aktivitätsstadium konnte eine lineare Abhängigkeit der Sauerstoffzehrung vom Gehalt an Biotrockenmasse gefunden werden. Bei ungleicher Verteilung bzw. verschiedenen Durchmessern der Pellets kann aus einer gemessenen Sauerstoffzehrung nicht auf die Biotrockenmasse der Probe geschlossen werden.

### 3.3.3.2 Auswirkung von Turraxen der Submerskulturen auf die Sauerstoffzehrung

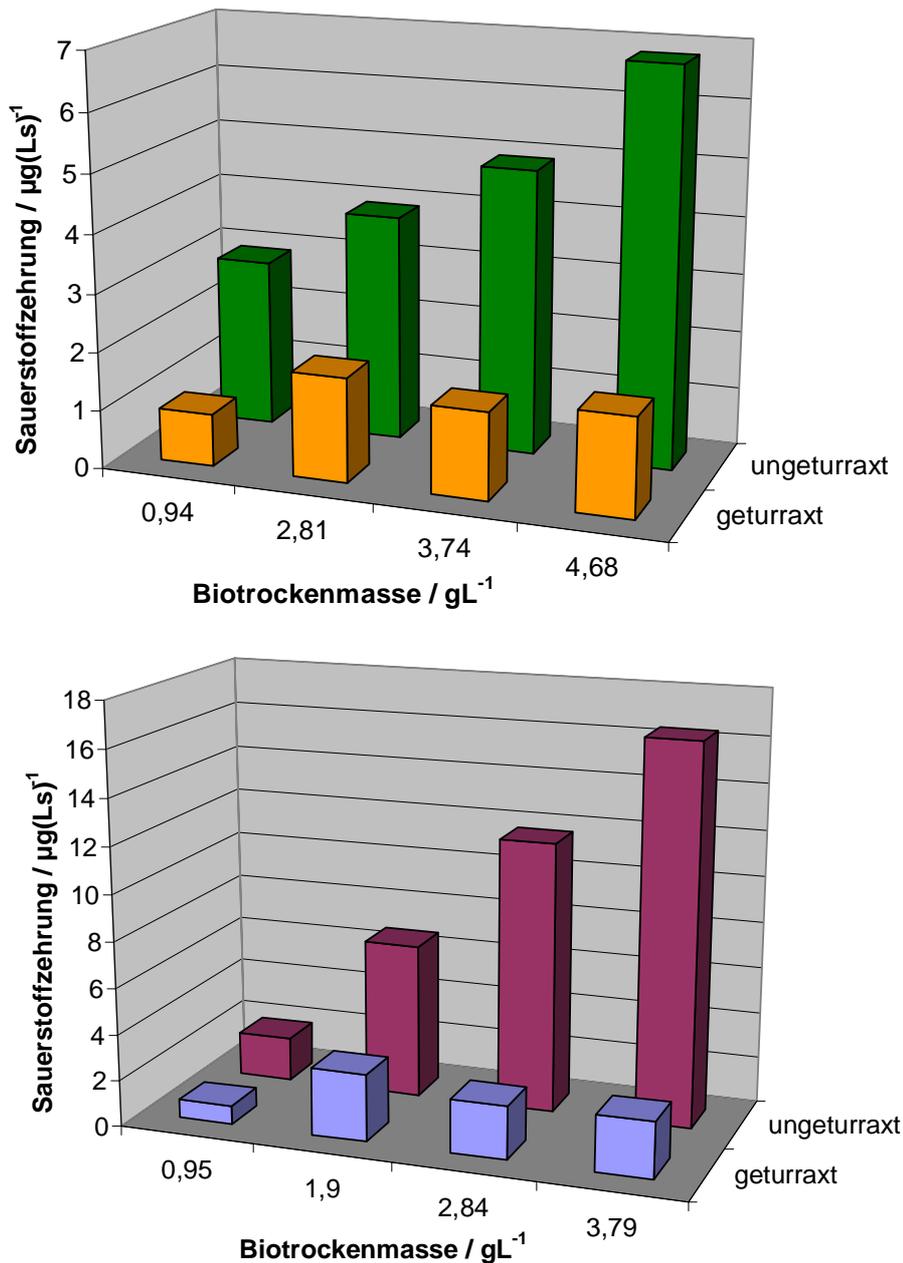
Um eine homogene Probe zu erhalten wurde eine Ultraturraxbehandlung (5.3.4) eingesetzt (vgl. Taubert et al. 2000). Da im vorhergehenden Versuch eine lineare Korrelation zwischen dem Gehalt an Biomasse und der Sauerstoffzehrung gefunden wurde, sollte untersucht werden, ob diese nach Turraxen der Probe ebenfalls gegeben ist. Die Submerskulturen wurden nach der ersten Messung direkt in der Messzelle mit dem Ultraturrax homogenisiert, um eventuelle Fehler durch eine zweite Probenahme zu vermeiden.

Wie im vorherigen Versuch wurden zwei Submerskulturen ausgesucht (Tab. 3-8). Bei *Pleurotus sapidus* betrug der Durchmesser der Pellets bis zu 2 mm, bei *Chaetomium globosum* weniger als 1 mm.

**Tab. 3-8 Ausgangskulturen für den Verdünnungsversuch mit Turraxen**

	<b>Zeit</b>	<b>Glucosegehalt</b>	<b>Gehalt an Biotrockenmasse</b>
	<b>h</b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>	<b>gL<sup>-1</sup></b>
<i>Pleurotus sapidus</i>	96	22,9	4,68
<i>Chaetomium globosum</i>	48	18,5	4,74

Von diesen Submerskulturen wurden Verdünnungen mit Medium angesetzt und die Sauerstoffzehrung bestimmt. Nach der Messung wurde der Messzelleninhalt in der Zelle für 10 s auf Stufe 6 geturraxt und danach unmittelbar erneut vermessen. Aus den ermittelten Steigungen ergeben sich Sauerstoffzehrungen, die in Abb. 3-13 graphisch dargestellt sind.



**Abb. 3-13** Vergleichende Auftragung der Sauerstoffzehrung geturraxt/ungeturraxt von *Pleurotus sapidus* (oben) und *Chaetomium globosum* (unten)

Es konnte gezeigt werden, dass eine unmittelbar vor der Messung der Sauerstoffzehrung durchgeführte Ultraturraxbehandlung der Probe gravierende Auswirkungen auf die Sauerstoffzehrung hat. Die Zellen wurden zwar nicht komplett zerstört, aber diese Zerstörung/Schwächung der Kultur war nicht proportional zur Biomasse.

Es zeigte sich, dass im Falle eines direkt vor der Messung erfolgten Turraxgangs die lineare Abhängigkeit nicht mehr gegeben war. Folglich wurden zur Bestimmung der Sauerstoffzehrung nur ungeturraxte Proben eingesetzt.

---



---

3.3.3.3 *Stabilität der Sauerstoffmessung in Gegenwart von (+)-Limonen und (+)-Valencen*

Das Messsystem zur Bestimmung der Aktivität von höheren Pilzen soll während der Terpenbiotransformation eingesetzt werden. Dazu ist es erforderlich, dass sich die generierten Signale indifferent in Gegenwart von Terpenen (hier (+)-Limonen und (+)-Valencen) verhalten. Zunächst wurde untersucht, ob die Messung von gelöstem Sauerstoff im Medium mit einer konventionellen Clark-Elektrode von (+)-Limonen beeinflusst wird. Dazu wurde Medium in die Messzelle gegeben, diese bei 25°C temperiert und belüftet, bis sich der Sauerstoffgehalt im Gleichgewicht befand (7,8 mgL<sup>-1</sup>). Anschließend wurde der Sauerstoffgehalt gemessen, nachdem (+)-Limonen (bis 9 mM) zugegeben wurde (Tab. 3-9).

**Tab. 3-9 Sauerstoffgehalt von Medium vor und nach Zugabe von (+)-Limonen**

<b>Zeit</b>	<b>Sauerstoffgehalt</b>	<b>Temperatur</b>
<b>min</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>	<b>°C</b>
0	7,94	24,8
4	7,77	25,3
12	7,74	25,3
29	7,78	25,6
31	7,78	25,6
32	Konzentrationserhöhung an (+)-Limonen um 3 mM	
33	7,77	25,6
35	7,79	25,6
50	7,81	25,5
64	7,80	25,5
65	Konzentrationserhöhung an (+)-Limonen um 6 mM	
66	7,77	25,5
74	7,77	25,5
88	7,77	25,6
98	7,78	25,6

Aus den Messwerten ergab sich, dass die Anwesenheit von (+)-Limonen in der Messlösung keinen merklichen Einfluss auf die Messung mit einer Clark-Elektrode hat. Bei (+)-Valencen zeigte sich ebenfalls keine Änderung des Messsignals. Eine Messung des Sauerstoffgehaltes in Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* sollte ebenso unabhängig von den Gehalten an

Terpenen sein. Die Anwesenheit von Terpenen hat keinen Einfluss auf die Sauerstoffmessung in Medien.

#### 3.3.3.4 Auswirkung der Zugabe von Toxinen und Substraten auf die Sauerstoffzehrung

Als nächstes sollten die Änderungen der Sauerstoffzehrung nach Zugabe von Toxinen und Substraten näher untersucht werden. Da m-Kresol als Inaktivierungsreagenz von Mikroorganismen bekannt ist, sollte es exemplarisch als starkes Toxin zur Inaktivierung von Submerskulturen von *Chaetomium globosum* eingesetzt werden. Es sollte untersucht werden, ob Beeinflussungen der Stoffwechselaktivität durch m-Kresol direkt und unmittelbar erfasst werden können. Bei einer Dosierung von m-Kresol zu Puffer trat keine Änderung des Messsignals ein. Das Messsignal der Clark-Elektrode wurde von m-Kresol nicht beeinflusst. Nach einer Dosierung von m-Kresol zu einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* kam die Sauerstoffzehrung der Kultur sofort zum Erliegen. Beeinträchtigungen der Aktivität, wie hier das Inaktivieren durch m-Kresol, konnten unmittelbar über die Messung der Sauerstoffzehrung nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen mit toxischen Stoffen (Terpenen) sollten zeigen, ob ähnliche direkte Auswirkungen wie bei der Inaktivierung mit m-Kresol über die Messung der Sauerstoffzehrung nachweisbar bzw. quantifizierbar sind. Der Einfluss von Substrat (hier Glucose) auf die Sauerstoffzehrung einer Kultur von *Chaetomium globosum* wurde in diesem Zusammenhang untersucht.

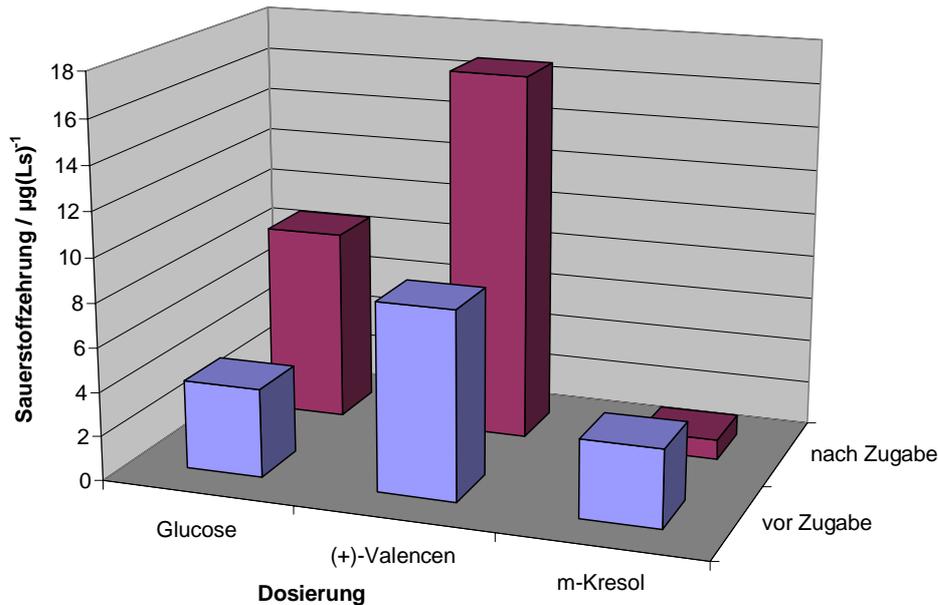
So wurden aus einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* Pellets entnommen und diese über eine Nutsche mit Puffer glucosefrei gewaschen, um einen Einfluss einer Glucose- bzw. (+)-Valencen-Dosierung zu untersuchen. Die in Puffer aufgenommenen Pellets wurden anschließend für die Sauerstoffzehrungsmessungen (5.6.2) eingesetzt, wobei jeweils nach 2 min 167 mM Glucose bzw. 40 mM (+)-Valencen während der Messung zudosiert wurde. Als Vergleichswert diente eine Messung mit 4 mL Kultur ohne Zugabe.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Sauerstoffzehrung vor und nach Dosierung festgestellt werden. Aus diesem Grunde wurden zwei Submerskulturen von *Chaetomium globosum* in Medium und Puffer kultiviert (bzw. glucosefrei gelagert) und nach 120, 192, 240 und 696 h Kultivierungsdauer, unter Zudosierung von Glucose, (+)-Valencen oder m-Kresol (Tab. 3-10) Sauerstoffzehrungen aufgenommen.

**Tab. 3-10 Dosierungen zu 5 mL Proben einer Submerskultur von *Chaetomium globosum***

Glucosezugabe (167 mM)	300 $\mu\text{L}$ Glucoselösung ( $500 \text{ gL}^{-1}$ )
(+)-Valencen-Zugabe (16 mM)	20 $\mu\text{L}$ (+)-Valencen
m-Kresol-Zugabe (191 mM)	100 $\mu\text{L}$ m-Kresol

Es konnten die in Abb. 3-14 angegebenen Sauerstoffzehrung gemessen werden.



**Abb. 3-14 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Sauerstoffzehrung der Dosierungsversuche an einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* nach 120 h Kultivierung in Puffer**

Es zeigte sich, dass eine Dosierung von Glucose und (+)-Valencen die Sauerstoffzehrung bei Kultivierung in Medium und Puffer erhöht. Eine Dosierung von m-Kresol führte in beiden Fällen zu einem Rückgang der Sauerstoffzehrung.

Durch Dosierungsversuche mit Glucose, m-Kresol und (+)-Valencen konnten Veränderungen der Sauerstoffzehrung an einer in glucosefreiem Medium gelagerten Submerskultur von *Chaetomium globosum* nachgewiesen werden. Insbesondere die Zunahme der Sauerstoffzehrung nach Dosierung von (+)-Valencen weist auf eine Metabolisierung von (+)-Valencen durch *Chaetomium globosum* hin. Es konnte gezeigt werden, dass durch m-Kresol inaktivierte Organismen keine Sauerstoffzehrung mehr zeigten. Hierbei war es wichtig zu erkennen, wie schnell der Metabolismus des Mikroorganismus einerseits und das Messsystem andererseits auf die Störung reagierte. Aufgrund der Tatsache, dass nach ca. 5 s nach Zugabe

von m-Kresol keine Sauerstoffzehrung mehr zu messen war, sind Aktivitätsbestimmungen über die Sauerstoffzehrung als *online*-Signal geeignet.

Eine quantitative Auswertung der Sauerstoffzehrung nach 192, 240 und 696 h war nicht möglich, da die Pellets mit zunehmender Kultivierungszeit und Versorgungsmangel immer labiler wurden und durch das Rühren in einem geringen Maße zerfielen. Dies führte zu einer Vergrößerung der Oberfläche der Pellets und das Innere der Pellets kam in Kontakt zu Sauerstoff und Medium, so dass die Zehrung schon allein durch diesen Effekt leicht zunahm. Es sind nur qualitative Aussagen durch vergleichende Auswertung von Sauerstoffzehrungskurven mit und ohne Dosierung möglich.

Nach 240 h sowie nach 696 h führten Dosierungen von Glucose bzw. (+)-Valencen zu einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* weder in Puffer noch zu glucosefreiem Medium zu einer Erhöhung der Sauerstoffzehrung. Es wurde allerdings beobachtet, dass die Sauerstoffzehrung von *Chaetomium globosum* mit zunehmender Kultivierungsdauer stetig abnahm. Nach 696 h Kultivierung ohne Glucose war immer noch eine Aktivität in Form einer Sauerstoffzehrung nachzuweisen.

In einem anderen Ansatz nach 720 h Kultivierung in Puffer konnte ebenfalls beobachtet werden, dass eine Sauerstoffzehrung auftrat. Da höhere Pilze aufgrund ihrer reichhaltigen Enzymarsenals zum Abbau verschiedenster Stoffe befähigt sind (2.1.3.1), ist ein Metabolisierung von Citrat (aus dem Puffer) nicht auszuschließen. Demnach könnte die gemessene Sauerstoffzehrung auf der Metabolisierung von Citrat und/oder auf die Metabolisierung von Zellmaterial im Innern der Pellets beruhen. Die Werte der Sauerstoffzehrung zeigten, dass die Einflüsse von Glucose und (+)-Valencen auf *Chaetomium globosum* sehr stark von der sonstigen Versorgung und dem Wachstumszustand abhängig waren.

### Zwischenzusammenfassung 3.3.3:

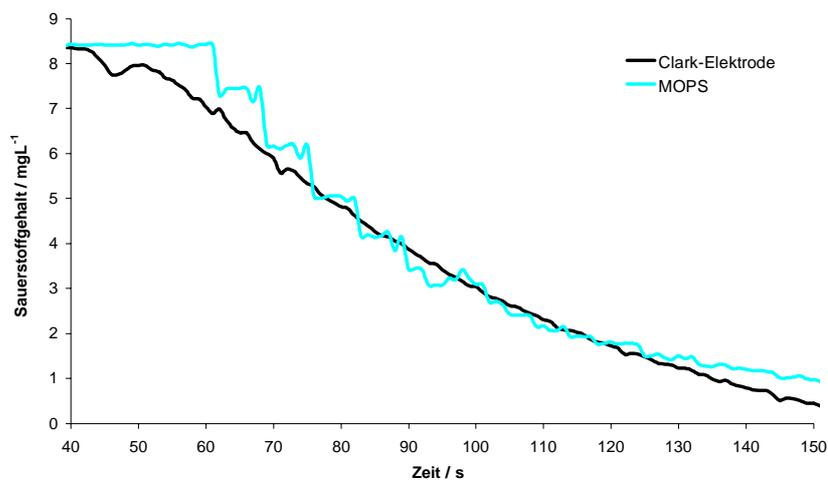
- Respirometrische Messungen eignen sich zur Aktivitätsmessung von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* in Gegenwart von (+)-Limonen und (+)-Valencen.
- Bei gleicher Pelletform und -größe zeigte sich ein proportionaler Zusammenhang zwischen Biomasse und Sauerstoffzehrung. Da nach Turraxen der Submerskultur diese Linearität nicht mehr gegeben war, wurden nur ungeturraxte Submerskulturen verwendet.
- Das Abtöten einer Submerskultur konnte am kompletten Erliegen der Sauerstoffzehrung schon nach wenigen Sekunden erkannt werden.

- Die Zugabe weiterer Substrate (Glucose, (+)-Valencen) resultierte in einer Änderung der Sauerstoffzehrung. Die Stärke der verursachten Reaktion hing stark vom Wachstumsverhalten der Kultur ab.

### 3.3.4 Charakteristik der Messungen mit der externen Sauerstoffoptode der Comte GmbH (MOPS)

#### 3.3.4.1 Messcharakteristik des MOPS

Die Messwerte des Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerätes und die des mikrocontrollergesteuerten optischen portablen Sauerstoffsensors (MOPS, 5.6.4) wurden unter Wechselbegasung miteinander verglichen (Abb. 5-6). Als Messlösung diente dest. Wasser, das in der offenen Zelle abwechselnd mit Stickstoff und Luft begast wurde. Die Signale der beiden Sensoren zeigten eine ähnliche Charakteristik (Abb. 3-15).



**Abb. 3-15 Vergleich der Messsignalcharakteristik einer Clark-Elektrode (Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät) mit der des MOPS unter Wechselbegasung mit Luft und Stickstoff**

Im Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät wurde die Sauerstoffzehrung von der Flüssigphase der Submerskulturen bestimmt, indem das Probenvolumen mit einem Stempel vom Luftsauerstoff abgetrennt wurde (5.6.2). Dies ermöglichte aussagekräftige Messungen, da auf diese Weise nur das Zehrungsvermögen des aktiven Mikroorganismus ohne Eindiffundieren von Sauerstoff aus der überstehenden Gasphase erfasst wird.

Da ein Aktivitätssensor auf Basis von respirometrischen Messungen im Bioreaktor anwendbar sein soll, und die Kulturbrühe im Bioreaktor aufgrund der Einbauten nicht vom Luftsauerstoff durch einen Stempel abgeschlossen werden kann, sollte geprüft werden, ob das Eindringen von Sauerstoff durch Überschichten mit einer sauerstoffundurchlässigen Phase verhindert werden kann. Oleylalkohol und Miglyol zeigten keine Beeinträchtigung der Aktivität von *Chaetomium globosum* (vgl. 3.3.12). Dazu wurden 5 mL-Proben von *Chaetomium globosum* in der Messzelle mit 1 mL Miglyol bzw. Oleylalkohol überschichtet und mit der Clark-Elektrode sowie dem MOPS vermessen. Als Vergleich wurde die gleiche Kultur vor der Überschichtung nach Abdichten mit dem Stempel vermessen. In Tab. 3-11 sind exemplarisch die Messwerte der mit Oleylalkohol überschichteten Kultur angegeben.

**Tab. 3-11 Messwerte der Sauerstoffzehrung bei Überschichtung mit Oleylalkohol vs Abdichten mit Stempel**

Abdichtungart	Sauerstoffzehrung $\mu\text{g(Ls)}^{-1}$
Stempel	33,9
Oleylalkohol (nach 5 min)	32,9
Oleylalkohol (nach 15 min)	32,4

Es zeigte sich, dass der Wert der Sauerstoffzehrung unter Überschichtung von Miglyol oder Oleylalkohol (Tab. 3-11) mit dem Messwert, der während der Abdichtung mit dem Stempel gemessen wurde, annähernd gleich ist. Nach 15 min war die Sauerstoffzehrung annähernd gleich, da sich *Chaetomium globosum* in seinem Aktivitätsverhalten nicht verändert hatte. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass ein Eindiffundieren von Luftsauerstoff in die Probe durch Überschichten mit Miglyol oder Oleylalkohol verhindert werden kann. In Gegenwart dieser Stoffe ist eine optische Sauerstoffmessung möglich, diese Stoffe beeinflussen die Messcharakteristik der Optode nicht.

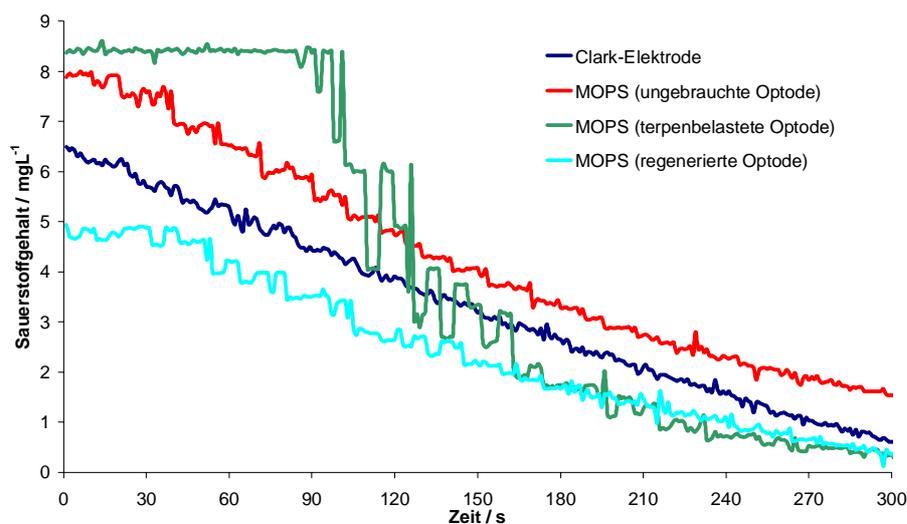
#### 3.3.4.2 Einfluss von (+)-Valencen auf die Messcharakteristik des MOPS

Um den Einfluss der Anwesenheit von (+)-Valencen auf die Optode zu untersuchen, wurde eine Messreihe mit einer 0,162 mM wässrigen Lösung von (+)-Valencen durchgeführt. Die während der Wechselbegasung durchgeführten Messungen zeigten, dass die Optode immer schwächer reagierte, bis schließlich kontinuierlich eine Sauerstoffsättigung angezeigt wurde. Bei Begasung mit Stickstoff lieferte die Optode ebenfalls keine Signale mehr. Während der

Messung legten sich Valencentröpfchen an die Optodenoberfläche an und bildeten einen Film. Nach der Messung war das Silikonmaterial (zur optischen Isolierung der Optode) so stark aufgequollen, dass diese nicht mehr durch das Zuführungsloch im Stempel der Messzelle passte. Bei Sauerstoffzehrungsmessungen in Gegenwart von (+)-Limonen zeigten sich die gleichen Phänomene. Wie sich aus den durchgeführten Messungen zeigte, ist der MOPS bei Anwesenheit von Terpenen nicht anwendbar.

Da das Messsystem augenscheinlich durch das Aufquellen der Silikonschicht beeinflusst worden ist, sollte geklärt werden, ob das Aufquellen reversibel ist und ob durch eine geeignete sauerstoffdurchlässige Beschichtung das Aufquellen verhindert werden kann. Es wurde versucht, die durch das Aufquellen des Silikons geschädigte Optode zu regenerieren, und somit die Ursache für das Ausfallen der Signale zu konkretisieren.

Bei diesem Versuch wurde eine ungebrauchte Optode mit der terpenbelasteten Optode verglichen. Als Referenz dienten die Messwerte des Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerätes. Die terpenbelastete Optode wurde 12 h in Ethanol (70%) gelagert, um die Terpene möglichst vollständig zu eluieren. Bei der anschließenden Messung der Sauerstoffzehrung wurde eine Kultur von *Chaetomium globosum* ohne Terpenzusatz verwendet. Da die zwölfstündige Lagerung der Optode in Ethanol (70%) keine signifikanten Auswirkungen zeigte, wurde die Elutionszeit verlängert. Die terpenbelastete Optode wurde 96 h in Ethanollösung (70%) eingelagert, wobei die Ethanollösung alle 24 h gewechselt wurde. Die Sauerstoffzehrungskurven der verschiedenen Sauerstoffsensoren sind in Abb. 3-16 dargestellt.



**Abb. 3-16** Vergleich der Messwerte der Clark-Elektrode (Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät) mit verschiedenen vorbehandelten Optoden (MOPS) bei der Messung der Sauerstoffzehrung einer Submerskultur von *Chaetomium globosum*

Für die Aktivitätsmessung ist die erste Ableitung der Sauerstoffzehrungskurve ausschlaggebend. Der Sauerstoffgehalt der Messlösung zu Beginn der Messung ist unerheblich. Die Steigung der Sauerstoffzehrung, die mit der terpenbeladenen Optode aufgenommen wurde, stimmte nicht mit der der Clark-Elektrode überein (Abb. 3-16). Die Sauerstoffzehrungen, die mit der Clark-Elektrode, mit der ungebrauchten und der regenerierten Optode gemessen wurden, waren ähnlich (gleiche Steigungen). Es konnte gezeigt werden, dass nach Elution der Terpene mit der Optode wieder identische Steigungswerte der Messkurve (im Vergleich zur Messkurve mit der Clark-Elektrode) erreicht werden konnten. Dies zeigte, dass der sauerstoffsensitive Indikator nicht durch irreversible chemische Reaktion mit Terpenen inaktiviert worden ist.

In Gegenwart von Terpenkohlenwasserstoffen quoll die Silikonmatrix auf, so dass keine Messungen durchgeführt werden konnten. Das Silikon besitzt eine gewisse Absorptionskapazität für Terpenkohlenwasserstoffe, dadurch verlor das Material seine mechanischen Eigenschaften und der Sauerstofftransport durch das Material könnte stark behindert gewesen sein. Regenerationsversuche zeigten, dass der Fluoreszenzindikator dabei jedoch nicht chemisch verändert wurde. Nachdem die Terpenkohlenwasserstoffe aus der Silikonmatrix entfernt wurden, waren wieder Messungen möglich.

#### 3.3.4.3 Beschichten des MOPS mit Teflon

Im Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät werden die Elektroden durch eine Teflonmembran von der Messflüssigkeit getrennt. Das Material Teflon ist hier sauerstoffdurchlässig, jedoch inert gegenüber organischen Lösungsmitteln. Durch Beschichten der Optode mit Teflon wurde versucht, das Aufquellen der Silikonschicht durch Terpene zu verhindern.

0,125 g Teflon AF 1600 wurden in 2,375 g Perfluorodecalin gegeben und 12 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und unter Rühren gelöst. In diese 5%ige Teflon-Lösung wurde die Optode eingetaucht und 30 min an Luft getrocknet. Die Optode wurde auf diese Weise dreimal mit einer dünnen Teflonschicht überzogen. Die präparierte Optode wurde anschließend bei respirometrischen Messungen von Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* in Gegenwart von (+)-Limonen und (+)-Valencen getestet.

Um zu überprüfen, ob der aufgebrauchte Teflonüberzug das Eindringen von Terpenen in die Silikonträgermatrix der Optode verhindern kann, wurden Sauerstoffzehrungen einer 48 h alten Kultur von *Pleurotus sapidus* mit wechselnden Konzentrationen an (+)-Limonen und (+)-Valencen mit der teflonbeschichteten Optode aufgenommen. Eine Verfälschung der Messwerte

in Anwesenheit von Terpenen trat hierbei später ein als bei der Optode ohne Teflonbeschichtung. Nach ca. 2 h Messzeit in Anwesenheit von Terpenen lieferte die Optode keine Messsignale mehr. Da die Beschichtung nicht flächendeckend aufgebracht werden konnte, fand immer noch eine deutliche, wenn auch wesentlich langsamere Quellung der Silikonbeschichtung als bei der unbehandelten Optode statt.

Mit einer teflonbeschichteten Optode lassen sich aber deutlich mehr Messungen durchführen als mit der unbeschichteten, jedoch mit verlängerter Ansprechzeit (Vergrößerung der Diffusionsschicht). Dies hat aber keine Auswirkungen auf die Anwendbarkeit des Sensors für die Aktivitätsmessung, da nur die Steigungen der gemessenen Kurven ausschlaggebend sind. Die schützende Teflonschicht konnte bedingt durch das Herstellungsverfahren nicht deckend aufgebracht werden, so dass Sensoren gesucht wurden, bei denen das Teflon direkt im Herstellungsprozess der Optode auf die Silikonmatrix aufgebracht wird.

#### Zwischenzusammenfassung 3.3.4:

- Der MOPS zeigte eine dem Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät ähnliche Signalcharakteristik. Bei geringeren Sauerstoffgehalten reagierte er empfindlicher als die konventionelle Clark-Elektrode, welches jedoch für die Durchführung und Auswertung der Sauerstoffzehrung unerheblich ist.
- Durch Übersichten der Messlösung mit Miglyol oder Oleylalkohol konnte das Eindringen von Sauerstoff, welches die Sauerstoffzehrung verfälschen würde, ebenso ausreichend verhindert werden wie durch Abdichten mit einem Stempel.
- Bei Anwesenheit von Terpenen war der MOPS nicht anwendbar, da die Silikonträgermatrix für den sauerstoffsensitiven Farbstoff stark aufquoll.

### 3.3.5 Charakteristik der Messungen mit der internen Sauerstoffoptode der Presens GmbH

#### 3.3.5.1 Auswahl der Beschichtung der sauerstoffsensitiven Folien der Presens GmbH

Im Bioreaktor wurde eine *in situ*-Bestimmung der Aktivität ohne Probenahme angestrebt, welche einen Verlust an Submerskultur verhindert, und gleichzeitig den Zustand des gesamten Organismus (Submerskultur und eventuelles Gasphasenmyzel s. 3.4 und 3.5) wiedergeben kann. Die Probenahme von Submerskulturen war aufgrund der Pelletbildung äußerst schwierig. Bei unterschiedlichen Pelletgrößen, z.B. sehr großen Pellets (Durchmesser bis zu 1 cm) war eine repräsentative Probenahme nicht mehr möglich. Der Versuch, das Probenvolumen gering zu halten, scheitert an der Größe der Pellets. Bei einer *in situ*-Messung der Sauerstoffzehrung werden alle aktiven Zellen im Bioreaktor erfasst.

Die Presens GmbH vertreibt optische Sauerstoffsensoren mit verschiedenen Beschichtungen, mit denen die Sauerstoffgehaltsmessungen direkt in der Kulturbrühe über einen optischen Sensor möglich sind. Da höhere Pilze eine ausgeprägte Neigung zum Aufwachsen auf rauhen und glatten Oberflächen haben, und das Myzel sogar in Kunststoff einwachsen kann, wurde zunächst das Aufwachsverhalten von *Chaetomium globosum* auf Sensoroberflächen untersucht.

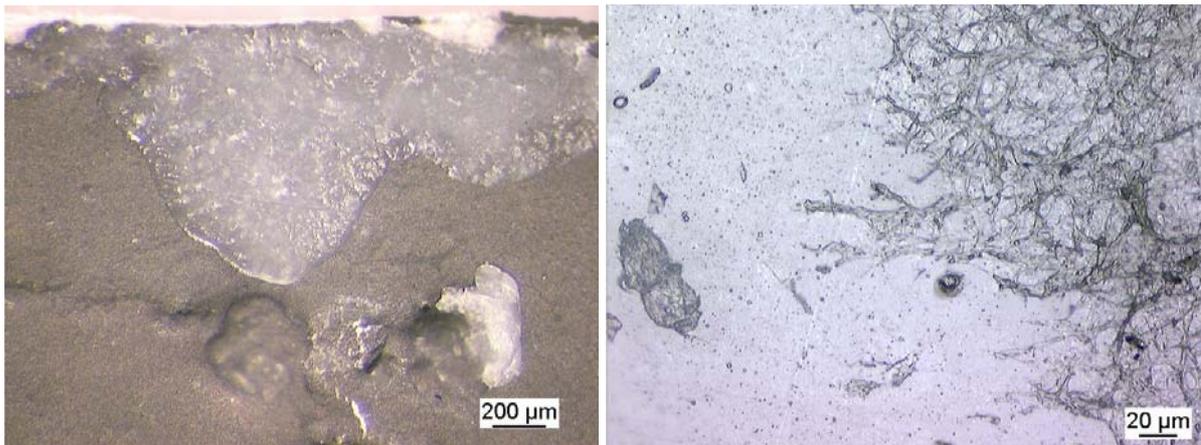
Um das Aufwachsen von *Chaetomium globosum* auf mit Teflon beschichteten und unbeschichteten Optoden zu analysieren, wurden vier sauerstoffsensitive Folien der Presens GmbH mit verschiedenen Beschichtungen in Submerskulturen von *Chaetomium globosum* gegeben. Es wurden die in Tab. 3-12 angegebenen Folien verwendet.

**Tab. 3-12 Sauerstoffsensitive Folien der Presens GmbH, die mit *Chaetomium globosum* auf Aufwachsen getestet wurden**

Nr.	Bezeichnung	Oberfläche
1	SF-PSt3-PSUP-YOP-L1/W1	Silikon
2	SF-PSt3-PSUP-YOP-L1/W1	Teflon, schwarz
3	SF-GSUP-TAF-L1/W1	Teflon, transparent
4	SF-PSUP-TAF-L1/W1	Teflon, transparent

Die Folien wurden vor der Aufbewahrung in Submerskulturen von *Chaetomium globosum* mikroskopisch betrachtet und fotografiert. Es waren leichte Inhomogenitäten in der Beschichtung sichtbar, die auf den Herstellungsprozess der Folien zurückzuführen sind. Die

Folien wurden in 50 mL-Kulturen bei 25°C und 150 rpm 216 h aufbewahrt. Nach 216 h wurden die Folien herausgenommen und mit dest. Wasser und Ethanol (70%) abgespült. Danach wurden die Beschichtungen erneut mit der Stereolupe und dem Auflichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Bei Folie 1 (Tab. 3-12) konnte kein Aufwachsen von *Chaetomium globosum* und keine sichtbaren Veränderungen auf der Oberfläche festgestellt werden. Demgegenüber konnten bei den anderen Folien Aufwachsen und Einwachsen von *Chaetomium globosum* beobachtet werden (Abb. 3-17).



**Abb. 3-17** Aufwachsen von *Chaetomium globosum* auf Folie 2 (links, Tab. 3-12) und Einwachsen von *Chaetomium globosum* in Folie 4 (rechts, Tab. 3-12)

Bei den Silikon- und Teflonbeschichtungen ist der Grad der Vernetzung und somit die Härte extrem von der Struktur und der Verarbeitungsart abhängig (Duroplast oder Elastoplast). Die Teflonbeschichtung auf der Optode bewirkt eine andere Schutzfunktion wie z.B. harte Teflonbeschichtungen, wie sie bei Pfannen eingesetzt werden. Die Beständigkeit und Struktur von Silikonbeschichtungen ist nicht nur von der Zusammensetzung, sondern auch von der Art der Aufbringung abhängig. Die Silikonbeschichtung der sauerstoffsensitiven Folien zeigte eine größere Resistenz gegenüber Pilzbewuchs. Folie 1 (Tab. 3-12) wurde für weitere Versuche ausgewählt, sie wird in dieser Arbeit mit „sauerstoffsensitive Folie“ bezeichnet.

#### 3.3.5.2 Messung der Sauerstoffzehrung in Schüttelkolben mit sauerstoffsensitiven Folien

Es wurden Schüttelkolben-Versuche mit den sauerstoffsensitiven Folien durchgeführt. Von *Pleurotus sapidus* wurde eine und von *Chaetomium globosum* zwei Kulturen zu 150 mL in einem Schüttelkolben mit Schraubdeckel (GL 32) angesetzt und bei 25°C, 150 rpm kultiviert (Stopfen ¼ Umdrehung aufgedreht). Über die eingeklebte sauerstoffsensitive Folie wurde von außen der Sauerstoffgehalt gemessen (5.6.5). Zur Zehrungsmessung wurde der Kolben unter der Sterilwerkbank belüftet und luftdicht mit dem Schraubdeckel verschlossen.

**Tab. 3-13** Glucosegehalte in den Schüttelkolben

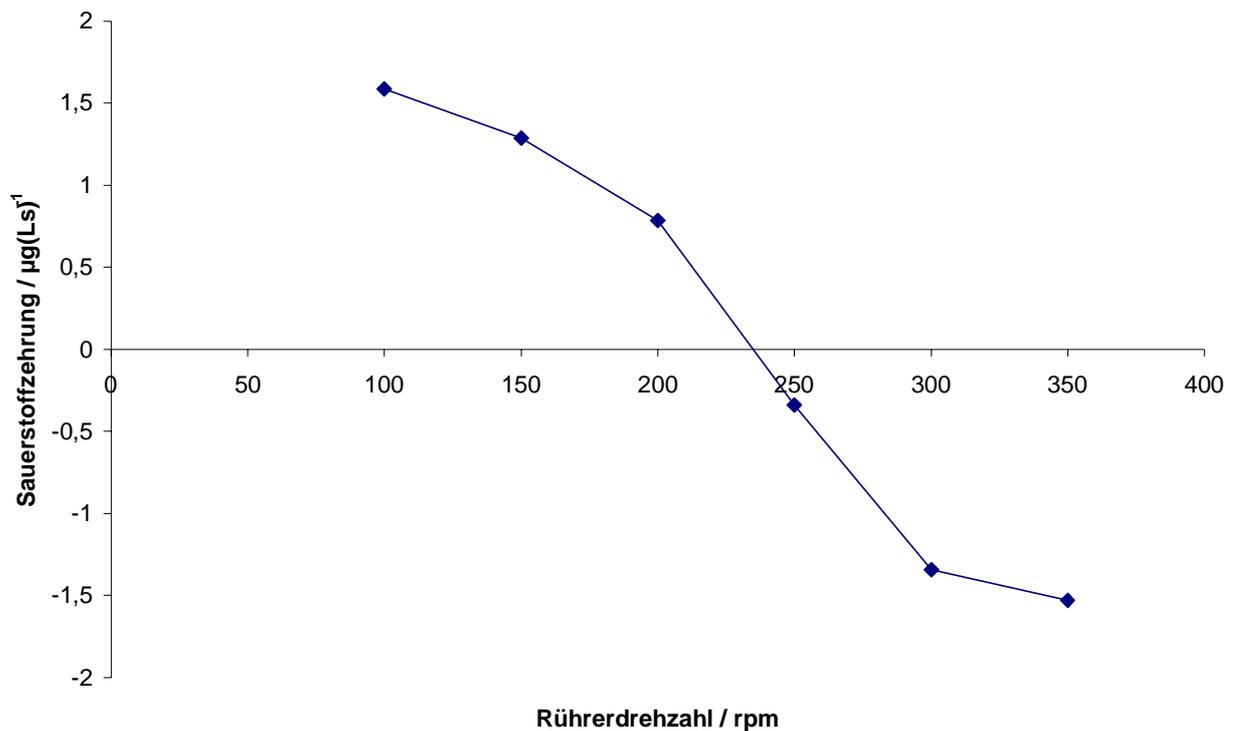
Zeit h	Glucosegehalt gL <sup>-1</sup>		
	<i>Pleurotus sapidus</i>	<i>Chaetomium globosum</i> 1	<i>Chaetomium globosum</i> 2
0	30,9	30,9	30,9
24	29,73	29,37	27,36
48	28,17	19,9	20,1
72	28,14	18,4	17,8
96	26,8	19,5	17,8

Obwohl eine Abnahme des Glucosegehaltes (Tab. 3-13) und eine Zunahme der Biotrockenmasse zu beobachten waren, blieb der Sauerstoffgehalt in den Kolben konstant, teilweise kam es zu einem Anstieg des Sauerstoffgehaltes während der Messung. Dies kann durch einen Sauerstoffeintrag über die Gasphase, der höher als der Sauerstoffverbrauch der Mikroorganismen war, bedingt sein. *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* vermochten nicht viel Sauerstoff vom Gesamtsystem aus Submerskultur und überstehendem Gasraum zu zehren. Bei homogener Durchmischung konnte keine Sauerstoffzehrung gemessen werden. Ein möglicher Grund für dieses Resultat ist, dass das Zehrungsvermögen im Schüttelkolben nicht ohne eine geeignete Abtrennung der Gasphase von der Submerskultur gemessen werden konnte.

#### 3.3.5.3 Messung der Sauerstoffzehrung in Spinnerflasks und im Bioreaktor mit sauerstoffsensitiven Folien

Der Sauerstoffeintrag in die flüssige Phase ist von der Bewegung der Flüssigkeitsoberfläche, also von der Rührerdrehzahl abhängig. Im folgenden Versuch wurde die Abhängigkeit der Sauerstoffzehrung von der Rührerdrehzahl mit und ohne Miglyolüberschichtung untersucht.

In einer Spinnerflask mit 450 mL Submerskultur von *Pleurotus sapidus* wurden nach 48 h Kultivierung mit 100 rpm bei 25°C Sauerstoffzehrungskurven in Abhängigkeit der Rührerdrehzahl aufgenommen.



**Abb. 3-18** Abhängigkeit der Sauerstoffzehrung einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* von der Rührerdrehzahl, aufgenommen in einer Spinnerflask

Bei positiven Werten handelt es sich um einen Verbrauch an Sauerstoff vom Organismus (vgl. 3.3.2), der höher ist als der Sauerstoffeintrag durch die Rührung. Bei negativen Werten diffundierte mehr Sauerstoff in die flüssige Phase als von *Pleurotus sapidus* verbraucht wurde, das Sauerstoff-Zehrungsvermögen von *Pleurotus sapidus* wurde von der Nachdiffusion von Sauerstoff aus der Gasphase überdeckt. Es konnte demnach festgestellt werden, dass die Sauerstoffzehrung von *Pleurotus sapidus* durch den Eintrag von Sauerstoff mit steigender Rührerdrehzahl beeinflusst wurde (Abb. 3-18).

Anschließend wurde untersucht, ob diese Abhängigkeit im Falle einer Miglyolüberschichtung gegeben ist (vgl. 3.3.4.1). Um das Verhalten der sauerstoffsensitiven Folie in Anwesenheit von Miglyol zu untersuchen, wurden vorerst Messungen in Medium und Miglyol ohne Mikroorganismen durchgeführt. Die beiden Spinnerflasks wurden mit 400 mL Medium und 100 mL Miglyol befüllt und auf Sauerstoffeintrag, Reaktion der sauerstoffsensitiven Folie auf Wechselbegasung, Ausbluten des sauerstoffsensitiven Indikators und Messignalkontinuität getestet. Das Ansprechverhalten der Optode der Presens GmbH wurde nicht von der Anwesenheit von Miglyol beeinflusst. Es konnten keine Unregelmäßigkeiten der Messung im Vergleich zu den Messungen ohne Miglyol festgestellt werden, so dass nach 24 h jede Spinnerflask mit *Chaetomium globosum* angeimpft wurde (Animpfverhältnis 5%).

Diese Submerskultur von *Chaetomium globosum* wurde mit 200 rpm, 25°C und einer Belüftungsrate von 0,13 vvm kultiviert. Um den Sauerstoffeintrag mit Miglyolüberschichtung zu analysieren, wurde die Sauerstoffzehrung in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl aufgenommen (Tab. 3-14).

**Tab. 3-14**    **Abhängigkeit der Sauerstoffzehrung von der Rührerdrehzahl bei Miglyolüberschichtung (Spinnerflask-Kultivierung von *Chaetomium globosum*)**

<b>Rührerdrehzahl Sauerstoffzehrung</b>	
<b>rpm</b>	<b>µg(Ls)<sup>-1</sup></b>
100	5,72
150	5,73
200	4,99
250	4,87
300	3,51

Je höher die Rührerdrehzahl war, desto niedriger war die gemessene Sauerstoffzehrung der Kultur. Es zeigte sich, dass die Sauerstoffzehrung deutlich geringer schwankte als im vorherigen Versuch ohne Miglyolüberschichtung. In keinem Fall konnte ein Sauerstoffeintrag gemessen werden, sondern nur Abnahmen des Sauerstoffgehaltes im Medium, also positive Sauerstoffzehrungen. Folglich kann das Eindiffundieren von Sauerstoff durch Miglyol erfolgreich verhindert werden. Weitergehende Untersuchungen bei Überschichtungen der Submerskulturen mit n-Decan zeigten, dass in diesem Falle ebenfalls Sauerstoffzehrungsmessungen möglich waren. Die Messcharakteristik der Optoden der Presens GmbH wurde durch Anwesenheit von n-Decan nicht beeinflusst.

In den Bioreaktoren wurde die Clark-Elektrode nach ca. 100 h Kultivierungsdauer mit Myzel bewachsen, so dass keine Messungen mehr durchgeführt werden konnten. Bei einer Kultivierung von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor wurde der Sauerstoffgehalt über eine mit Silikon eingeklebte sauerstoffsensitive Folie gemessen und mit den Werten der Clark-Elektrode im Bioreaktor verglichen. Diese Messungen wurden durchgeführt, solange die Clark-Elektrode noch nicht bewachsen war. Es fand keine Kalibrierung der Optode im Bioreaktor mit Medium statt, sondern es wurde die Kalibrierung von den Spinnerflask übernommen.

**Tab. 3-15 Messwerte der internen Clark-Elektrode und dem internen optisch sensitiven Sauerstoffsensoren im Bioreaktor**

Zeit h	Sauerstoffgehalt	
	Clark-Elektrode	Optode
0	99,5	95,3
25	83	80,9
48	20	16,2
96	49	41,5

Die Sauerstoffgehalte zeigten eine lineare Korrelation. Die aufgetretenen geringen Abweichungen im Vergleich der Messsysteme liegen innerhalb der Messgenauigkeit der Systeme.

#### Zwischenzusammenfassung 3.3.5:

- Die sauerstoffsensitive Folie (SF-PS<sub>t</sub>3-PSUP-YOP mit Silikonbeschichtung) der Presens GmbH war für Sauerstoffzehrungsmessungen bei längeren Kultivierungen mit *Chaetomium globosum* geeignet.
- Sauerstoffzehrungsmessungen mit Optoden im Schüttelkolben waren nicht möglich, da der Sauerstoffeintrag durch die Schüttelbewegung die Sauerstoffzehrung überdeckte.
- Bei den Spinnerflask-Kultivierungen sollte das Kultivierungsmedium überschichtet werden (z.B. mit Miglyol oder n-Decan), um ein Eintrag von Sauerstoff durch Rühren zu verhindern.
- Die interne Sauerstoffoptode und die interne Clark-Elektrode lieferten vergleichbare Messwerte.

#### **3.3.6 Bemerkungen zu den Sauerstoffzehrungsmessungen**

Untersuchungen des Sauerstoffpartialdrucks in Geweben mit optischen und polarographischen Sensoren zeigten, dass beide Messwerte eine lineare Korrelation ( $r^2=0,99$ ) zeigten (Shaw et al. 2002). Bei den Messungen der Sauerstoffzehrung mit den Clark-Elektroden und den Optoden zur Aktivitätsmessung höherer Pilze wurde beobachtet, dass diese gleichermaßen geeignet sind. Probleme hinsichtlich der Verwendbarkeit der Sensoren ergaben sich durch die verwendeten Materialien, z.B. Absorption von Terpenen oder Bewuchs mit Pilzmyzel.

Ein konstruktiver Vorteil des Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerätes gegenüber der Clark-Elektrode im Bioreaktor besteht darin, dass direkt über der Elektrode der Rührmagnet (ca. 1 mm über der Teflonmembran) für eine Durchmischung des Messzelleninhaltes sorgte. Somit konnte ein Aufwachsen des Myzels verhindert werden. Durch die Scherbeanspruchung durch den Rührer während der Messung wurden labile Pellets zerschlagen. Insbesondere beim Einsatz von Lösungsmitteln (3.3.12) oder in Anwesenheit großer Mengen an Terpenkohlenwasserstoffen kam es zu einem Zerfall der Pellets, da die Zellmembranen durch Aufquellen mit lipophilen Stoffen ihre Stabilität und Schutzfunktion verloren hatten. Dies führte dazu, dass sich die Myzeloberfläche aufgrund der Zerteilung der Pellets erhöhte. Folglich stieg der Wert der Sauerstoffzehrung, da die Zellen aus dem Inneren der Pellets durch Kontakt mit Medium (Substrat) zum Teil wieder aktiv werden konnten. Dies wurde durch Messungen bestätigt, welche einen Anstieg der Sauerstoffzehrung erkennen ließen.

Die Sauerstoffzehrung von Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* oder *Chaetomium globosum* kann mit dem Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät und mit Optoden jeweils über respirometrische Messungen hinreichend genau bestimmt werden. Insbesondere die Unabhängigkeit der Messung von der Gestalt und Wachstumsform des Myzels erlaubt aktivitätsbezogene Aussagen. Diese können als Anhaltspunkte für Dosierungen von Terpenkohlenwasserstoffen dienen, wenn über den gesamten Kultivierungsverlauf die Aktivität hinreichend oft bestimmt wurde. Die Sauerstoffzehrung muss immer in Relation zum vorherigen Zustand der Kultivierung gesehen werden. Für eine Regelung der Substratdosierung ist die Veränderung der Sauerstoffzehrung maßgebend.

### **3.3.7 Allgemeines zu den Aktivitätsmessungen von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum***

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Dosierungen von (+)-Limonen und (+)-Valencen auf die Aktivität von *Pleurotus sapidus* bzw. *Chaetomium globosum* kurz- und langfristig untersucht. Die kurzfristigen Aktivitätsänderungen beziehen sich auf eine Einwirkzeit von 2 min, während die langfristigen Auswirkungen nach einer Einwirkzeit von 24 h und länger gemessen wurden. Ziel dieser Versuche war es, insbesondere die Dosisabhängigkeit, die Abhängigkeit der Einwirkzeit und den Einfluss des Alters der Kultur anhand von Veränderungen der Sauerstoffzehrung zu untersuchen. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die langfristige Wirkung von (+)-Limonen auf *Pleurotus sapidus* und von (+)-Valencen auf *Chaetomium globosum* gelegt, da diese beiden Organismen Biotransformationen mit ökonomischen Potential durchführen können. Die Aktivitätsstudien

wurden über die Messung der Sauerstoffzehrung extern im Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät von Rank Brothers Ltd durchgeführt. Auf diese Weise konnten die Mengen an Submerskultur in einem überschaubaren Rahmen gehalten werden und mehrere Proben aus einem Schüttelkolben gezogen werden. Die gemachten Angaben von Zugaben an Terpenkohlenwasserstoffen sind in Konzentrationserhöhungen erfolgt (Definition s. 5.4.2).

Auf eine Untersuchung der Produkttoxizität wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da sie für die untersuchten Biotransformationen eine untergeordnete Rolle spielt. Die Produkte kommen in weitaus geringeren Konzentrationen im Kulturmedium vor, und ihre Löslichkeit in fungalen Membransystemen ist aufgrund der höheren Polarität deutlich geringer (vgl. Onken 1998).

### **3.3.8 Aktivitätsmessung von *Pleurotus sapidus* in Gegenwart von (+)-Limonen**

Um die Wirkung verschiedener Konzentrationen von (+)-Limonen auf *Pleurotus sapidus* zu bestimmen, wurden Sauerstoffzehrungen einer 48 h alten Kultur von *Pleurotus sapidus* (Animpfverhältnis 10%) mit steigenden Konzentrationen an (+)-Limonen (0, 6, 12, 24, 60 und 120 mM) aufgenommen. Die Sauerstoffzehrungen (ca.  $13,2 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$ ) unterschieden sich nicht voneinander, ein Einfluss von (+)-Limonen war nach einer kurzen Einwirkzeit nicht erkennbar. *Pleurotus sapidus* besitzt einen sehr langsamen und geringen Stoffwechsel im Vergleich zu anderen höheren Pilzen. Im folgenden Versuch wurde ebenfalls eine 48 h alte Kultur von *Pleurotus sapidus* verwendet, die höher angeimpft wurde (Animpfverhältnis 20%), damit nach 48 h mehr Myzel vorhanden war (Gehalt an Biotrockenmasse  $11,48 \text{ gL}^{-1}$ ). Von dieser 48 h alten Kultur wurden ebenfalls Sauerstoffzehrungen mit steigenden Konzentrationen an (+)-Limonen aufgenommen. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Sauerstoffzehrung bei höheren Konzentrationen an (+)-Limonen (Tab. 3-16).

**Tab. 3-16 Sauerstoffzehrung einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* nach 48 h unter Zugabe steigender Mengen an (+)-Limonen**

(+)-Limonen-Konzentration mM	Sauerstoffzehrung $\mu\text{g(Ls)}^{-1}$
0	7,6
12	6,9
24	6,8
60	5,4
120	4,8

Durch Erhöhen der Konzentration an (+)-Limonen um 120 mM (5.4.2) war die Sauerstoffzehrung von *Pleurotus sapidus* von  $7,6 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$  auf  $4,8 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$  abgesunken.

Ob dieser Effekt einer abnehmenden Sauerstoffzehrung bei noch höheren Konzentrationen an (+)-Limonen stärker ist, sollte in einem Versuch überprüft werden, in dem Konzentrationserhöhungen bis 240 mM angewendet wurden. Dazu wurde eine 72 h alte Submerskultur von *Pleurotus sapidus* mit steigenden Konzentrationen an (+)-Limonen versetzt und Sauerstoffzehrungen aufgenommen. Es zeigte sich, dass eine weitere Abnahme der Sauerstoffzehrung nicht zu beobachten war. Die Sauerstoffzehrung betrug jeweils  $4,8 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$ . Bei einer 336 h alten Submerskultur von *Pleurotus sapidus* hatte eine Konzentrationserhöhung an (+)-Limonen (bis 120 mM) keinen Einfluss auf die Aktivität von *Pleurotus sapidus*. Die Sauerstoffzehrung betrug hier etwa  $3,7 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$ .

Obwohl (+)-Limonen kurzfristig keine starken Aktivitätsveränderungen von *Pleurotus sapidus* bewirkt (bis 120 mM), kommt es langfristig gesehen zu einer kompletten Inaktivierung. Ein Grund hierfür könnte die Kinetik der Terpenkohlenwasserstoff-Aufnahme in die fungalen Membranen sein. Die Konzentrationsschwelle, bei der die Dosierungen inaktivierend wirken, ist in großem Ausmaß vom Gehalt an Membranen, also von der Pelletform und -größe, abhängig. Eine inaktivierende Konzentrationsschwelle lässt sich somit allgemein nicht angeben. Da für die Biotransformationen jedoch nur längere Anwendungszeiten in Frage kommen, wurde auf weitere Untersuchungen zur Kinetik oder Zeitabhängigkeit der kurzzeitigen Inhibierung von *Pleurotus sapidus* durch (+)-Limonen verzichtet.

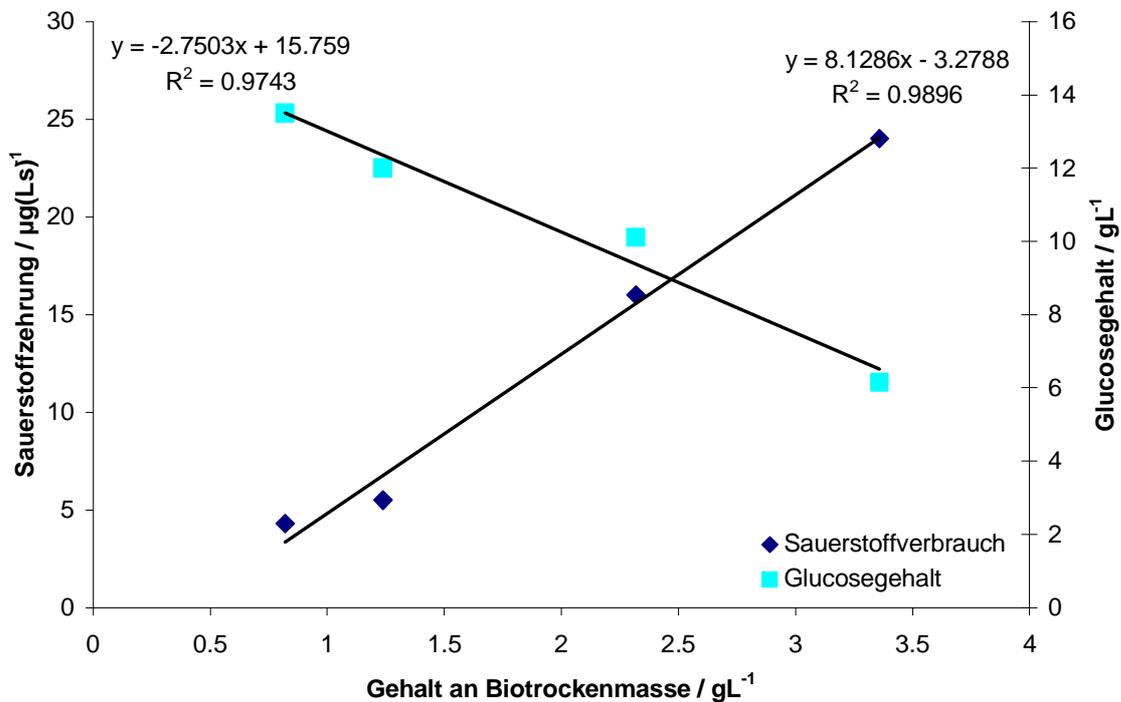
Zusätzlich sollten die Auswirkungen einer kontinuierlichen Zugabe von (+)-Limonen zu einer Submerskultur von *Pleurotus sapidus* über mehrere Tage, wie sie bei Transformationsprozessen üblich sind, untersucht werden. Eine 24 h alte 100 mL Kultur von *Pleurotus sapidus* wurde täglich mit (+)-Limonen (6 mM) versetzt und nach weiteren 24 h

wurde jeweils vor der Zugabe von (+)-Limonen von beiden Kulturen (mit und ohne (+)-Limonen) die Sauerstoffzehrung bestimmt. Um bei höheren Biomassen ein ausreichendes Vermischen zu gewährleisten, wurde während des ganzen Versuches der Messzelleninhalt stärker gerührt. Nach der Messung wurden der Glucosegehalt und der Gehalt an Biotrockenmasse aus dem Messzelleninhalt bestimmt. Aus den ermittelten Steigungen ergaben sich Sauerstoffzehrungen, die mit den ermittelten Gehalten an Biotrockenmasse und den Glucosegehalten in Tab. 3-17 zusammengefasst sind (die Zeitangaben beziehen sich auf die erste Zugabe von (+)-Limonen).

**Tab. 3-17 Sauerstoffzehrung, Gehalte an Biotrockenmasse und Glucosegehalte der Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit und ohne (+)-Limonen**

Zeit h	Ohne Zugabe von (+)-Limonen			Mit Zugabe von (+)-Limonen		
	Gehalt an Biotrockenmasse gL <sup>-1</sup>	Sauerstoff- zehrung μg(Ls) <sup>-1</sup>	Glucose- gehalt gL <sup>-1</sup>	Gehalt an Biotrockenmasse gL <sup>-1</sup>	Sauerstoff- zehrung μg(Ls) <sup>-1</sup>	Glucose- gehalt gL <sup>-1</sup>
24	0,82	4,3	13,5	1,20	0,5	14,5
48	1,24	5,5	12	1,22	1,6	14,5
72	2,32	16	10,1	1,22	2,4	14,1
96	3,36	24	6,15	1,22	0,8	14,1

Ohne Zugabe von (+)-Limonen ergab sich folgende Wachstumskinetik (Abb. 3-19):



**Abb. 3-19 Graphische Auftragung der Sauerstoffzehrung und der Glucosegehalte während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* ohne (+)-Limonen-Dosierung**

Im Falle der täglichen Zugabe von (+)-Limonen (6 mM) war weder eine Abnahme des Glucosegehaltes noch eine Zunahme der Biotrockenmasse zu verzeichnen. Die Sauerstoffzehrung kam fast komplett zum Erliegen. Die Clark-Elektrode besitzt einen Eigenverbrauch von ca.  $0,005 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$ . Ein weiterer Versuch zur Bestimmung der Aktivitätsveränderung von *Pleurotus sapidus* wurde unter gleichen Bedingungen mit einer 120 h alten Submerskultur durchgeführt.

Aus den ermittelten Steigungen ergaben sich Sauerstoffverbrauchsraten, die mit den ermittelten Biotrockenmassen und dem Glucosegehalt in folgender Tabelle zusammengefasst sind.

**Tab. 3-18 Sauerstoffzehrung, Gehalt an Biotrockenmasse und Glucosegehalte der Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit und ohne (+)-Limonen**

Zeit h	Ohne Zugabe von (+)-Limonen			Mit Zugabe von (+)-Limonen		
	Gehalt an Biotrockenmasse gL <sup>-1</sup>	Sauerstoff- zehrung μg(Ls) <sup>-1</sup>	Glucose- gehalt gL <sup>-1</sup>	Gehalt an Biotrockenmasse gL <sup>-1</sup>	Sauerstoff- zehrung μg(Ls) <sup>-1</sup>	Glucose- gehalt gL <sup>-1</sup>
24	1,56	8,2	24	0,34	0,3	22,6
48	1,60	5,6	23	0,06	0,6	24,3
72	2,80	5,7	21,5	0,42	0,006	24,2
96	3,26	8,6	19,1	0,28	0,03	22,7

Hier zeigte sich, dass die Kultur von *Pleurotus sapidus* nur noch langsam wuchs. Die Submerskultur ohne Dosierung wuchs nicht so schnell wie im Versuch ohne (+)-Limonen-Zugabe. Die Gehalte an Glucose nahmen während der Kultivierung zwar ab, aber deutlich schwächer als bei jüngeren Kulturen. Ein Einfluss von (+)-Limonen auf ältere Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* (120 h alt) war ebenfalls zu beobachten. Obwohl *Pleurotus sapidus* in diesem Falle keine starke Zunahme der Biotrockenmasse bzw. kein Glucoseverbrauch zeigte, konnte über die Sauerstoffzehrung eine aussagekräftige Aktivitätsmessung durchgeführt werden.

Wurde die Dosierung von (+)-Limonen eingestellt, wuchsen die Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* nach ca. 48 h wieder weiter. Eine Dosierung von (+)-Limonen auf das Wachstum von *Pleurotus sapidus* wirkte somit nur fungistatisch (inaktivierend). Eine komplette Abtötung der Kulturen konnte nicht beobachtet werden.

#### Zwischenzusammenfassung 3.3.8:

- Bei Zugabe von (+)-Limonen zu *Pleurotus sapidus* zeigte sich kurzfristig eine Abnahme der Sauerstoffzehrung mit steigenden Konzentrationen an (+)-Limonen (bis 240 mM), dabei kam die Sauerstoffzehrung jedoch nicht komplett zum Erliegen.
- Bei einer täglichen Zugabe von (+)-Limonen (6 mM) zeigte *Pleurotus sapidus* keine messbare Sauerstoffzehrung, keinen Glucoseverbrauch und keine Zunahme der Biomasse (Inaktivierung von *Pleurotus sapidus*).

### 3.3.9 Aktivitätsmessung von *Pleurotus sapidus* in Gegenwart von (+)-Valencen

Der Einfluss von (+)-Valencen auf *Pleurotus sapidus* sollte ebenfalls kurz- und langfristig mit Respirometrie untersucht werden.

Eine 48 h alte Kultur von *Pleurotus sapidus* (Animpfverhältnis 10%) wurde mit steigenden Konzentrationen an Valencen (0, 4, 8, 16, 40, 80 mM) versetzt und Sauerstoffzehrungen aufgenommen. (+)-Valencen hat kurzfristig keinen aktivitätsvermindernden Effekt auf *Pleurotus sapidus*, die Sauerstoffzehrung (ca.  $2,6 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$  bei ca.  $5,1 \text{ gL}^{-1}$  Biotrockenmasse) änderte sich nicht durch Zugabe von (+)-Valencen (bis 80 mM).

Die gleiche Untersuchung wurde nochmal mit einer 48 h alten Kultur, die jedoch höher angeimpft war (Animpfverhältnis 20%), durchgeführt. Die Kultur von *Pleurotus sapidus* wurde nach 48 h mit wechselnden Konzentrationen (0, 4, 8, 16, 40, 80 mM (+)-Valencen im Respirometer vermessen. Es zeigte sich, dass die Sauerstoffzehrung aufgrund der insgesamt höheren Biotrockenmasse (ca.  $10,5 \text{ gL}^{-1}$ ) stärker war, ein Einfluss der Zugabe von (+)-Valencen in Konzentrationen bis zu 80 mM konnte hier nicht nachgewiesen werden. Der Wert der Sauerstoffzehrung blieb gleich.

Bei einer 72 h alten und einer 336 h alten Submerskultur von *Pleurotus sapidus* zeigten sich nach Zugabe von (+)-Valencen (bis 80 mM) keine Auswirkungen auf die Sauerstoffzehrung. (+)-Valencen zeigt kurzfristig keine Wirkung auf 48 bis 336 h alte Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* (bis 80 mM). Die Werte der Sauerstoffzehrungen blieben unverändert. Obwohl (+)-Valencen nicht akut aktivitätsvermindernd auf *Pleurotus sapidus* wirkt, sollte die langfristige Wirkung von (+)-Valencen auf *Pleurotus sapidus* untersucht werden. Zwei 24 h alte Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* (Gehalt an Biotrockenmasse ca.  $4 \text{ gL}^{-1}$ ) wurden täglich mit Valencen (4 mM) versetzt. Die Kultur zeigte ein eingeschränktes Wachstum, der Glucosegehalt (ca.  $29 \text{ gL}^{-1}$ ), sowie der Gehalt an Biotrockenmasse änderten sich kaum. Ein Einfluss der täglichen (+)-Valencen-Zugabe auf die Wachstumskinetik von *Pleurotus sapidus* war nachweisbar.

**Tab. 3-19 Sauerstoffzehrung von *Pleurotus sapidus* mit und ohne (+)-Valencen**  
**Ohne Zugabe von (+)-Valencen Mit Zugabe von (+)-Valencen**

Zeit h	Sauerstoffzehrung $\mu\text{g(Ls)}^{-1}$	
	Ohne Zugabe von (+)-Valencen	Mit Zugabe von (+)-Valencen
24	7,6	1,5
48	7,6	1,4
72	6,3	5,7
96	7,4	7,4

(+)-Valencen zeigt im Gegensatz zu (+)-Limonen einen schwächeren aktivitätshemmenden Effekt auf *Pleurotus sapidus*. *Pleurotus sapidus* wurde durch (+)-Valencen inhibiert, danach trat eine Adaption ein, so dass die Sauerstoffzehrungen nach 72 h wieder anstiegen.

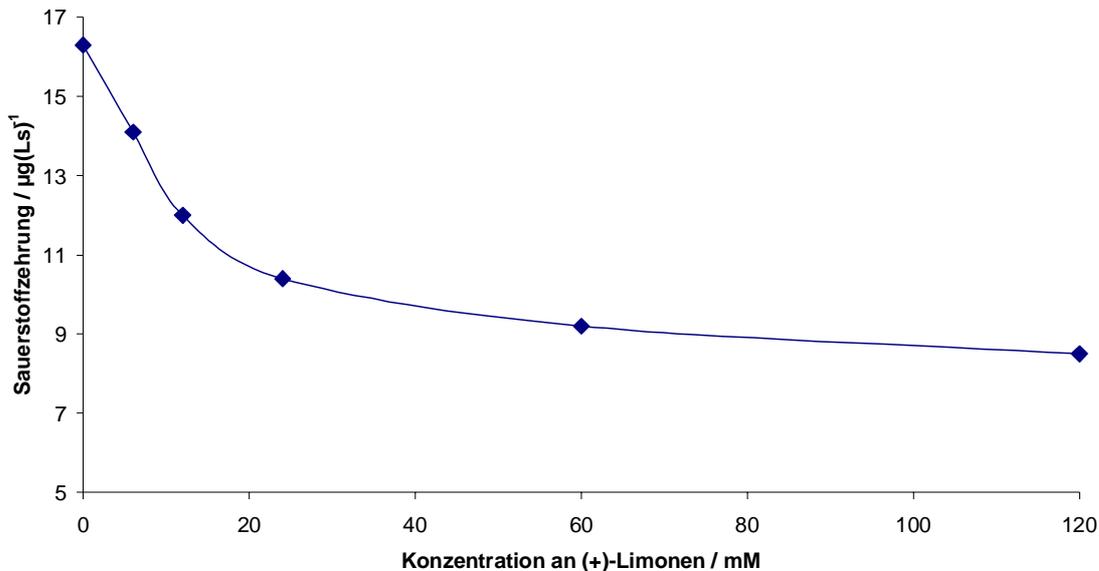
Eine Transformation von (+)-Valencen zu Nootkaton durch *Pleurotus sapidus* wäre interessant. Da sich jedoch in einem Screening, das an der Universität Hannover von Kaspera durchgeführt wurde, herausstellte, dass keine nennenswerten Produkte bei der Transformation von (+)-Valencen durch *Pleurotus sapidus* gefunden werden konnten, wurden die Untersuchungen zu dieser Biotransformation eingestellt.

#### Zwischenzusammenfassung 3.3.9:

- Durch Zugabe von (+)-Valencen (bis 80 mM) trat kurzfristig keine Änderung der Sauerstoffzehrung von *Pleurotus sapidus* ein.
- Eine tägliche Zugabe von (+)-Valencen wirkte zuerst aktivitätsvermindernd auf *Pleurotus sapidus*, nach 72 h erhöhte sich die Sauerstoffzehrung wieder.

### 3.3.10 Aktivitätsmessung von *Chaetomium globosum* in Gegenwart von (+)-Limonen

Der kurzfristige Einfluss von (+)-Limonen auf die Aktivität von *Chaetomium globosum* sollte überprüft werden. Dazu wurde die Sauerstoffzehrung einer 48 h alten Kultur von *Chaetomium globosum* (Gehalt an Biotrockenmasse ca.  $3,3 \text{ gL}^{-1}$ ) mit steigenden Konzentrationen an Limonen (bis 120 mM) aufgenommen (Abb. 3-20).



**Abb. 3-20 Sauerstoffzehrungen einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* in Abhängigkeit der (+)-Limonen-Konzentration**

Bei (+)-Limonenzugabe war eine Abnahme der Sauerstoffzehrung mit zunehmender Konzentration zu erkennen. Bei einer Konzentration von etwa 20 mM (+)-Limonen betrug die Sauerstoffzehrung etwa  $10 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$ , höhere Konzentrationen bewirkten keine wesentlich stärkere Hemmung der Sauerstoffzehrung mehr.

Um die Wirkung einer Aktivitätsverminderung von (+)-Limonen zu bestimmen, wurden die Sauerstoffzehrungen einer 720 h alten Kultur von *Chaetomium globosum* mit steigenden Konzentrationen an Limonen (bis 120 mM) aufgenommen, es zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate mit zunehmender (+)-Limonen-Konzentration (Tab. 3-20).

**Tab. 3-20 Sauerstoffzehrung einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* nach 720 h in Abhängigkeit der (+)-Limonen-Dosierung**

<b>(+)-Limonen-Konzentration</b>	<b>Sauerstoffzehrung</b>
<b>mM</b>	<b><math>\mu\text{g(Ls)}^{-1}</math></b>
0	11,2
6	10,2
12	11,2
24	6
60	6,1
120	4,8

Die Abnahme ist hier jedoch nicht so stark wie bei einer 48 h alten Kultur, da die Membranen einen gewissen Teil an (+)-Limonen speichern können, bis die aktivitätsmindernde Wirkung eintritt. Die Kultur besaß aufgrund ihrer längeren Kultivierungsdauer einen höheren Gehalt an Biotrockenmasse (ca.  $7,8 \text{ gL}^{-1}$ ) und damit mehr Membranmaterial. Nach (+)-Limonen-Zugaben (bis 12 mM) blieb die Sauerstoffzehrung annähernd konstant, bevor nach höherer Dosierung eine Abnahme der Sauerstoffzehrung eintrat (Tab. 3-20).

Bei der kurzfristigen Einwirkung von (+)-Limonen auf *Chaetomium globosum* konnte eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Konzentrationen an (+)-Limonen über 20 mM haben keinen weiteren negativen Effekt auf die Sauerstoffzehrung von *Chaetomium globosum*. Zwei Submerskulturen (100 mL) von *Chaetomium globosum* wurden identisch angeimpft und kultiviert, wobei nach 24 h eine der beiden Kulturen täglich mit (+)-Limonen (12 mM) versetzt wurden.

Ohne (+)-Limonen war eine Sauerstoffzehrung ( $49,2 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$ ) der Submerskulturen von *Chaetomium globosum* zu beobachten. Es zeigte sich, dass bei den Kulturen mit (+)-Limonen die Sauerstoffzehrung nach 24 h vollständig zum Erliegen kam und kein Glucoseverbrauch gemessen werden konnte. (+)-Limonen zeigte bei täglicher Dosierung auf *Chaetomium globosum* einen stark inhibierenden Effekt, es konnte eine vollständige Hemmung der Sauerstoffzehrung gemessen werden (schon nach 24 h bei 12 mM (+)-Limonen).

Weitere Versuche bestätigten jeweils den stark inhibierenden Effekt von (+)-Limonen auf *Chaetomium globosum*. Da *Chaetomium globosum* aus (+)-Limonen nur wenig interessante Biotransformationsprodukte (z.B. Carveol) bildet, wurde von einer weiteren Untersuchung der Transformation von (+)-Limonen durch *Chaetomium globosum* abgesehen.

Zwischenzusammenfassung 3.3.10:

- Bei der Zugabe von (+)-Limonen zu *Chaetomium globosum* änderte sich die akute Sauerstoffzehrung dosisabhängig. Je höher die Zugabe war, desto schwächer war die Sauerstoffzehrung. Die maximale akute Hemmung wurde ab einer (+)-Limonen-Zugabe von 20 mM erreicht.
- Wurde (+)-Limonen täglich zu *Chaetomium globosum* dosiert, trat eine vollständige Inaktivierung des Organismus ein.

**3.3.11 Aktivitätsmessung von *Chaetomium globosum* in Gegenwart von (+)-Valencen**

Da *Chaetomium globosum* (+)-Valencen zu dem sehr begehrten Aromastoff (+)-Nootkaton transformieren kann (3.1.3), war es interessant, den Einfluss von (+)-Valencen auf die Aktivität von *Chaetomium globosum* zu untersuchen.

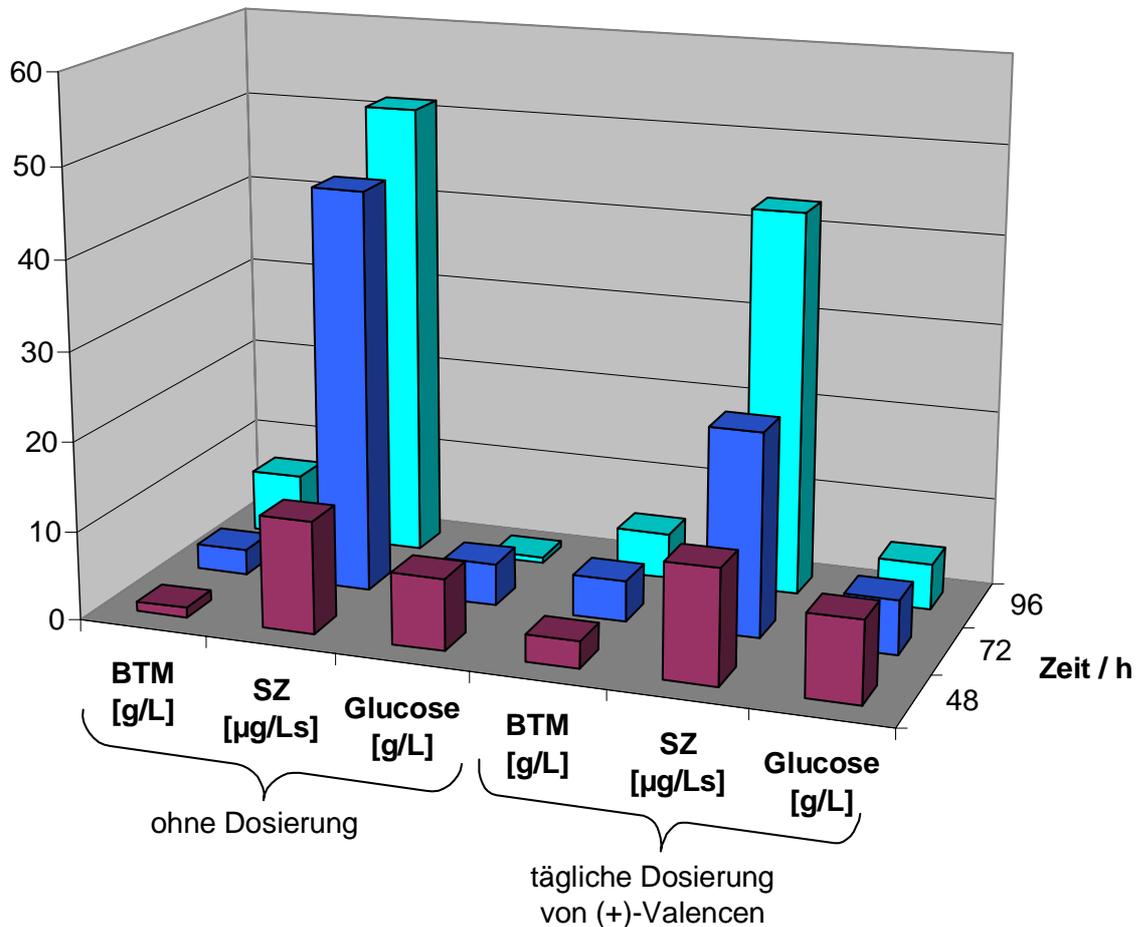
Um die kurzfristigen Einwirkungen einer Dosierung von (+)-Valencen auf die Aktivität von *Chaetomium globosum* zu untersuchen, wurde eine 48 h alte Kultur von *Chaetomium globosum* (ca. 3 gL<sup>-1</sup> Biotrockenmasse) mit wechselnden Konzentrationen (0, 4, 8, 16, 40, 80 mM) an (+)-Valencen versetzt und danach jeweils die Sauerstoffzehrung bestimmt. Die Sauerstoffzehrung der Submerskultur von *Chaetomium globosum* lag im Bereich von 16,3 bis 16,7 µg(Ls)<sup>-1</sup> und änderte sich nicht nach Zugabe von (+)-Valencen. In einem weiteren Versuch wurde eine Submerskultur von *Chaetomium globosum* höher angeimpft (Animpfverhältnis 20%), um die aktive Biomasse zu erhöhen. In diesem Versuch mit einer 48 h alten Kultur von *Chaetomium globosum* (ca. 5,7 gL<sup>-1</sup> Biotrockenmasse) zeigte (+)-Valencen keinen Einfluss auf die Stärke der Sauerstoffzehrung. Nach einer Zugabe von (+)-Valencen (80 mM) betrug sie 47 µg(Ls)<sup>-1</sup>. Es zeigte sich, dass (+)-Valencen keinen akut aktivitätsmindernden Effekt auf eine 48 h alte Submerskultur von *Chaetomium globosum* hat.

Welche Rolle das Alter der Kultur bei der akuten Aktivitätsminderung von *Chaetomium globosum* im Zusammenhang mit der Dosierung von (+)-Valencen spielt, sollte anhand weiteren Versuchsreihen mit älteren Kulturen überprüft werden. Eine Kultur von *Chaetomium globosum* (ca. 6 gL<sup>-1</sup>) wurde nach 72 h mit steigenden Konzentrationen an (+)-Valencen (0, 8, 16, 32, 80, 160 mM) versetzt und nach 2 min Sauerstoffzehrungen aufgenommen. Ein Einfluss von (+)-Valencen auf eine Submerskultur von *Chaetomium globosum* nach 72 h konnte nicht nachgewiesen werden.

Schließlich wurde eine Submerskultur von *Chaetomium globosum* nach 720 h unter Zugabe steigender Konzentrationen an (+)-Valencen (bis 80 mM) aufgenommen. Es wurde nicht mehr (+)-Valencen als bei der 72 h alten Submerskultur zugesetzt, da hier nur eine Biotrockenmasse von ca.  $4 \text{ gL}^{-1}$  gebildet wurde. In diesem Stadium des Wachstums (Sauerstoffzehrung ca.  $10,9 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$ ) zeigte eine Zugabe von (+)-Valencen keinen akut toxischen Effekt auf *Chaetomium globosum*.

Zusammenfassend zeigte (+)-Valencen kurzfristig keine Auswirkungen auf Submerskulturen von *Chaetomium globosum*. Für die Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton mit *Chaetomium globosum* wurde eine tägliche Konzentrationserhöhung an 0,8 mM (+)-Valencen für Submerskulturen als optimal gefunden. Hierauf aufbauend sollte die Aktivität im Verlauf einer Biotransformation bei zwei 24 h alten Submerskulturen von *Chaetomium globosum* überprüft werden. Dazu wurde eine 24 h alte 100 mL Submerskultur von *Chaetomium globosum* täglich mit 0,8 mM (+)-Valencen versetzt, parallel dazu wurde täglich jeweils vor einer weiteren (+)-Valencen-Zugabe die Sauerstoffzehrung, der Gehalt an Biotrockenmasse und der Glucosegehalt bestimmt.

Die Sauerstoffzehrungen, die ermittelten Biotrockenmassen und die Glucosegehalte sind in folgender Abbildung (Abb. 3-21) zusammengefasst:



**Abb. 3-21** Vergleichende Darstellung der Einwirkung einer (+)-Valencen-Dosierung (0,8 mM täglich) auf den Gehalt an Biotrockenmasse (BTM), den Glucosegehalt (Glucose) und die Sauerstoffzehrung (SZ) von *Chaetomium globosum*

Nach Zugabe von (+)-Valencen wurde die Zunahme des Gehaltes an Biomasse sowie die Sauerstoffzehrung der Submerskultur von *Chaetomium globosum* im Vergleich zum Ansatz ohne Zugabe von (+)-Valencen reduziert.

Dieser Einfluss von (+)-Valencen auf das Wachstum von *Chaetomium globosum* sollte an Submerskulturen in einer späteren Wachstumsphase an älteren Kulturen überprüft werden. Bei zwei 168 h alten Kulturen von *Chaetomium globosum* wurde das Medium abdekantiert und die Kulturen mit frischem Medium versetzt. Eine dieser Kulturen wurde täglich mit 0,8 mM (+)-Valencen versetzt.

Nach weiteren 24 h Kultivierung wurde täglich vor der Zugabe an (+)-Valencen die Sauerstoffzehrung bestimmt, sowie der Glucosegehalt und der Gehalt an Biotrockenmasse aus

dem Messzelleninhalt bestimmt. Bei der Aufnahme der Sauerstoffzehrung wurde die Rührerdrehzahl erhöht, um nach 96 h bei dann höheren Gehalten an Biotrockenmasse noch eine homogene Vermischung erreichen zu können. Aus den ermittelten Steigungen ergeben sich Sauerstoffzehrungen, die mit den ermittelten Gehalten an Biotrockenmasse und dem Glucosegehalt in Tab. 3-21 zusammengefasst sind.

**Tab. 3-21 Sauerstoffzehrung, Biotrockenmasse und Glucosegehalte von *Chaetomium globosum* mit und ohne (+)-Valencen-Zugabe (0,8 mM)**

Zeit h	Ohne Zugabe von (+)-Valencen			Mit Zugabe von (+)-Valencen		
	Gehalt an Biotrockenmasse gL <sup>-1</sup>	Sauerstoff- zehrung μg(Ls) <sup>-1</sup>	Glucose- gehalt gL <sup>-1</sup>	Gehalt an Biotrockenmasse gL <sup>-1</sup>	Sauerstoff- zehrung μg(Ls) <sup>-1</sup>	Glucose- gehalt gL <sup>-1</sup>
24	2,06	26,7	22,1	1,4	24,2	22,1
48	3,22	21,7	19,4	2,84	18,9	19,3
72	2,64	18,2	17	4,62	20,7	17,1
96	3,3	20,3	14,8	5,06	21,1	14,2

Es ließen sich kaum Unterschiede zwischen den beiden Kulturen bezüglich des Wachstums und der Sauerstoffzehrung finden. Die Abnahme des Glucosegehaltes war in beiden Kolben ähnlich, innerhalb von 96 h nahm sie von 22,1 gL<sup>-1</sup> auf ca. 14 bis 15 gL<sup>-1</sup> ab. Trotz dieser geringen Unterschiede im Glucoseverbrauch nahm der Gehalt an Biotrockenmasse in der Kultur ohne (+)-Valencen nur um 1 gL<sup>-1</sup>, mit (+)-Valencen um ca. 3,5 gL<sup>-1</sup> zu. Da diese Werte noch im Schwankungsbereich der Biotrockenmasse (5.7.1) lagen, der durch die nicht repräsentative Probenahme der Submerskulturen verursacht wurde, konnte keine sichere Aussage getroffen werden.

Auf Submerskulturen von *Chaetomium globosum* wirkten Konzentrationserhöhungen an (+)-Valencen von 0,8 mM täglich nicht vollständig inhibierend. Die Konzentrationserhöhung von 0,8 mM wurde für Biotransformationen von (+)-Valencen zu Nootkaton durch *Chaetomium globosum* ermittelt. Bei der Biotransformation von (+)-Limonen zu Carvon durch *Pleurotus sapidus* wurden 6 mM täglich als optimale Konzentrationserhöhung gefunden. Im folgenden Versuch sollten Konzentrationserhöhungen von 8 mM (+)-Valencen täglich eingesetzt werden, um zu überprüfen ob (+)-Valencen in höheren Konzentrationen auf *Chaetomium globosum* stärker aktivitätsvermindernd wirkt.

Es wurden zwei 100 mL-Kulturen von *Chaetomium globosum* angesetzt, wobei eine nach 24 h täglich mit (+)-Valencen (8 mM) versetzt wurde. Vor der Zugabe wurden jeweils von beiden Kulturen die Sauerstoffzehrungen mit der externen Clark-Elektrode gemessen.

**Tab. 3-22 Sauerstoffzehrungen und Glucosegehalte von *Chaetomium globosum* mit und ohne (+)-Valencen-Zugabe (8 mM)**

Zeit h	Ohne Zugabe von (+)-Valencen		Mit Zugabe von (+)-Valencen	
	Sauerstoffzehrung $\mu\text{g(Ls)}^{-1}$	Glucosegehalt $\text{gL}^{-1}$	Sauerstoffzehrung $\mu\text{g(Ls)}^{-1}$	Glucosegehalt $\text{gL}^{-1}$
24	49,2	18,1	40,4	19,7
48	47,6	10,9	44,1	15,9
72	31,5	4,04	44,2	12,2
96	42,6	0,14	46,6	6,83

Eine Zugabe von (+)-Valencen (8 mM) zu *Chaetomium globosum* hemmt die Sauerstoffzehrung nicht, sie wird nach 96 h sogar leicht erhöht ( $40,4 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$  nach 24 h und  $46,6 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$  nach 96 h), während die Sauerstoffzehrung bei der Kultur ohne (+)-Valencen leicht abnimmt. Die Abnahme des Glucosegehaltes ist in der Submerskultur mit (+)-Valencen schwächer als ohne (+)-Valencen, dies wurde ebenfalls bei Dosierungen von 0,8 mM (+)-Valencen täglich zu *Chaetomium globosum* beobachtet.

#### Zwischenzusammenfassung 3.3.11:

- (+)-Valencen zeigte kurzfristig keinen aktivitätsvermindernden Effekt auf *Chaetomium globosum*.
- Langfristig brachte eine Zugabe von (+)-Valencen (bis 8 mM) die Sauerstoffzehrung im Vergleich zu Dosierungen mit (+)-Limonen (3.3.10) nicht zum Erliegen.

**3.3.12 Aktivitätsmessung von *Chaetomium globosum* in Gegenwart von Lösungsmitteln**

Eine Kultivierung in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln sollte löslichkeitsvermittelnde Funktionen von Lösungsmitteln bzw. die Anwendbarkeit eines Zwei-Phasen-Systems während der Biotransformation aufzeigen. Dies könnte die Verfügbarkeit der lipophilen Substrate für die Kultur eventuell erhöhen und/oder die Abtrennung der Produkte aus der Submerskultur erleichtern, da die Produkte ebenfalls nicht gut wasserlöslich sind. Auf diese Weise könnten die Produkte vor einer Oxidation im wässrigen Medium geschützt werden. Da Lösungsmittel im Allgemeinen aktivitätsvermindernd auf höhere Pilze wirken, wurde die Aktivität von *Chaetomium globosum* in Gegenwart von verschiedenen Lösungsmitteln untersucht.

Dazu wurden ausgehend von einer 48 h alten Kultur je drei 100 mL Kulturen mit 5% vol, 10% vol und 30% vol von neun verschiedenen Lösungsmitteln und ein Blindversuch ohne Lösungsmittel in Schüttelkolben angesetzt. Das Animpfverhältnis wurde auf 10% des Mediums berechnet. Die Lösungsmittel Ethanol, Ethylenglycol, n-Decan-1-ol, Isooctan, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Miglyol, Oleylalkohol und n-Decan wurden getestet. Die angesetzten Kulturen wurden bei 25°C und 150 rpm kultiviert und täglich der Glucosegehalt bestimmt, sowie die Sauerstoffzehrung gemessen.

Da bei Ethanol, Ethylenglycol, Dimethylsulfoxid und Dimethylformamid nur eine Phase vorlag, wurde die Probe aus der homogenen Mischung gezogen. In den Zwei-Phasen-Systemen [Decan-1-ol, Isooctan, Miglyol (10% vol und 30% vol) und Oleylalkohol (10% vol und 30% vol)] wurde die Probe aus der wässrigen Phase gezogen. Bei Miglyol und Oleylalkohol (5% vol) fand eine Mizellenbildung statt, so dass die Probe jeweils nur als Mischphase gezogen werden konnte.

Eine quantitativ analytische Auswertung der Sauerstoffzehrung und der Glucosewerte scheiterte daran, dass die Probenahme der verschiedenen Lösungen (Zwei-Phasen-Systeme, Einphasensysteme und/oder Mizellenbildung) nicht repräsentativ durchgeführt werden konnte. Bei Ethanol, Isooctan, n-Decanol und Dimethylformamid blieben die Glucosegehalte annähernd konstant, während bei Dimethylsulfoxid-, Ethylenglycol-, Miglyol- und Oleylalkohol-Kulturen ein Glucoseverbrauch nachgewiesen werden konnte. Die Auswertung der Sauerstoffzehrung erfolgte nur qualitativ, da die Pellets unter Einwirkung von Lösungsmitteln stark aufquollen und teilweise während der Messung zerfielen, so dass die Sauerstoffzehrung über den Verlauf der Messung nicht mehr linear war.

**Tab. 3-23 Sauerstoffzehrung und Glucoseverbrauch einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* bei verschiedenen Konzentrationen an Lösungsmitteln (+: positiv; -: keine signifikante Änderung)**

Lösungsmittel	Konzentration %vol	Sauerstoffzehrung			Glucoseverbrauch		
		+/-			+/-		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Ethanol	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
Ethylenglycol	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	30	-	-	-	-	-	-
n-Decan-1-ol	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
Isooctan	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
Dimethylformamid	5	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
Dimethylsulfoxid	5	+	+	+	+	+	+
	10	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-
Miglyol	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+
Oleylalkohol	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+
n-Decan	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+

Bei Ethanol, n-Decanol, Isooctan, Dimethylformamid konnte keine Sauerstoffzehrung gemessen werden. Bei Miglyol, Oleylalkohol und n-Decan unterschied sich die Sauerstoffzehrung in allen drei Konzentrationsvarianten nicht signifikant. Lediglich bei Dimethylsulfoxid und Ethylenglycol ließ sich eine Abhängigkeit der Sauerstoffzehrung von der Konzentration erkennen.

Miglyol, Oleylalkohol und n-Decan eignen sich für Zwei-Phasen-Kultivierungen mit *Chaetomium globosum*. Durch Überschichtungen mit Miglyol, Oleylalkohol und n-Decan konnten während Spinnerflask-Kultivierungen Sauerstoffmessungen mit Optoden durchgeführt werden (3.3.5.3). Die organischen Schichten über der Kulturbrühe konnten eine Eindiffusion von Luftsauerstoff durch den Rührer deutlich verringern. Für weitere Zwei-Phasen-Kultivierungen wurde n-Decan ausgewählt (vgl. Abb. 3-23), da die n-Decan-Phase direkt mittels GCMS (5.7.2.4) analysiert werden kann.

Miglyol, Oleylalkohol und n-Decan haben in Konzentrationen bis zu 30%vol keine aktivitätsmindernden Einflüsse auf *Chaetomium globosum* gezeigt. Dies könnte daran liegen, dass sie nicht in die Membranen aufgenommen werden und somit nicht in das fungale System eingreifen können. Bei Ethanol, Ethylenglycol oder Dimethylformamid tritt eine vollständige Hemmung der Sauerstoffzehrung ein.

#### Zwischenzusammenfassung 3.3.12:

- Bei Einwirkung von Ethanol, Isooctan, n-Decanol und Dimethylformamid konnte keine Sauerstoffzehrung nachgewiesen werden, wohingegen bei Ethylenglycol und bei Dimethylsulfoxid eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden konnte.
- n-Decan, Miglyol und Oleylalkohol verminderten die Aktivität von *Chaetomium globosum* nicht und eignen sich somit für eine Zwei-Phasen-Kultivierung.

#### **3.3.13 Bemerkungen zu den Aktivitätsstudien**

In einigen Versuchen wurde eine Abnahme des Gehaltes an Biotrockenmasse gemessen. Mögliche Ursachen hierfür sind nicht repräsentative Probenahmen und die Zerstörung des Membransystems, wobei der Zellinhalt teilweise in das Kultivierungsmedium fließt.

(+)-Limonen führte langfristig zu einer vollständigen Hemmung der Sauerstoffzehrung bei *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum*. (+)-Valencen hingegen führte nicht zu einer vollständigen Wachstumshemmung, eine Zunahme der Biotrockenmasse trat in Gegenwart von (+)-Valencen auf. Bei dieser (+)-Valencendosierung war bereits die Löslichkeit überschritten,

so dass das (+)-Valencen als separate organische flüssige Phase vorlag. Daher ist die Regelung der Zugabe an reinem (+)-Valencen als Substrat zu einer Submerskultur von *Chaetomium globosum* nicht entscheidend für eine Optimierung der Ausbeute. Da technisches (+)-Valencen aus der citrusverarbeitenden Industrie jedoch Spuren anderer (toxischer) Terpene (z.B. (+)-Limonen) enthalten könnte, wird dennoch eine Kontrolle der Aktivität von *Chaetomium globosum* notwendig sein, um den Transformationsprozess optimal zu führen. Die Auswirkungen der Dosierungen von (+)-Limonen und (+)-Valencen auf *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* sind in Tab. 3-24 schematisch zusammengefasst.

**Tab. 3-24 Sauerstoffzehrung nach Dosierung von Terpenen**

+     **unveränderte Sauerstoffzehrung**  
 -     **Abnahme der Sauerstoffzehrung**  
 +/-   **Konzentrationsabhängige Sauerstoffzehrung**  
 0     **keine Sauerstoffzehrung**

<b>Organismus</b>	<b>Einwirkzeit</b>	<b>(+)-Limonen</b>	<b>(+)-Valencen</b>
<i>Pleurotus sapidus</i>	2 min	+/-	+
	24 h	0	-
<i>Chaetomium globosum</i>	2 min	+/-	+
	24 h	0	-

Die zu etablierende Prozesskontrolle von fungalen Biotransformationen sollte sich nur am aktuellen Aktivitätszustand der Kultivierung orientieren (Smith 1984). Der Aktivitätszustand kann über *in situ*-Messungen der Sauerstoffzehrung verfolgt werden.

Zwischenzusammenfassung 3.3:

- Die Respirometrie ist für Aktivitätsbestimmungen höherer Pilze geeignet.
- (+)-Limonen zeigte langfristig eine komplette Hemmung der Sauerstoffzehrung bei *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum*. Kurzfristig konnte eine Aktivitätsabnahme durch Dosierung von (+)-Limonen nur bei *Chaetomium globosum* nachgewiesen werden.
- (+)-Valencen zeigte keine akuten Aktivitätsminderungen bei *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum*. Bei längeren Dosierungen wird die Aktivität von *Chaetomium globosum* abgeschwächt, es war jedoch bei Konzentrationserhöhungen von 8 mM täglich noch immer eine Restaktivität zu verzeichnen.

### 3.4 *In situ*-Aktivitätsmonitoring mit faseroptischen Sauerstoffsensoren

#### 3.4.1 Motivation zum Einsatz von Spinnerflask-Kultivierungen

Nachdem sich die Sauerstoffzehrung als geeignetes Instrument zur Aktivitätsbestimmung von *Chaetomium globosum* herausgestellt hatte, sollte eine interne Messensorik im Bioreaktor etabliert werden. Bei den Kultivierungen im Bioreaktor konnte Respirometrie als Messprinzip eines Aktivitätssensors bereits angewendet werden (3.5.3). Die Clark-Elektroden in den Bioreaktoren wuchsen oft zu, so dass eine einwandfreie Messung der Sauerstoffzehrung nicht immer gewährleistet werden konnte. Eine externe Messung der Sauerstoffzehrung war durch die Probleme der nicht repräsentativen Probenahme nicht anwendbar. In den Spinnerflasks sollten zunächst die optischen Sensoren auf ihre Brauchbarkeit zum langfristigen Aktivitätsmonitoring überprüft werden und es sollte gleichzeitig versucht werden, durch Einsatz von Myzelkonzentraten (3.1.3) die Ausbeuten an Nootkaton zu erhöhen. Bei Kultivierungen von Myzelkonzentraten im Schüttelkolben konnten bei Biotransformationen mit *Chaetomium globosum* bis zu  $13 \text{ mgL}^{-1}$  Nootkaton nachgewiesen werden. Die Probleme, die bei den 2 L-Kultivierungen im Bioreaktor insbesondere bei hohen Gehalten an Biomasse (Gasphasenmyzel, Schaumbildung etc.) beobachtet wurden, sollten vermieden werden. Für Kultivierungen mit Myzelkonzentraten wurde schließlich als einfacher Modellreaktor für Rührkesselreaktoren die Spinnerflask ausgewählt.

Spinnerflasks werden in der Zellkulturtechnik eingesetzt, durch das Rührsystem werden die Organismen keinen starken Scherkräften ausgesetzt (5.3.2.4 und 5.6.5). Dosierungen von Valencen oder Zugabe von Überschichtungsmittel (Miglyol oder n-Decan) waren unter sterilen Bedingungen einfach unter der Sterilwerkbank durchzuführen. Bei Kultivierungen von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor wurden verschiedene Morphologien gefunden. Daher sollte in Spinnerflasks ebenfalls untersucht werden, ob dieses Phänomen von der Art der Durchmischung (mechanischer Stress) abhängig ist. Somit war es wichtig, dass der Spinnerflask-Inhalt gerührt und nicht geschüttelt wurde.

In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass sich *Chaetomium globosum* in einer Spinnerflask kultivieren lässt: 500 mL Medium wurden mit *Chaetomium globosum* (Animpfverhältnis 10%) angeimpft und mit 100 rpm bei 25°C und einer Belüftungsrate von 0,1 vvm (Edelstahlnadel) kultiviert. Es wurden kleine Pellets (ca. 0,5 cm Durchmesser) gebildet. Nach 312 h Kultivierung kam es nur zu einem geringen Anwachsen des Myzels an der Glaswand (Abb. 3-22). Ein Gasphasenmyzel wurde nicht ausgebildet.



**Abb. 3-22 Spinnerflask-Kultivierung von *Chaetomium globosum* nach 312 h**

Der mechanische Stress war im Gegensatz zu den Kultivierungen im Bioreaktor geringer, da die Einbauten (Elektroden) gänzlich fehlten. Der Sauerstoffgehalt konnte optisch über eine intern angebrachte sauerstoffsensitive Folie *in situ* bestimmt werden (5.6.5 und 3.3.5). Außerdem konnte der Sauerstoffgehalt durch Belüftung mit Druckluft eingestellt werden.

### **3.4.2 Einsatz von sauerstoffsensitiven Folien zur *in situ*-Aktivitätsbestimmung**

Für eine *in situ*-Messung ist es erforderlich, dass insbesondere bei langen Kultivierungszeiten der Mikroorganismus auf dem Sensor nicht aufwächst. Durch Aufwuchsversuche von *Chaetomium globosum* auf sauerstoffsensitive Folien mit verschiedenen Oberflächenbeschichtungen konnte gezeigt werden, dass der Sensor PSt3 gegenüber Aufwachsen von *Chaetomium globosum* resistent ist (3.3.5.1).

Zu Beginn sollte überprüft werden, ob in der Spinnerflask *in situ*-Messungen der Sauerstoffzehrung mit der intern angebrachten Sauerstofffolie über die gesamte Kultivierungszeit möglich ist. Eine Spinnerflask mit 450 mL Medium wurde mit *Chaetomium globosum* (Animpfverhältnis 10%) angeimpft und mittels eines Kompressors über eine Edelstahlfritte belüftet. Durch den Einsatz einer Fritte als Belüftungseinheit konnte der Sauerstoffeintrag in die Kultur im Vergleich zu einer Edelstahlnadel als Belüftungseinheit verbessert werden. Contraspum (Silikonöl zur Schaumvermeidung) wurde je nach Bedarf zugegeben, da das Kulturmedium aufgrund der kleinen Luftbläschen stark schäumte. Dennoch konnte bei dieser Kultivierung nach 72 h kein Sauerstoff mehr eingetragen werden, da die Fritte mit Myzel bewachsen war. Es konnten die in Tab. 3-25 angegebenen Sauerstoffzehrungen (5.6.5) und Glucosegehalte gemessen werden.

**Tab. 3-25** Glucosegehalte und interne Sauerstoffzehrung von *Chaetomium globosum* während der Spinnerflask-Kultivierung (100 rpm)

Zeit h	Interne Sauerstoffzehrung $\mu\text{g(Ls)}^{-1}$	Glucosegehalt $\text{gL}^{-1}$
0	3,9	30,9
24	36,8	24,1
48	189,2	18,8
72	-	18,3

Ohne Supplementierung von Terpenkohlenwasserstoffen konnten steigende Werte der Sauerstoffzehrung gemessen werden (Ursache: Zunahme des Gehaltes an aktiver Biomasse).

In einer weiteren Kultivierung sollte überprüft werden, ob *Chaetomium globosum* mit einer Miglyolüberschichtung kultiviert werden kann. Dies wurde mit dem Ziel angewandt, die Diffusion von Sauerstoff über die Gasphase in die Kulturbrühe zu verhindern, und somit bei den Sauerstoffzehrungen nur die Submerskultur zu erfassen (3.3.5.3). In diesem Fall war die Sauerstoffzehrungskurve über den gesamten Bereich linear, so dass eine gute Auswertung gegeben war (vgl. 3.3.5.3). Mit dem respirometrischen faseroptischen Sauerstoffsensor konnten Langzeitmessungen in Spinnerflasks (mit und ohne Miglyolüberschichtung) hinreichend genau durchgeführt werden. In Gegenwart von (+)-Limonen und (+)-Valencen ergaben sich keine Änderungen der Messcharakteristik, so dass diese für eine *in situ*-Messensorik für Aktivitätsbestimmungen während der (+)-Valencen-Transformation von *Chaetomium globosum* eingesetzt werden konnte.

#### Zwischenzusammenfassung 3.4.2:

- In den Spinnerflasks war eine Kultivierung von *Chaetomium globosum* und die Messung der Sauerstoffzehrung bei längeren Kultivierungszeiten möglich.
- Bei den Spinnerflask-Kultivierungen konnte die Sauerstoffzehrung *in situ* bestimmt werden, Voraussetzung war eine Belüftung bis zu einem Sauerstoffgehalt von ca.  $5 \text{ mgL}^{-1}$  im Medium.

### 3.4.3 Biotransformationen von Valencen zu Nootkaton durch *Chaetomium globosum* in Spinnerflasks

#### 3.4.3.1 Allgemeines zu den Biotransformation von *Chaetomium globosum* in Spinnerflasks

Es wurde untersucht, ob bei der Kultivierung von *Chaetomium globosum* als Myzelkonzentrat in den Spinnerflasks ebensohohe Ausbeuten an Nootkaton gefunden werden konnten wie bei den Schüttelkolbenversuchen. Bei den Spinnerflask-Kultivierungen von *Chaetomium globosum* wurden zusätzlich Substrate mit einem geringeren Gehalt an Valencen (als Simulation für technische Substrate, 5.7.2.5) eingesetzt.

Bei diesen Biotransformationsversuchen wurden Doppelansätze mit zwei identischen Spinnerflasks durchgeführt. Auf dieser Weise konnten Unterschiede in der Morphologie besser beobachtet werden. Zum einen konnten zwei verschiedene Belüftungsarten beim Einsatz derselben Vorkultur realisiert und die Unterschiede im Wachstum direkt verglichen werden. Zum anderen konnten mit zwei identischen Ansätzen Unterschiede im Wachstum, der Morphologie und des Nootkatonbildungsvermögens gemessen werden. Von den über 30 Kultivierungen von *Chaetomium globosum* in Spinnerflasks, die zur Bestimmung geeigneter Kultivierungsparameter und zur Verbesserung der Nootkatonbildung durchgeführt wurden, sollen hier nur einige exemplarische Beispiele angeführt werden.

#### 3.4.3.2 Bestimmung geeigneter Kultivierungsparameter für Kultivierungen von *Chaetomium globosum* in Spinnerflasks

Bei höheren Biomassen (Biotrockenmasse ca.  $7 \text{ gL}^{-1}$ ) wurde festgestellt, dass sich der Inhalt der Spinnerflask bei einer Rührerdrehzahl von 100 rpm nicht mehr homogen durchmischen ließ, so dass die Rührerdrehzahl auf 200 rpm erhöht wurde. Dies sorgte dann bei höheren Biomassen für eine ausreichende Durchmischung des Flascheninhaltes. Höhere Drehzahlen wären für einen besseren Sauerstoffeintrag förderlich gewesen, aber es bildete sich dann ein störender Schaum an der Grenzfläche Medium/Luft aus. Als optimale Rührerdrehzahl für *Chaetomium globosum* bei Spinnerflask-Kultivierungen bei  $25^\circ\text{C}$  wurde 200 rpm ermittelt.

Bei den Untersuchungen mit verschiedenen Animpfverhältnissen zeigte sich, dass Animpfverhältnisse von 30 bis 75% praktikabel waren. Eine Aufkonzentrierung des Myzels, bei dem in den Schüttelkolbenversuchen die höchsten Ausbeuten an Nootkaton erzielt wurden, wurde nicht durchgeführt, um die Probleme bei der Submers-Kultivierung mit hohen Biomassen zu umgehen (3.5.4.1). Bei geringen Animpfverhältnissen (30%) konnte stärker

belüftet werden als bei einem Animpfverhältnis von 75%, ohne dass der Abluftfilter durch die Schaumbildung verstopft wurde.

Zwei Spinnerflasks mit je 300 mL Medium wurden mit *Chaetomium globosum* angeimpft (Animpfverhältnis 50%) und mit 200 rpm und 0,44 vvm kultiviert. In Spinnerflask 1 (SF1) erfolgte die Belüftung über eine Edelstahlnadel, in Spinnerflask 2 (SF2) über eine Fritte. Nach 24 h wurde in beide Spinnerflasks 40%iges Valencen (maxens<sup>TM</sup> 60% 5.7.2.5, 40 mM) gegeben. Nach Zugabe von Valencen stiegen die Gehalte an Biotrockenmasse um ca. 2 gL<sup>-1</sup> an, der Glucosegehalt nahm nur wenig ab. In der SF1 konnten nach 144 h ca. 3 mgL<sup>-1</sup> Nootkaton nachgewiesen werden. Schon 24 h nach der Zugabe des Valencens (maxens<sup>TM</sup>) konnte in beiden Spinnerflasks keine Sauerstoffzehrung mehr nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache kommt ein stark aktivitätsmindernder Stoff in technischem Substrat in Betracht. Schon Spuren von (+)-Limonen würden die Sauerstoffzehrung komplett hemmen (siehe Aktivitätsstudien 3.3.10). Da bei der industriellen Anwendung dieses Prozesses technische Substrate eingesetzt werden sollen, gestaltet sich die Regelung der Substratzugabe aufgrund dieser Ergebnisse schwierig. Technische Substrate enthalten Verunreinigungen weiterer Terpenkohlenwasserstoffen, die eine höhere Inaktivierung von *Chaetomium globosum* zur Folge haben können als (+)-Valencen. Eine Regelung der Terpendosierung, die sich auf Aktivitätsdaten bezieht, orientiert sich immer am stärksten inhibierenden Substrat, so dass die (+)-Valencenkonzentrationen, die für eine optimale Nootkatonausbeute notwendig sind, eventuell nicht erreicht werden.

Bei einem Animpfverhältnis von 75% war nur ein geringer Sauerstoffeintrag messbar. Ein Grund liegt in der hohen Viskosität der Submerskultur. Rührerdrehzahl, höhere Belüftungsraten u. a. haben ebenfalls einen Einfluss auf den Sauerstoffeintrag. Diese Parameter konnten jedoch aufgrund der starken Schaumbildung nicht stark variiert werden.

#### 3.4.3.3 Einfluss der Belüftungsrate auf die Nootkatonbildung

Bei niedrigen Sauerstoffgehalten, die bei hohen Animpfverhältnissen und Belüftungen über die Edelstahlfritten gemessen wurden, wurden höhere Gehalte an Nootkaton als bei den hochbelüfteten Submerskulturen beobachtet. Als Beispiel dafür soll eine Spinnerflask-Kultivierung mit 25%iger Überschichtung mit n-Decan dienen, n-Decan hat keine Auswirkungen auf die Aktivität von *Chaetomium globosum* (3.3.12). Da bei der Verwendung von n-Decan zur Überschichtung die Analysen der Terpene direkt aus der n-Decan-Phase durchgeführt werden konnten, wurde es gegenüber anderen in Frage kommenden organischen Lösungsmitteln als Überschichtungsmittel bevorzugt (vgl. Tab. 3-23).

Zwei Spinnerflasks mit je 400 mL Medium wurden mit *Chaetomium globosum* (Animpfverhältnis 75%) bei einer Drehzahl von 200 rpm kultiviert. In beide Spinnerflasks wurden je 100 mL n-Decan (25% vol n-Decan), 500 µL Contraspum und (+)-Valencen (22 mM) gegeben. Da bei technischem Valencen nur geringe Umsetzungen zu Nootkaton gefunden wurde, wurde „reines“ (+)-Valencen (Fluka, 90%) eingesetzt. Bei SF1 erfolgte die Belüftung über eine Fritte mit 0,33 vvm, SF2 wurde mit 0,66 vvm über eine Edelstahl-nadel belüftet. Es konnten folgende Gehalte an Biotrockenmasse sowie Glucosegehalte und Nootkatongehalte bestimmt werden (Tab. 3-26).

**Tab. 3-26 Biotrockenmasse-, Glucose- und Nootkatongehalte von *Chaetomium globosum***

Zeit h	Gehalt an Biotrockenmasse gL <sup>-1</sup>		Glucosegehalt gL <sup>-1</sup>		Nootkatongehalt im Medium mgL <sup>-1</sup>	
	SF1	SF2	SF1	SF2	SF1	SF2
0	2,88	3,22	22,5	20,2	n.n.	0,17
24	4,44	3,30	18,6	20,6	n.n.	0,77
48	4,74	4,08	15,1	18,9	n.n.	0,15
96	5,98	4,10	10,8	18,6	n.n.	0,77

Es konnten ex- und interne Sauerstoffzehrungskurven aufgenommen werden, welche die Aktivität von *Chaetomium globosum* bestätigten. Bei der Kultivierung schwamm die n-Decanschicht oben auf und es bildete sich stets eine deckende Schicht auf der Kulturbrühe aus. Bei SF1 wurde der Gehalt an Biotrockenmasse etwa verdoppelt, der Glucosegehalt des Mediums wurde auf die Hälfte reduziert. Bei SF2 erhöhte sich der Gehalt an Biotrockenmasse um ca. 1 gL<sup>-1</sup>, der Glucosegehalt nahm nur geringfügig ab. Diese unterschiedlichen Wachstumsarten wurden durch die Belüftung verursacht, bei SF1 (Fritte) ging trotz geringerer Belüftungsrate mehr Sauerstoff in die Kulturbrühe über als bei der Begasung über die Edelstahl-nadel (SF2). Jedoch konnte lediglich in SF2 Nootkaton nachgewiesen werden, nach 96 h Kultivierungsdauer wurden ein Nootkatongehalt von ca. 0,8 mgL<sup>-1</sup> im Medium bestimmt. Die Submerskultur, die mit der Fritte (0,33 vvm) belüftet wurde, zeigte ein besseres Wachstum als die, die über die Edelstahl-nadel (0,66 vvm) belüftet wurde. Es wurde oft beobachtet, dass die Spinnerflasks mit dem niedrigeren Sauerstoffgehalt höhere Werte an Nootkaton zeigten. Dies wurde ebenfalls bei den Kultivierungen in den 2 L-Bioreaktoren beobachtet, je besser die

Sauerstoffversorgung war, desto niedrigere Gehalte an Nootkaton konnten im Medium nachgewiesen werden (3.5.4.2).

Der Sauerstoffeintrag war aufgrund der hohen Gehalte an Biotrockenmasse und der Viskosität des Mediums deutlich erschwert. Im Falle der Belüftung über eine Edelstahl-nadel konnte nur wenig Sauerstoff in das Medium eingetragen werden, als die Belüftungsrate auf bis zu 2 vvm erhöht wurde, fand kein messbarer Anstieg des Sauerstoffgehaltes im Medium statt. Durch die Verwendung einer Fritte als Belüftungseinrichtung konnten höhere Sauerstoffgehalte in der Spinnerflask erreicht werden. Es konnte beobachtet werden, dass *Chaetomium globosum* auf der Fritte wuchs und nach einiger Zeit keine Belüftung mehr möglich war, da die Fritte komplett zugewachsen war.

Mit der folgenden hier dargestellten Kultivierung von *Chaetomium globosum* in Spinnerflasks sollen die unterschiedlichen Morphologien verdeutlicht werden. Zwei Spinnerflasks wurden mit je 600 mL Medium gefüllt und mit *Chaetomium globosum* (Animpfverhältnis 33%) angeimpft, bevor die Submerskulturen mit 200 mL n-Decan (25% vol n-Decan) mit einer Belüftungsrate von 0,44 vvm kultiviert wurden. In beide Spinnerflasks wurden je 1 mL Contraspum und (+)-Valencen (Fluka, 22 mM) gegeben.

Zu Beginn der Kultivierung wurden kleine Pellets ausgebildet, die sich jedoch nach ca. 72 h zu großen Aggregaten zusammenballten, somit traten große Schwankungen bei der Bestimmung der Biotrockenmasse auf, so dass nach 192 h keine repräsentative Probenahme mehr möglich war. Nach 216 h konnte bei SF2 keine Belüftung mehr stattfinden, da die Fritte durch Myzelbewuchs verstopft war.

Bei SF1 wurde die Glucose komplett verbraucht ( $20 \text{ gL}^{-1}$ ), während bei SF2 nur eine Abnahme um  $12 \text{ gL}^{-1}$  Glucose zu verzeichnen war (bei einer Kultivierungsdauer von 240 h). In beiden Spinnerflasks konnten Nootkatongehalte von 2 bis  $3 \text{ mgL}^{-1}$  (nach 24 h) gemessen werden, die im Verlauf der Kultivierung nicht weiter zunahmen. Zu späteren Kultivierungszeiten wurden oftmals geringere Nootkatongehalte gemessen als direkt nach der Zugabe von Valencen. Da aufgrund der hohen Biomasse und der hohen Viskosität des Mediums nur Sauerstoffgehalte von 1 bis  $2 \text{ mgL}^{-1}$  eingestellt werden konnten, war der Steigungsabschnitt der Sauerstoffzehrungskurve zu gering, um quantitativ ausgewertet zu werden. Weiterhin wiesen die Morphologien der beiden identisch angesetzten und kultivierten Submerskulturen von *Chaetomium globosum* große Unterschiede am Ende der Kultivierung auf (Abb. 3-23).



**Abb. 3-23** Zwei-Phasen-Kultivierung von *Chaetomium globosum* in Spinnerflasks nach 240 h Kultivierung (links: SF1; rechts: SF2)

Die Erkenntnisse aus den Kultivierungen in Spinnerflasks und in den Bioreaktoren zeigten, dass die Nootkatonbildung bei geringeren Belüftungsraten begünstigt ist.

Da zum Aktivitätsmonitoring über Respirometrie zu Beginn der Messung Sauerstoffgehalte von ca.  $5 \text{ mgL}^{-1}$  erforderlich sind, wurde versucht die Begasungsart für die Biotransformation von (+)-Valencen durch *Chaetomium globosum* und zur Durchführung von Aktivitätsmessungen zu optimieren.

#### 3.4.3.4 Einsatz von Hohlfasermembranen als Belüftungseinheit

Bei der Kultivierung mit *Chaetomium globosum*, die hoch angeimpft waren (50 bis 75%), traten erhebliche Probleme bei der Sauerstoffversorgung auf. Bei Belüftung über eine Edelstahlnadel war der Sauerstoffübergang in das Medium sehr gering. Bei Verwendung einer Fritte wurde diese oft mit Myzel bewachsen und verstopfte leicht. Es wurde die Eignung einer Hohlfasermembran aus Polypropylen als Belüftungseinrichtung für Kultivierungen von *Chaetomium globosum* untersucht.

Dazu wurde eine Hohlfasermembran als Belüftungseinheit in eine Spinnerflask eingebaut (5.3.2.4). Anschließend wurde sie mit 800 mL Medium gefüllt, mit einer 72 h alten Submerskultur von *Chaetomium globosum* angeimpft (Animpfverhältnis 50%) und mit 0,21 vvm Belüftung kultiviert. Zur Schaumvermeidung wurde Contraspum zugegeben. 72 h

lang konnte ein Sauerstoffgehalt von 5 bis 7 mgL<sup>-1</sup> aufrecht gehalten werden, obwohl die Kulturbrühe schon sehr viskos war. Durch die fein verteilten Luftbläschen kam es jedoch zu einer starken Schaumbildung. Mit der Hohlfasermembran konnten hochviskose Submerskulturen von *Chaetomium globosum* ausreichend belüftet werden, so dass jederzeit Sauerstoffzehrungen aufgenommen werden konnten.

Diese Belüftungsart sollte während einer Überschichtung der Submerskultur mit n-Decan und Valencen-Zugabe angewendet werden. In zwei Spinnerflasks wurden 600 mL Medium, 200 mL n-Decan, Valencen (maxens<sup>TM</sup> 80% 5.7.2.5, 22 mM) gefüllt und beide Flaschen mit einer 72 h alten Submerskultur von *Chaetomium globosum* angeimpft (Animpfverhältnis 50%) und mit 200 rpm bei 25°C mit einer Belüftungsrate von 0,06 bis 0,28 vvm kultiviert. Die Belüftungsrate wurde manuell eingestellt, dass die Schaumbildung auf einem Niveau gehalten wurde, so dass die Abluftfilter nicht mit Myzel zugesetzt wurden.



**Abb. 3-24 Spinnerflask-Kultivierung von *Chaetomium globosum* nach 96 h mit Belüftung über eine Hohlfasermembran**

Der anfängliche Glucosegehalt von 24 gL<sup>-1</sup> war schon nach 96 h verbraucht, *Chaetomium globosum* wuchs in kleinen Pellets. Nach 72 h konnte ein Gehalt an Biotrockenmasse von ca. 8 gL<sup>-1</sup> bestimmt werden. Die Sauerstoffzehrungen erreichten Werte bis zu 40 µg(Ls)<sup>-1</sup>.

*Chaetomium globosum* wuchs auf der Hohlfasermembran auf (Abb. 3-24). Es konnte kein Nootkaton nachgewiesen werden. Um aufgrund der hohen Gehalte an Biotrockenmasse eine Unterversorgung an (+)-Valencen auszuschließen, wurde nach 24 h die Konzentration an Valencen nochmals um 22 mM erhöht. Nach dieser Dosierung war ebenfalls kein Nootkaton nachweisbar.

Bei der Belüftung mit einer Hohlfasermembran konnten jederzeit Sauerstoffgehalte eingestellt werden, die für eine Aktivitätsmessung benötigt wurden. Durch die Überschichtung der

Submerskultur mit n-Decan konnten linear verlaufende Sauerstoffzehrungskurven gemessen werden und die Schaumbildung konnte etwas verringert werden.

Die Belüftung der Submerskulturen mit der Hohlfasermembran bewirkte eine deutlich bessere Sauerstoffversorgung als im Rührkesselreaktor. *Chaetomium globosum* bewuchs diese Hohlfasermembran gut, wenn hohe Belüftungsraten gewählt wurden. Die Hohlfasermembran wuchs nie komplett zu. Die hohen Gasströme, die bei der Hohlfasermembran notwendig waren, um einen Durchfluss zu erreichen, behinderten offensichtlich die Nootkatonbildung. Aus diesem Grund wurde versucht durch Zudosierung von Stickstoff beliebige Sauerstoffgehalte in den Spinnerflasks einzustellen und gleichzeitig das Zuwachsen der Hohlfasermembran zu verhindern. Es zeigte sich, dass auf diese Weise während Kultivierungen von *Chaetomium globosum* geringe Sauerstoffgehalte realisiert werden konnten und direkt vor den Sauerstoffzehrungsmessungen Sauerstoffgehalte bis zu  $8 \text{ mgL}^{-1}$  eingestellt werden konnten.

#### **3.4.4 Bemerkungen zum Aktivitätsmonitoring in den Spinnerflasks**

Im Schüttelkolben konnte durch die Anwendung von Myzelkonzentraten Gehalte an Nootkaton von  $13 \text{ mgL}^{-1}$  erreicht werden. Bei den Kultivierungen im Bioreaktor (3.5.4.1) konnten maximal  $0,7 \text{ mgL}^{-1}$  Nootkaton nachgewiesen werden. Im Falle der Biotransformation von (+)-Valencen durch ein Myzelkonzentrat von *Chaetomium globosum*, welches höhere Ausbeuten an Nootkaton ermöglichte (ca.  $3 \text{ mgL}^{-1}$ ), konnte ein extrem schlechter Sauerstoffeintrag in den Bioreaktor bedingt durch die hohe Viskosität beobachtet werden.

Bei den Versuchen in den Schüttelkolben waren keine *in situ*-Sauerstoffzehrungsmessungen ohne Überschichtung möglich. Die Sauerstoffzehrungsmessungen im Bioreaktor wurden in Submerskulturen mit überstehendem Gasraum durchgeführt. Durch den Einsatz von sauerstoffundurchlässigen Überschichtungen konnte die Nachdiffusion von Sauerstoff größtenteils verhindert werden, so dass fast nur das Zehrungsvermögen der Submerskultur erfasst wurde. Bei annähernd voll gefüllter Spinnerflask oder Bioreaktor konnte der Sauerstoffeintrag über die Flüssigkeitsoberfläche meist vernachlässigt werden. Sonst war der Wert der Sauerstoffzehrung von der Rührerdrehzahl abhängig, da bei höheren Rührerdrehzahlen mehr Sauerstoff eingetragen wurde. Die Unabhängigkeit des Messwertes der Sauerstoffmessung von der Rührerdrehzahl in Gegenwart von Miglyol (Tab. 3-14) oder n-Decan belegte, dass Eindiffundieren von Sauerstoff verhindert wird. Es war möglich, die Messung unter optimalen Bedingungen durchzuführen und gleichzeitig eine *in situ*-Produktabtrennung vorzunehmen.

In der Literatur finden sich Beispiele zum Aktivitätsmonitoring für Mikroorganismen. Zur Erhöhung der Ausbeute an Pneumocadin, das in Kultivierungen mit *Clarea lozoyensis* hergestellt werden kann, wird ein Analyt-Monitoring mit Hilfe von Infrarot-Spektroskopie angewendet (Pollard et al. 2001). Bei der Hydroxylierung von Toluol mit *Pseudomonas putida* UV4 wird die Dosierung des toxischen Substrates von der Sauerstoffverbrauchsrate abhängig gemacht (Carragher et al. 2001). Je nach Toxizität der verwendeten Substrate kann die Messung der Sauerstoffzehrung bei Biotransformationen mit höheren Pilzen eingesetzt werden, dies hängt jedoch von der Schnelligkeit des Wachstums (und des Metabolismus) des eingesetzten Mikroorganismus ab.

Die Hydroxylierung von Progesteron durch *Aspergillus ochraceus* im Bioreaktor wurde bereits in einem Zwei-Phasen-System untersucht (Ceen et al. 1988). Durch die Extraktion von Terpenen könnte eine aktivitätsmindernde Wirkung verhindert werden. Insbesondere Nootkaton könnte vor weiterer Oxidation durch *Chaetomium globosum* geschützt werden (*online*-Abtrennung). Die Anwesenheit einer zweiten Phase begünstigt gleichermassen die Sauerstoffzehrungsmessung, da das Eindiffundieren von Sauerstoff während der Messung verhindert wird.

#### Zwischenzusammenfassung 3.4:

- Bei hohen Belüftungsraten konnte keine Bildung von Nootkaton nachgewiesen werden.
- Unterschiedliche Morphologien bewirkten verschiedene Wachstums- und Pelletformen von *Chaetomium globosum*, welche die Reproduzierbarkeit einschränkten.
- Wie durch das Aktivitätsmonitoring gezeigt werden konnte, wirkte (+)-Valencen nicht komplett inhibierend auf *Chaetomium globosum*, es wurden keine letalen Substratkonzentrationen erreicht.
- Durch die Belüftung der Kulturen über eine Hohlfasermembran und Zudosierung von Stickstoff konnten trotz der hohen Viskosität der Kulturbrühe bei hohen Gehalten an Biomasse beliebig hohe Sauerstoffkonzentrationen eingestellt werden.

### **3.5 Kultivierung im Bioreaktor**

#### **3.5.1 Motivation zur Durchführung von Kultivierungen im Bioreaktor**

Im Hinblick auf eine industrielle Umsetzung der behandelten Biotransformationen wurden parallel zu den Aktivitätsuntersuchungen Kultivierungen im Labormaßstab in zwei Bioreaktoren (5.3.2) durchgeführt. Auf diese Weise konnten zum einen geeignete Kultivierungsbedingungen für *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* ermittelt, zum anderen aber Einsatzort und -bedingungen des Aktivitätssensors konkretisiert werden. Mit dieser Vorgehensweise konnten noch während der Entwicklung des Sensors grundlegende Eigenschaften bestimmt werden und bereits im Schüttelkolben etablierte Messverfahren unter möglichst realitätsnahen Kultivierungsbedingungen geprüft werden. Von den im 2 L-Maßstab durchgeführten Kultivierungen im Bioreaktor (5.3.2) sollen hier lediglich die wichtigsten Aspekte auszugsweise dargestellt werden.

Da die Membranen der Clark-Elektroden in den Bioreaktoren oft von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* bewachsen wurden, konnten interne Messungen der Sauerstoffzehrung nicht immer durchgeführt werden. Die Versuche in den Spinnerflasks (3.4) haben gezeigt, dass die Anwendung von respirometrischen *in situ* Messungen über faseroptische Sauerstoffsensoren in Bioreaktoren möglich ist. Im folgenden Kapitel stand die Optimierung der Kultivierungsparameter (z.B. Begasungsrate, Rührerdrehzahl etc.) und anschließend die Optimierung der Ausbeute an Transformationsprodukten im Vordergrund.

#### **3.5.2 Allgemeine Beobachtungen bei Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* im Bioreaktor**

Aufgrund der mehr oder weniger stark ausgeprägten Pelletbildung der verwendeten höheren Pilze (*Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum*) konnten trotz intensiver Bemühungen zur Homogenisation der Submerskultur jegliche Probenahmen nicht repräsentativ durchgeführt werden. Die Pellets wuchsen im Gegensatz zu den Kultivierungen im Schüttelkolben in unterschiedlichen Größen heran, welches eine repräsentative Probenahme zusätzlich erschwerte. Dennoch erlauben es die Messwerte, Aussagen über Tendenzen des Kultivierungsverlaufs und über die Problematik der Kultivierungen zu treffen.

Die Schaumbildung war bei niedrigeren Rührerdrehzahlen schwächer, konnte jedoch nie ganz verhindert werden. Myzelstücke wurden mit den Luftblasen an die Oberfläche getragen. Durch diese Flotationseffekte bildete sich ein Schaum, in dem die Myzelreste nach einiger Zeit fest

zusammenwachsen. Diese Biomasse, im Folgenden als Gasphasenmyzel bezeichnet, breitete sich oft im gesamten Kopfraum aus.

Es zeigte sich sehr schnell, dass der Glucosegehalt während einer Kultivierung von *Pleurotus sapidus* nicht zur quantitativen Auswertung herangezogen werden konnte, da er über mehrere Tage nur wenig abnahm. Obwohl bei *Chaetomium globosum* ein stärkerer Glucoseverbrauch zu beobachten war, wurde der Glucoseverbrauch nur für qualitative Aussagen herangezogen. Die angegebenen Gehalte an Biotrockenmasse und Glucose (vgl. 5.7.1) sind nur als qualitative Anhaltspunkte zu verstehen.

Solange die Clark-Elektroden noch nicht zugewachsen waren, wurden Messungen der Sauerstoffzehrung in den Bioreaktoren durchgeführt. Falls die Morphologie und die Probenahme es erlaubte, möglichst repräsentative Proben zu ziehen, wurden externe Sauerstoffzehrungen über das Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät (5.6.2) bestimmt. Diese sind jedoch nur bedingt mit den intern bestimmten Sauerstoffzehrungen vergleichbar, da eventuelles Gasphasenmyzel nicht erfasst wurde und die Kulturbrühe im Bioreaktor nicht vom überstehenden Luftraum abgetrennt war.

### **3.5.3 Kultivierungen mit *Pleurotus sapidus* in Bioreaktoren**

#### *3.5.3.1 Rieselbett-Kultivierungen von *Pleurotus sapidus**

Es wurde der Versuch durchgeführt, *Pleurotus sapidus* in einem selbstkonstruierten Rieselbettreaktor (5.3.2.3) ohne mechanische Beanspruchung zu kultivieren.

Die Belüftung erfolgte über eine Fritte, die direkt unter dem Rieselbett eingebaut war. Proben wurden nur aus der flüssigen Phase (Kultivierungsmedium) genommen, die sich im unteren Teil des Reaktors sammelte.

Hier soll eine Rieselbett-Kultivierung von *Pleurotus sapidus* beispielhaft aufgeführt werden. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tab. 3-27 angegeben.

**Tab. 3-27 Kultivierungsparameter der Rieselbett-Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit (+)-Limonen-Dosierung**

<b>Bioreaktor</b>	<b>Rieselbettreaktor</b>
Füllmaterial	Bimssteinchen (0,5-0,8 mm Durchmesser)
Medium	300 mL Medium
Inokulum	<i>Pleurotus sapidus</i> (264 h alt), ungeturraxt
Animpfverhältnis	15% (bezogen auf das Medium)
Belüftung	20 Lh <sup>-1</sup> Druckluft
(+)-Limonendosierung	Vorratsgefäß in der Zuluft
Durchflussrate	10-40 mLmin <sup>-1</sup> Medium, je nach Durchfluss im Rieselbett
Kultivierungsdauer	480 h

Je 1 mL (+)-Limonen wurde nach 409, 432 und 457 h in ein Vorratsgefäß (5.4.2.1), durch das die Druckluft strömte, gegeben. Nach 432 h konnten maximal 0,3 mgL<sup>-1</sup> Carvon im Medium nachgewiesen werden.

*Pleurotus sapidus* zeigte augenscheinlich ein besseres Wachstum im Vergleich zur Submerskultur, so dass meist schon nach 120 h Kultivierungsdauer das Füllmaterial dicht mit Myzel bewachsen war. Durch eine Erhöhung der Viskosität des Mediums staute sich das Medium nach 450 h über der Füllung auf, so dass die Kultivierung nach 480 h abgebrochen wurde. Aufgrund der Verblockung des Rieselbettes, der Tatsache, dass die Gehalte an Biotrockenmasse nicht bestimmt werden konnten, und sich die Aktivitätsmessung sehr schwierig gestaltete, wurden die Rieselbett-Kultivierungen nicht weiter verfolgt.

#### Zwischenzusammenfassung 3.5.3.1:

- Bei den Kultivierungen im Rieselbettreaktor zeigte sich, dass *Pleurotus sapidus* das Rieselbett völlig bewuchs, so dass die Aktivitätsmessung schwierig durchzuführen war.
- Obwohl für *Pleurotus sapidus* augenscheinlich bessere Wachstumsbedingungen vorherrschten, wurden überwiegend Submers-Kultivierungen untersucht, um die Anwendbarkeit des Sensorsystems zu überprüfen.

### 3.5.3.2 Submerskultivierungen von *Pleurotus sapidus* im Bioreaktor

Bei den Submerskultivierungen von *Pleurotus sapidus* wurde versucht, optimale Parameter für eine Biotransformation von (+)-Limonen zu bestimmen. Dabei wurde die Drehzahl, die Belüftungsrate und die Art der Zugabe an (+)-Limonen in die Kulturbrühe (flüssig/gasförmig) variiert.

Besonders bei Rührerdrehzahlen von 500 bis 800 rpm wurde bei *Pleurotus sapidus* beobachtet, dass das Medium viskoser wurde. Die Rührerdrehzahl von 100 rpm wurde für Kultivierungen mit *Pleurotus sapidus* gewählt, um die mechanische Belastung möglichst gering zu halten und dennoch eine gute Vermischung des Bioreaktorinhaltes zu gewährleisten.

Bei der Variation der Animpfmenge zeigte sich, dass bei Animpfverhältnissen über 30% eine starke Schaumbildung einsetzte, so dass oft der gesamte Kopfraum mit Schaum gefüllt wurde. Um dies zu umgehen, insbesondere um die Gefahr einer möglichen Verblockung des Abluftfilters durch den Schaum zu verhindern, wurden Animpfverhältnisse von 10 bis 15% gewählt. Auf diese Weise konnte eine zu starke Schaumbildung verhindert werden.

Bei der Biotransformation von (+)-Limonen durch *Pleurotus sapidus* bewirkten sowohl flüssige als auch gasförmige Zugaben eine Biotransformation zu Carvon, aber aufgrund der hohen Belüftung wurden das Substrat und teilweise das Produkt (Carvon) mit der Abluft entfernt. Beispielhaft sei hier eine Kultivierung mit Zugabe von (+)-Limonen (flüssig) direkt in die Kulturbrühe angeführt, deren Parameter in Tab. 3-28 dargestellt sind.

**Tab. 3-28 Kultivierungsparameter der Submers-Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit Dosierung von flüssigem (+)-Limonen**

<b>Bioreaktor</b>	<b>Infors HT- ISF 100</b>
Medium	1,7 L Medium
Inokulum	<i>Pleurotus sapidus</i> (480 h alt), geturraxt
Animpfverhältnis	15%
Rührerdrehzahl	100 rpm
Belüftungsrate	0,29 vvm
Antischaummittel	-
Terpendosierung	(+)-Limonen-Zugabe über Spritze direkt in den Bioreaktor
Kultivierungsdauer	240 h

Die Zugaben an (+)-Limonen sowie die Carvon- und Glucosegehalte sind in Tab. 3-29 angegeben.

**Tab. 3-29 Carvon- und Glucosegehalte sowie Konzentrationserhöhungen an (+)-Limonen während der Submers-Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit Dosierung von flüssigem (+)-Limonen**

	Gehalt		Konzentrationserhöhung
Zeit	an Carvon	Glucose- gehalt	an (+)-Limonen
h	mgL <sup>-1</sup>	gL <sup>-1</sup>	mM
0	n.b.	22,5	0
30	n.b.	19,9	4
47	0,07	20,6	0
147	n.b.	25,9	4
166	0,08	16,1	0
174	n.b.	17,9	4
191	0,55	14,7	0
198	n.b.	n.b.	4
215	3,17	15,7	0
226	n.b.	n.b.	4
238	5,00	17,1	4
242	3,73	17,5	0

Der Gehalt an Biotrockenmasse nach 242 h Kultivierung betrug 4,94 gL<sup>-1</sup>. Mit der Zugabe an (+)-Limonen in flüssiger Form konnten Gehalte an Carvon bis zu 5 mgL<sup>-1</sup> (nach 238 h) während einer Biotransformation mit *Pleurotus sapidus* nachgewiesen werden. Bei Dosierungen von (+)-Limonen über die Gasphase konnte Carvon nur in Spuren (maximal 0,01 mgL<sup>-1</sup>) nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Sauerstoffzehrung, die sich für das Aktivitätsmonitoring im Schüttelkolben (externe Messung s. 3.3) und in Spinnerflask-Kultivierungen (interne Messung s. 3.4) als geeignet herausgestellt hatte, wurde während der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* im Bioreaktor untersucht.

Während der Kultivierung konnte die Sauerstoffzehrung über die interne Sauerstoffelektrode bestimmt werden (5.6.1 und 5.6.3), sofern diese nicht mit Myzel bewachsen war. Zur Umrechnung der Steigungen von %h<sup>-1</sup> in mg(Lh)<sup>-1</sup> wurde angenommen, dass die Kulturbrühe bei 25°C unter 100% Sauerstoffsättigung 8,5 mgL<sup>-1</sup> gelösten Sauerstoff enthält (Tab. 3-30).

**Tab. 3-30** Berechnete Sauerstoffzehrungen bei der Submers-Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit Dosierung von (+)-Limonen (über die Gasphase)

Zeit h	Anwesenheit von Limonen	Sauerstoffzehrung mg(Lh) <sup>-1</sup>
50	ohne	1,28
70	ohne	1,59
144	ohne	4,89
147	mit	0,26
193	ohne	4,55

Die gemessenen Sauerstoffzehrungen ohne (+)-Limonen stiegen im Verlauf der Kultivierung von 1,28 mg(Lh)<sup>-1</sup> auf 4,89 mg(Lh)<sup>-1</sup>. Nach der Dosierung von (+)-Limonen nach 146 h fiel die Sauerstoffzehrung auf einen Wert von 0,26 mg(Lh)<sup>-1</sup> ab. Die Aktivität von *Pleurotus sapidus* wurde durch Zugabe von (+)-Limonen geringer. Ca. 48 h nach dieser Zugabe wurde wieder ein Wert von 4,55 mg(Lh)<sup>-1</sup> erreicht. Die ursprüngliche Aktivität wie ohne (+)-Limonen-Zusatz wurde wieder erreicht. Die Messungen der Sauerstoffzehrung mit der internen Clark-Elektrode zeigten ähnliche Ergebnisse wie die in den Schüttelkolben. Durch Zugabe von (+)-Limonen zu *Pleurotus sapidus* wurde die Sauerstoffzehrung im Bioreaktor vollständig gehemmt.

Weitere Kultivierungen zeigten vergleichbare Ausbeuten an Carvon. Da das Hauptaugenmerk dieses Forschungsprojektes jedoch auf die Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton durch *Chaetomium globosum* gelegt wurde, wurde die Optimierung der Ausbeuten an Carvon durch *Pleurotus sapidus* nicht weiter verfolgt.

### 3.5.4 Submers-Kultivierungen von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor

Da bis jetzt in der Literatur keine Kultivierungen mit *Chaetomium globosum* im Bioreaktor beschrieben worden sind, wurde *Chaetomium globosum* zunächst ohne Zugabe von (+)-Valencen kultiviert (3.5.4.1), um die Kultivierungsparameter für das optimale Wachstum zu ermitteln. Anschließend wurde überprüft, welche morphologischen Besonderheiten sich in Gegenwart von (+)-Valencen im Bioreaktor zeigten (3.5.4.2), bevor die Transformationsleistung von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor überprüft wurde.

#### 3.5.4.1 Bestimmung geeigneter Parameter für Kultivierungen von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor (ohne Zusatz von (+)-Valencen)

Als geeignete Animpfverhältnisse wurden für die Kultivierung von *Chaetomium globosum* 10-20% ermittelt. Im Vergleich zu den Kultivierungen in Schüttelkolben wurden bei der Kultivierung im 2 L-Bioreaktor ähnliche Gehalte an Biotrockenmasse (nach 190 h im Bioreaktor ca.  $8 \text{ gL}^{-1}$ ) erreicht, die Pellets wurden mit 1 bis 2 cm Durchmesser größer als im Schüttelkolben (1 bis 2 mm).

Bei Rührerdrehzahlen von 500 rpm, schäumte die Kultivierungsbrühe so stark, dass der Abluftfilter des Bioreaktors oft nach ca. 24 h verblockte. Durch die Dosierung von Antischaummittel (Contraspum) konnte die Schaumbildung nicht komplett verhindert werden. Aus diesem Grund erwiesen sich Rührerdrehzahlen von 100 rpm zu Beginn der Kultivierung als vorteilhaft, aber aufgrund der steigenden Gehalte an Biotrockenmasse konnte die Kultivierungsbrühe gegen Ende der Kultivierung mit einer Rührerdrehzahl von 100 rpm nicht mehr homogen durchmischt werden. Als optimale (konstante) Rührerdrehzahl für die gesamten Prozess wurde schließlich 250 rpm für Submerskulturen von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor ermittelt. Es konnte beobachtet werden, dass bei identischen Bedingungen unterschiedliche Morphologien ausgebildet wurden. Dieses Phänomen wurde schon bei den Spinnerflask-Kultivierungen beobachtet (Abb. 3-23).

Im Verlauf der Kultivierung von *Chaetomium globosum* färbte sich das Medium stark dunkel und der pH-Wert nahm auf 3,5 ab. Durch geringere Belüftungsraten sollte das sich allmählich ausbildende Gasphasenmyzel von *Chaetomium globosum* verringert werden, da bei geringeren Belüftungsraten die Menge der aufsteigenden Bläschen (und somit die Flotationswirkung) geringer war.

#### 3.5.4.2 Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton durch *Chaetomium globosum* im Bioreaktor

Bei der (+)-Limonen-Transformation mit *Pleurotus sapidus* (3.5.3 und 5.4.2.1) ist die Zugabe des Substrates über die Gasphase möglich, da (+)-Limonen ausreichend flüchtig ist. Es sollte überprüft werden, ob diese Dosierungsart im Falle von (+)-Valencen ebenfalls anwendbar ist.

Wurde (+)-Valencen in das Glasreservoir in der Zuluft gegeben, wurde augenscheinlich kein (+)-Valencen über die Zuluft in den Bioreaktor überführt. In der Submerskultur konnte kein (+)-Valencen nachgewiesen werden und dessen Menge im Glasreservoir nahm während der gesamten Kultivierungsdauer nicht ab. (+)-Valencen ist nicht flüchtig genug, um über die

---

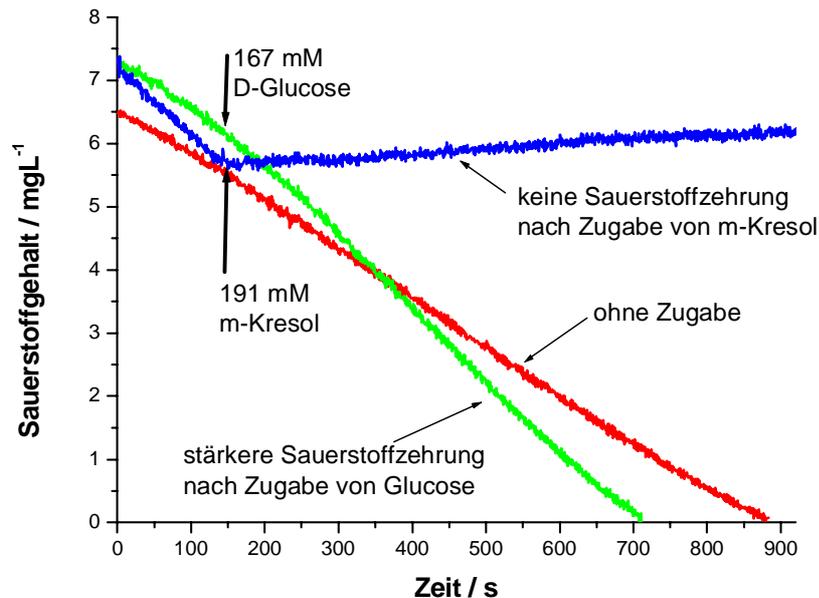
Zuluft zugeführt zu werden. Die direkte Zugabe von flüssigem (+)-Valencen in das Kultivierungsmedium wurde als Dosierungsart ausgewählt.

In den Biotransformationsversuchen bei Submerskulturen von *Chaetomium globosum* in Schüttelkolben (3.1.3) und in den Spinnerflasks (3.4.3) stellte sich heraus, dass die Ausbeute an Nootkaton umso höher war, je höher die Biomasse der Submerskultur war. Die durchgeführten Kultivierungen im Bioreaktor zeigten jedoch, dass sich die Kultivierungen umso schwieriger gestalteten, je höher die Gehalte an Biomasse waren. Bei höheren Belüftungsraten wurden geringere Gehalte an Nootkaton gefunden. Bei einer Belüftungsrate von 0,41 vvm konnten maximal  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  Nootkaton im Medium nachgewiesen werden, bei einer Belüftung von 0,09 vvm wurde ein Gehalt von ca.  $0,7 \text{ mgL}^{-1}$  Nootkaton im Medium erreicht (bei vergleichbarem Animpfverhältnis).

Bei einer Kultivierung mit täglicher Zugabe von 0,6 mM (+)-Valencen zeigte *Chaetomium globosum* ein schlechteres Wachstum als bei der Kultivierung ohne Zugabe von (+)-Valencen (vgl. 3.3.11), was sich deutlich im Glucoseverbrauch äußerte. Die Glucose war bei einem Animpfverhältnis von 10% erst nach 260 h verbraucht. Ohne (+)-Valencenzusatz war die Glucose bei einem Animpfverhältnis von 3% schon nach 140 h verbraucht. Während der Kultivierung unter Zusatz von (+)-Valencen stieg der pH-Wert von 6 auf 7,5 an. Bei Zusatz von (+)-Valencen bildete sich ein Gasphasenmyzel aus, das fast den gesamten Kopfraum in Anspruch nahm und die Einbauten komplett umwuchs.

Nachdem bei einer Kultivierung von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor nach ca. 96 h die gesamte Glucose verbraucht war, wurden Sauerstoffzehrungskurven im Bioreaktor aufgenommen (5.6.3). Es konnte eine Sauerstoffzehrung nachgewiesen werden, eine quantitative Auswertung war jedoch nicht aussagekräftig.

Da die Sauerstoffelektrode im Bioreaktor nach 140 h komplett zugewachsen war und sich der Bewuchs durch Rühren nicht ablösen ließ, wurde die Sauerstoffzehrung extern aufgenommen. Die Sauerstoffzehrung lag im Bereich von  $36,1 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$  nach 146 h bis  $7,6 \mu\text{g(Ls)}^{-1}$  nach 166 h. In Dosierungsversuchen wurde die Auswirkung von Glucose- bzw. m-Kresol-Zugaben während der Messung der Sauerstoffzehrung untersucht (Abb. 3-25).



**Abb. 3-25** Externe Messung der Sauerstoffzehrung und Dosierungsversuche an einer Probe (nach 167 h) einer Submers-Kultivierung von *Chaetomium globosum*

Analog zu den in 3.3.3.4 dargestellten Ergebnissen bestätigten diese Dosierungsversuche, dass im Falle einer Lagerung von *Chaetomium globosum* in glucosefreiem Medium die Sauerstoffzehrung durch Zugabe von Glucose erhöht werden kann. Die Inaktivierung des Organismus durch m-Kresol, welche bestätigte, dass die Sauerstoffzehrungen von lebendem *Chaetomium globosum* herrührten, konnte hier gezeigt werden.

Wie schon bei den Aktivitätsmessungen im Schüttelkolbenmaßstab (3.3.11) beobachtet, ist *Chaetomium globosum* in Gegenwart von (+)-Valencen aktiv und zeigte eine Sauerstoffzehrung, die im Verlauf der Kultivierung anstieg (nach 164 h:  $32 \mu\text{g}(\text{Ls})^{-1}$ ).

Da bei den Spinnerflask-Kultivierungen beobachtet wurde, dass sich eine hohe Belüftungsrate negativ auf das Transformationsvermögen von *Chaetomium globosum* auswirkten, wurde die Nootkatonbildung im Bioreaktor bei verschiedenen Belüftungsraten untersucht. Aufgrund unterschiedlicher Morphologien waren die Ergebnisse der einzelnen Kultivierungen nicht unmittelbar vergleichbar. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass bei niedrigen Belüftungsraten tendenziell mehr Nootkaton gebildet wurde. Hier soll beispielhaft folgende Kultivierung (Tab. 3-31) dargestellt werden, in der die Nootkatongehalte sowie in- und externe Sauerstoffzehrung bestimmt wurden.

**Tab. 3-31 Kultivierungsparameter der Submers-Kultivierung von *Chaetomium globosum* mit Dosierung von flüssigem (+)-Valencen**

<b>Bioreaktor</b>	<b>Infors HT- ISF 100</b>
Medium	1,75 L Medium
Inokulum	<i>Chaetomium globosum</i> (360 h alt)
Animpfverhältnis	15%
Rührerdrehzahl	250 rpm
Belüftungsrate	0,09 vvm
Antischaummittel	-
Terpendosierung	(+)-Valencen
Kultivierungsdauer	192 h

Durch die geringe Belüftungsrate von 0,09 vvm trat eine geringe Schaumbildung auf. Während der Kultivierung wurden Sauerstoffzehrungskurven extern über das Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät und mit der Sauerstoffelektrode im Bioreaktor aufgenommen. In der folgenden Tabelle sind die Konzentrationserhöhungen an (+)-Valencen, die intern bestimmten Sauerstoffzehrungskurven und die bestimmten Nootkatongehalte zusammengefasst.

**Tab. 3-32 Externe und interne Sauerstoffzehrungen und Nootkatongehalte bei der Submers-Kultivierung von *Chaetomium globosum***

<b>Zeit</b>	<b>Konzentrationserhöhung</b>	<b>Nootkaton-</b>	<b>Externe</b>	<b>Interne</b>
<b>h</b>	<b>von (+)-Valencen</b>	<b>gehalt</b>	<b>Sauerstoffzehrung</b>	<b>Sauerstoffzehrung</b>
	<b>mM</b>	<b>mgL<sup>-1</sup></b>	<b>µg(Ls)<sup>-1</sup></b>	<b>µg(Ls)<sup>-1</sup></b>
50	0	n.b.	3,3	n.b.
52	0	n.b.	n.b.	5,13
70	1,2	n.b.	24,2	n.b.
73	0	n.b.	n.b.	9,05
95	0	n.n.	78,5	14,09
96	6,9	n.b.	n.b.	n.b.
126	6,9	0,12	6,5	n.b.
143	0	0,24	3,0	9,25
149	2,3	n.b.	n.b.	n.b.
167	2,3	0,71	3,7	5,89
191	0	0,67	n.b.	n.b.

Externe Sauerstoffzehrungskurven wurden bei 50, 70, 95, 126, 143 und 167 h aufgenommen. Die extern und intern gemessenen Sauerstoffzehrungen sind nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Zum einen konnten die Proben nur aus der flüssigen Phase genommen werden, so dass das Gasphasenmyzel bei den externen Messungen unberücksichtigt blieb. Zum anderen wurde die interne Messung ohne Überschichtung der Submerskultur mit einer sauerstoffundurchlässigen Schicht durchgeführt. Sie bezieht sich folglich auf den gesamten Reaktorinhalt. Die Zugabe von 1,2 mM (+)-Valencen nach 70 h war bei der vorliegenden Kultivierung nicht ausreichend, um eine Abschwächung in der Aktivität oder eine Nootkatonbildung festzustellen, so dass die Konzentration an (+)-Valencen nach 96 und nach 126 h nochmals um je 6,9 mM erhöht wurde (nach 149 bzw. 167 h jeweils um 2,3 mM (+)-Valencen erhöht). Die Glucose war nach etwa 143 h verbraucht. Nach einer Kultivierungsdauer von 167 h konnten maximal  $0,71 \text{ mgL}^{-1}$  Nootkaton bei einer Biotrockenmasse von ca.  $6,7 \text{ gL}^{-1}$  erreicht werden. Durch weitere Variationen der Kultivierungsparameter konnte die Ausbeute an Nootkaton im Bioreaktor nicht erhöht werden. Höhere Konzentrationen an (+)-Valencen zeigten im Gegensatz zu den Spinnerflask-Kultivierungen keine Auswirkungen auf die Bildung von Nootkaton.

### 3.5.4.3 Bemerkungen zur Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton durch *Chaetomium globosum* im Bioreaktor

Im Falle der Biotransformation von (+)-Valencen zu Nootkaton durch *Chaetomium globosum* konnten ebenfalls Sauerstoffzehrungen bestimmt werden. War die Membran der Clark-Elektrode nicht bewachsen und das Gasphasenmyzel vernachlässigbar, zeigten die gemessenen Sauerstoffzehrungen gute Korrelation mit den extern bestimmten Sauerstoffzehrungen. Bei Kultivierungen von *Chaetomium globosum* ohne (+)-Valencen sank der pH-Wert stark ab (typischerweise unter 4), dagegen stieg er in Anwesenheit von (+)-Valencen bis zu einem Wert von 7,5 an. (+)-Valencen kann im Gegensatz zu (+)-Limonen nicht über die Gasphase zudosiert werden. Submerskulturen von *Chaetomium globosum* neigen stark zur Schaumbildung, die entweder durch Zugabe von Contraspum oder (+)-Valencen verringert werden musste. Verringerte man die Rührerdrehzahl, kam es in den Aussenbereichen des Bioreaktors zu Zonen, in denen keine Durchmischung des Mediums mehr stattfand. Mit einer in glucosefreiem Medium gelagerten Kultur von *Chaetomium globosum* ließen sich Dosierungsversuche durchführen, dabei entstanden ähnliche Ergebnisse wie in den Schüttelkolben. Eine Dosierung von Glucose erhöhte die Sauerstoffzehrung, während eine

---

Dosierung von m-Kresol die Sauerstoffzehrung völlig zum Erliegen brachte. Im Bioreaktor konnten bei Submers-Kultivierungen Nootkatongehalte bis maximal  $0,7 \text{ mgL}^{-1}$  nachgewiesen werden.

### 3.5.5 Bemerkungen zu den Kultivierungen in den Bioreaktoren

Wie schon bei den Experimenten in Spinnerflasks beobachtet, war die Reproduzierbarkeit der durchgeführten Kultivierungen nicht gegeben (vgl. Abb. 3-23). Dies konnte bei den Kultivierungen im Bioreaktor ebenfalls beobachtet werden, so dass es schwierig ist, allgemeingültige Aussagen zu treffen. Bei Kultivierungen mit *Aspergillus amawori* wurde eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse festgestellt, mit dem beschriebenen Modell konnte vorausgesagt werden, dass es bei hohen Rührerdrehzahlen zur Bildung kleinerer Pellets kam (Cui et al. 1998).

Der Stoffwechsel von höheren Pilzen ist im Vergleich zu Bakterien und Hefen sehr langsam, so dass die Submers-Kultivierungen meist mehrere Tage dauerten. Unter Wachstum versteht man die Zunahme der lebenden Substanz, die in der Regel über die Masse der Zellen bestimmt wird. Das Zeitintervall für die Verdopplung der Zellzahl bezeichnet man als Generationszeit. Bei Bakterien ist das Wachstum einfach zu bestimmen, da die Größe der Bakterienzelle während des Wachstums etwa auf das Doppelte zunimmt und anschließend eine Zweiteilung in zwei Tochterzellen stattfindet. Bei Submerskulturen von höheren Pilzen, die in Form von Pellets wachsen, befindet sich jedoch im Innern des Pellets eine anaerobe Zone, in der kein Wachstum stattfindet (Barberel & Walker 2000). Durch die Tatsache, dass die Pellets nur an der Oberfläche aktiv sind, kann keine Generationszeit angegeben werden.

Die Optimierung der Rührerdrehzahlen und Belüftungsraten für Biotransformationen von Benzaldehyd mit *Saccharomyces cerevisiae* (Isolat VS1) konnten durch Variation der Rührergeometrie erreicht werden (Shukla et al. 2001). Dabei korrelierten der Stoffaustauschkoeffizient und die Respirationsrate im Bioreaktor mit denen, die in Schüttelkolben gemessen wurden. Auf diese Weise konnte das Wachstum und die Biotransformationsrate optimiert werden. Für Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum* waren niedrige Drehzahlen für das Wachstum förderlich, die Rührgeometrie sollte für einen industriellen Prozess weiter verbessert werden. *Pleurotus sapidus* wuchs teilweise auf der Silikonmembran der Sauerstoffelektrode auf. In diesem Fall wurde versucht, den Bewuchs jeweils durch hohe Rührgeschwindigkeiten vor den Messungen abzulösen. Die mit der internen Clark-Elektrode aufgenommenen Sauerstoffzehrungskurven

zeigten keinen linearen Verlauf, bei geringeren Sauerstoffgehalten wurden niedrigere Sauerstoffzehrungen gemessen.

Die Messungen wurden ohne Übersichtung des Mediums mit einer sauerstoffundurchlässigen Schicht durchgeführt. Je geringer der Sauerstoffgehalt in der Kulturbrühe ist, desto höher ist der Konzentrationsgradient zwischen der flüssigen Phase und dem überstehenden Gasraum. Je größer das Konzentrationsgefälle, desto höher ist die Diffusion von Sauerstoff aus dem Luftraum in die Kulturbrühe. Bei der Messung der Sauerstoffzehrung kommt es zu Überlagerungen des Zehrungsvermögens von *Pleurotus sapidus* mit der Eindiffusion von Sauerstoff. Da die Eindiffusion bei niedrigeren Sauerstoffgehalten größer ist, zeigt die Sauerstoffzehrung dort geringere Werte.

Die Gattung *Pleurotus* ist in der Lage, bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen viskositätserhöhende Polymere in das Medium abzugeben (Compere et al. 1980). Bei hohen Rührerdrehzahlen konnte bei Kultivierungen mit *Pleurotus sapidus* eine Erhöhung der Viskosität des Mediums beobachtet werden. Eine Erhöhung der Viskosität des Mediums, die bei Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* beobachtet werden konnte, trat bei den Kultivierungen von *Chaetomium globosum* im Bioreaktor nicht auf. Weiterhin wurde beobachtet, dass (+)-Valencen als Antischaummittel für *Chaetomium globosum* einen ebenso guten Effekt hatte wie Contraspum. Die Schaumbildung konnte jedoch nie ganz verhindert werden.

Bei den Dosierungsversuchen an in Puffer aufbewahrtem *Chaetomium globosum* (vgl. Abb. 3-14) zeigte sich, dass *Chaetomium globosum* in Medium ohne Glucose aktiv (im Sinne einer Sauerstoffzehrung) war.

In der pharmazeutischen und chemischen Industrie werden Feinchemikalien mit Biotransformationen hergestellt. Dabei spielen im Falle der Herstellung mit Ganzzellsystemen die technischen Parameter der Kultivierungen eine entscheidende Rolle für die Kosten und die Produktivität des Prozesses (Straathof et al. 2002). Für einen effizienten Bioprozess müssen die optimalen Kultivierungsparameter im vorliegenden Fall noch erarbeitet werden.

Zwischenzusammenfassung 3.5:

- Kultivierungen im 2 L-Maßstab erwiesen sich bei höheren Gehalten an Biomasse (vgl. Myzelkonzentrate) als schwierig. Aufgrund der starken Schaumbildung und der Bildung von Gasphasenmyzel konnten nur niedrige Belüftungsraten und Rührerdrehzahlen realisiert werden.
- Es zeigte sich, dass nach einiger Zeit die interne Sauerstoffelektrode mit Myzel bewachsen war (von der Wuchsform des Pilzes abhängig). Es konnten zwar noch Messungen durchgeführt werden, aber diese wurden durch das anhaftende lebende Material stark verfälscht.
- Für Langzeitmessungen bei Biotransformationen von höheren Pilzen sind konventionelle Clark-Elektroden zur Messung der Sauerstoffzehrung und Bestimmung der Aktivität nicht geeignet.
- Aufgrund von geringen Ausbeuten und der Kultivierungsprobleme (z.B. Gasphasenmyzel, Schaumbildung und unterschiedliche Morphologien) unter den hier angegebenen Kultivierungsbedingungen müssen für ein up Scale zum industriellen Maßstab noch erhebliche Veränderungen am Prozess-Design vorgenommen werden.

## 4 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten respirometrischen Aktivitätssensor lässt sich der Aktivitätszustand von Submerskulturen von *Chaetomium globosum* während einer Kultivierung verfolgen. Die vorliegenden Ergebnisse belegen die generelle Eignung des respirometrischen Sensors zur Bestimmung der Aktivität terpenttransformierender höherer Pilze. Auf diese Weise können für den Mikroorganismus toxische Bedingungen erkannt und durch entsprechende Maßnahmen beeinflusst werden.

Bekannte Phänomene mit Einfluss auf den physiologischen Aktivitätszustand von Mikroorganismen (Substratmangel, Dosierung von Terpenen und Inhibierungsreagenzien), wurden zur Charakterisierung der Messergebnisse der Sauerstoffzehrung eingesetzt. Es zeigte sich, dass über respirometrische Messungen Veränderungen im mikrobiellen Stoffwechsel augenblicklich registriert werden können. Die Dosierungsversuche verdeutlichten, dass die Messung der Sauerstoffzehrung für Toxizitätstests eingesetzt werden kann. Die angestrebte *online*-Messung direkt in der Kultivierungsbrühe (*in situ*) konnte durch die Anwendung faseroptischer Sauerstoffsensoren verwirklicht werden. Optische Sauerstoffsensoren wurden schon für den Einsatz in der Wasserbiologie (Klimant et al. 1995), in Schüttelkolbenkulturen (Wittmann et al. 2003) und in Mikrotiterplatten (John et al. 2003) eingesetzt. Bei der Respirometrie zur Aktivitätsmessung bei industriellen Bioprozessen sollten faseroptische Sauerstoffsensoren angewendet werden, da diese nicht von Myzel bewachsen werden und somit eine kontinuierliche Messung des Sauerstoffgehaltes möglich ist. Die durchgeführten Aktivitätsmonitorings am Modell von Spinnerflask-Kultivierungen mit Submerskulturen von *Chaetomium globosum* belegen die Eignung des faseroptischen Sauerstoffsensors für Langzeitmessungen. Die bei den Clark-Elektroden beobachteten Probleme, wie z.B. Aufquellen von Silikonmembranen oder Aufwachsen von Pilzmyzel wurden mit dem etablierten System nicht beobachtet. Durch die Anwendung einer Hohlfasermembran konnte die Belüftung in den hochviskosen Submerskulturen verbessert werden, und gleichzeitig *in situ*-Sauerstoffzehrungsmessungen durch hohe Begasungsraten ermöglicht werden. Für die Nootkatonbildung waren geringe Sauerstoffgehalte günstig, die durch Zudosierung von Stickstoff in die Zuluft während der Kultivierung erreicht werden konnten. Der Sauerstoffgehalt konnte auf ein beliebiges Niveau eingestellt werden, und gleichzeitig ein Aufwachsen von *Chaetomium globosum* auf der Hohlfasermembran verhindert werden.

In dieser Arbeit wurden Biotransformationen lipophiler Substrate (Terpene) durch höhere Pilze untersucht. Dabei kam es hauptsächlich auf Aktivitätsunterschiede mit und ohne Terpenzusatz

sowie auf die langfristige Wirkung von Terpenen auf höhere Pilze an. Die Substrattoxizität stellt das Hauptproblem bei den Terpenbiotransformationen dar, im Falle von (+)-Valencen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivität von *Chaetomium globosum* nicht vollständig zum Erliegen kommt.

Die Identifizierung der Produkte und die ausführliche Untersuchung und Optimierung der Kultivierungs- und Transformationsbedingungen für die eingesetzten Mikroorganismen war nicht der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Die biologische Transformationsleistung von *Chaetomium globosum*, aus (+)-Valencen das wirtschaftlich interessante Nootkaton zu bilden, stellte sich unter den gegebenen Bedingungen als limitierend für die Optimierung des Bioprozesses heraus. Die Transformationsleistung, die unter Anwendung von Myzelkonzentraten im Schüttelkolben erzielt wurde, konnte bei Kultivierungen im Bioreaktor nicht erreicht werden.

Kommerzielle Steroid-Biotransformationen werden oft in zwei Stufen durchgeführt. Man unterscheidet eine Phase zur Herstellung von Biomasse und eine Transformationsphase (Smith 1984). Dieses Verfahren könnte für die Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch *Chaetomium globosum* zu höheren Ausbeuten führen. Eine Optimierung der Abtrennung der Produkte, Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Pervaporationsverfahren wären denkbar und müssten auf Anwendbarkeit überprüft werden. Eine neuartige Abtrennung von fungaler Biomasse über einen Filter, der auf der Basis von Ultraschall beruht (Crognale et al. 2002), könnte für eine kontinuierliche Abtrennung von Produkten eingesetzt werden.

Die in der Literatur bekannten Biotransformationen von Steroiden mit höheren Pilzen belegen, dass zur Optimierung eines industriell anwendbaren Prozesses meistens mehrere Jahre Forschungsarbeit investiert werden müssen. Durch die Verwendung von Biotransformationen, deren Vorteil in der Stereoselektivität der Reaktionen liegt, können oft mehrere Stufen in der chemischen Synthese eingespart werden. Da die Kosten für biotechnologische Biotransformationen oft höher sind als für konventionelle chemische Syntheseprozesse, kommt es nur in seltenen Fällen zur Substitution der chemischen Synthese durch biotechnologische Biotransformationsprozesse.

Industrielle Prozesse zur Herstellung von Aromastoffen sind publiziert, z.B. konnte die Biotransformation zur Herstellung von Vanillin optimiert werden (Muheim & Lerch 1999, Muheim et al. 1998). Eine Übertragung der gefundenen Biotransformation von (+)-Valencen in den interessanten Aromastoff Nootkaton durch *Chaetomium globosum* in den industriellen Maßstab wäre mit größeren Anpassungen des Kultivierungssystems an die physiologischen Eigenschaften von *Chaetomium globosum* und Verbesserung der Ausbeuten vielleicht möglich.

---

Hierzu müssten weitere Versuche zur Optimierung der Kultivierung in einem geeigneten Bioreaktor folgen. Die Mikroorganismen für Biotransformationen wurden weitgehend empirisch durch Mutation und Selektion entwickelt, heutzutage ermöglichen gentechnische Methoden eine gezielte Veränderung und Verbesserung der Organismen (Metabolic Engineering). Rekombinante Technologien, die in der Biotechnologie verwendet werden, könnten zur Optimierung des Prozesses in Frage kommen (Muheim et al. 1997, Berger 2000). Die Reaktion der Organismen auf Stressoren, sowie die Ausbildung bestimmter Enzymsysteme kann durch den Einsatz von rekombinanten Pilzstämmen beeinflusst werden (Kreiner et al. 2003). Bei der Gluconsäure-Produktion mit *Aspergillus niger* konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Stamm verglichen mit dem Wildtyp mehr Gluconsäure bildete (El-Enshasy 2003). Wie die mit rekombinanten Organismen hergestellten Produkte deklariert werden müssen, bleibt bis zur Verabschiedung der Neufassung der Verordnung über neuartige Lebensmittel abzuwarten.

Bei Kultivierungen mit rekombinanten Organismen könnten die Aktivitätsmessungen durch den Einsatz von faseroptischen Sauerstoffsensoren *in situ* im Bioreaktor durchgeführt werden. Daraus ergeben sich zukünftige Anwendungsmöglichkeiten für faseroptische Sauerstoffsensoren zur Aktivitätsmessung bei Kultivierungen von höheren Pilzen im Bioreaktor. Der Einfluss von Terpenen ((+)-Valencen und (+)-Limonen) auf höhere Pilze (*Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum*) wurde im Rahmen der Arbeit in mehrtägigen Wachstumsversuchen gezeigt. Daraus folgend ist die Entwicklung eines Aktivitätsmonitors (zur Regelung der Aktivität) für Terpentransformationen denkbar. Eine Aufrechterhaltung der Transformationsaktivität über eine Substratdosierung ist somit bei der untersuchten Biotransformation von „reinem“ (+)-Valencen zu Nootkaton nicht erforderlich, da (+)-Valencen zwar aktivitätsvermindernd, aber nicht vollständig inhibierend wirkt. Bei der Dosierung von (+)-Limonen zeigte sich, dass schon nach 24 h die Sauerstoffzehrung vollständig zum Erliegen kommt, so dass eine Regelung der Substratdosierung über respirometrische Aktivitätsmessungen sinnvoll erscheint. Technische Valencen-Substrate könnten aber mit stark inhibierend wirkenden Substanzen verunreinigt sein (z.B. (+)-Limonen), so dass ein Einsatz einer Regelung der Substratdosierung in diesem Falle erforderlich wäre.

Bei Dosierungen von (+)-Limonen, welches stark inhibierend wirkt, ist eine Regelung der Substratdosierung möglich, aber die getesteten Systeme (höhere Pilze) brauchen eine gewisse Zeit, um auf die veränderten Terpenkonzentrationen zu reagieren (schlechtes Zeitverhalten der Regelstrecke und somit lange Totzeit). Lange Regelstrecken führen oft dazu, dass eine Regelung schwer umzusetzen ist. Würde das Zeitverhalten der Regelstrecke durch den Einsatz

von Mikroorganismen mit schnellerem Stoffwechsel verkürzt (z.B. durch den Einsatz von Bakterien), könnte eine Regelung des Aktivitätsstadiums (Regelgröße) mit Hilfe der respirometrischen Aktivitätsmessung (Messglied) über die Substratdosierung (Stellglied) erreicht werden. Die Entwicklung eines kompletten Bioprozesses bei Einsatz effektiver, einfach zu kultivierenden Terpententransformierer (z.B. rekombinante Bakterienstämme) wäre dann möglich, so dass großindustrielle Umsetzungen von Terpenkohlenwasserstoffen zu wertvollen Aromastoffen ein mögliches Einsatzgebiet des Aktivitätssensors darstellen können. In den letzten Jahren wurden in der chemischen und lebensmittelchemischen Industrie immer mehr biokatalytische Prozesse in chemische Prozessanwendungen eingebracht. In der Frühphase der Biokatalyseforschung haben Ganzzellkatalysatoren eine bedeutende Rolle gespielt, aber nur wenige Reaktionen konnten aufgrund niedriger Spezifität und Aktivität der Wildtyp-Biokatalysatoren in technische Prozesse überführt werden. Heute wird versucht, die Nachteile der Ganzzell-Biotransformationen durch Arbeiten mit aufgereinigten Enzymen zu umgehen. Die Kosten für die Aufreinigung von Enzymen und die damit verbundenen Aktivitätsverluste sind sehr hoch, so dass solche Prozesse nur zur Herstellung hochpreisiger Produkte (z.B. in der Pharmakaherstellung) eingesetzt werden. Moderne, rekombinante Ganzzellbiokatalysatoren, sogenannte „Designer-Bugs“ überwinden die zuvor genannten Nachteile der konventionellen Ganzzellsysteme und der Prozesse mit aufgereinigten Enzymen (vgl. Duetz 2001). Industrielle Biotransformationen mit „Designer-Bugs“ sind in der Biokatalyse bereits ein wertvolles Werkzeug für die „grüne“ Chemie („natürliche Aromastoffe“) im präparativen Maßstab. Die Chancen der Ganzzellbiokatalyse mit höheren Pilzen („Designer-Fungi“) könnten durch den Einsatz von Aktivitätssensoren verbessert werden.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Verwendete Organismen

Es wurden *Pleurotus sapidus* (Schulz. apud Kalchbr.) Sacc. DSMZ (Hübsch) 8266 (P226-1) und *Chaetomium globosum* (DSMZ 1962) verwendet.

### 5.2 Chemikalien

#### 5.2.1 Medienbestandteile

Substanz	Hersteller	Best.Nr.	Herstellerangaben zur Reinheit
$\alpha$ -D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth	6780.2	>99,5%, Ph.Eur.
Agar	Fluka	05039	For microbiology
CuSO <sub>4</sub>	Fluka	2791	p.a.
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Titriplex III	Roth	8043	ROTIPURAN®, p.a.
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Fluka	44944	Puriss. p.a. ACS, 99,0-102% (RT)
Hefeextrakt	Roth	2363.2	Pulv.; f.d. Bakteriologie
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	4873	p.a.
L-Asparagin-Monohydrat	Fluka	11160	>99% (NT)
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck	5886	p.a.
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck	5963	p.a.
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Sigma	7446-20-0	Min. 99,0%

#### 5.2.2 Redoxmediatoren

Substanz	Hersteller	Best.Nr.	Herstellerangeben zur Reinheit
1,2-Naphthochinon	Fluka	70370	Puriss.; >99% (UV)
1,4-Benzochinon	Fluka	12309	Puriss; >99,5% (HPLC)

2,3,5,6-Tetramethyl-p-benzochinon (Durochinon)	Fluka	44620	Purum
2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenylendiamin (3,6-Diamino-durol)	Fluka	32975	Purum, >99,0% (NT)
2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	Aldrich	H:4,680-5	97%
5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinon	Fluka	37790	Pract.; ~ 90-95% (HPLC)
Antrachinon-2,6,disulfonsäure Dinatriumsalz	Fluka	10640	Techn. ~ 70%
Indigocarmin	Fluka	57000	Für Mikroskopie
Kaliumhexacyanoferrat III	Fluka	60300	Puriss.p.a. >99,0%
N,N,N',N' -Tetramethyl-1,4-phenylen- diamin-dihydrochlorid	Fluka	87890	Purum; >97% (AT)
Neutral-Rot	Fluka	72210	Für Mikroskopie
N-Methylphenazoniummethylsulfat (PMS)	Fluka	68600	>99% (N)
Safranin T	Fluka	84120	Für Mikroskopie
Thionin	Fluka	88930	Für Mikroskopie

### 5.2.3 Lösungsmittel

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Best.Nr.</b>	<b>Herstellerangaben zur Reinheit</b>
Dimethylformamid	Roth	6251	>99,7% zur Synthese
Dimethylsulfoxid	Fluka	41644	Puriss. p.a.; >99,5% (GC)
Ethanol	Fluka	24105	96% vol, reinst
Ethylenglycol	Fluka	03750	Puriss. p.a.; >99,5% (GC)
Isooctan	Fluka	59050	Purum, > 99,0% (GC)
Miglyol	Sasol	-	-
n-Decan	Roth	3475.2	>98% olefinfrei
n-Decan-1-ol	Fluka	30610	Purum, ~ 97% (GC)
Oleylalkohol	Fluka	75342	Tech. ~ 50-60% (GC)

### 5.2.4 Terpensubstrate und Standardsubstanzen für die GCMS

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Best.Nr.</b>	<b>Herstellerangaben zur Reinheit</b>
(-)-Carvon	Fluka	22060	Puriss. P.a.; >99,0% (GC)
(+)-Campher	Fluka	21300	Purum; natural; >97% (GC, sum of isomers)
(+)-Limonen	Fluka	62120	Purum ~ 98% (GC)
(+)-Valencen	Fluka	94505	pract. >90% (GC)
Essigsäureethylester	Roth	7336.1	ROTISOLV® HPLC
n-Hexan	Roth	4723.1	ROTIPURAN® >99% p.a., ACS
Nootkaton	Fluka	74437	Puriss. >99% (GC)
Valencen (maxens <sup>TM</sup> , 80%)	Degussa Flavors & Fruit Systems, Grasse, France	-	80% (experimetell bestimmt: ~ 80% (5.7.2.5))
Valencen (maxens <sup>TM</sup> , 60%)	Degussa Flavors & Fruit Systems, Grasse, France	-	60% (experimentell bestimmt: ~ 40% (5.7.2.5))

### 5.2.5 Sonstige Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Best.Nr.</b>	<b>Herstellerangaben zur Reinheit</b>
Aluminiumoxid	Fluka	11029	-
Baysilone-Paste	Roth	0857	-
Contraspum 210 (Silikonöl zur Schaumvermeidung)	Zschimmer & Schwarz, Lahnstein/Rhein	-	-
Diaphragmareiniger (Thioharnstoff HCl)	Ingold	9892	-
Elektrolytlösung Kaliumchlorid 3 mM mit AgCl	Merck	6628351	-
Ethanol	Fluka	24105	96% vol, reinst
Natriumsulfat, wasserfrei	Fluka	71964	Purum for synthesis; >99% (T)

Reaktivierungslösung (2% HF-Lsg., 5% HCl-Lsg.)	Ingold	9895	-
Silikonkautschuk-Verbindung	RS components	692-542	-
Wasserstoffperoxid	Fluka	95302	Purum p.a.; >30% (RT)

## 5.3 Geräte

### 5.3.1 Aktivitätsmessgeräte

#### 5.3.1.1 Galvanostaten/Potentiostaten

Gerät	Software
Autolab PGSTAT 12, Deutsche Metrohm GmbH & Co., Filderstadt, Deutschland	GPES, General Purpose Electrochemical System, Version 4.8, Eco chemie B.V., Utrecht, The Netherlands
PS 6, Meinsberger Potentionstat/Galvanostat, Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg, Deutschland	Psremote für Windows, Version 3.2b, Sensortechnik Meinsberg GmbH, Meinsberg, Deutschland

#### 5.3.1.2 Sauerstoffmessgeräte

Gerät	Software
Faseroptisches Sauerstoffmessgerät MOPS-1 (mikrocontrollergesteuerter optischer portabler Sauerstoffsensoren), Comte – Moderne Analysensysteme GmbH, Hannover, Deutschland	Selbstentwickeltes Programm, Testpoint, Version 3.3, Capital Equipment Cooperation, Billerica, Massachusetts, USA

Fiber-optic oxygen meter Fibox 2 mit sauerstoffsensitiven Folien	PSt 3 Oxyview, Version 4.16, Presens GmbH, Regensburg, Deutschland
SF-PSSt3_GSUP-YOP-L0.5/W0.5, Presens GmbH, Regensburg, Deutschland	
Konventionelle Clark-Elektroden in den Bioreaktoren (siehe 5.3.2)	
Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät mit Respirationskammer (6 mL) aus Glas, Dual Digital Model 20 Rank Brothers Ltd, Cambridge, Großbritannien	Selbstentwickeltes Programm, Testpoint, Version 3.3, Capital Equipment Coperation, Billerica, Massachusetts, USA

### 5.3.2 Bioreaktoren

#### 5.3.2.1 Infors ISF 100

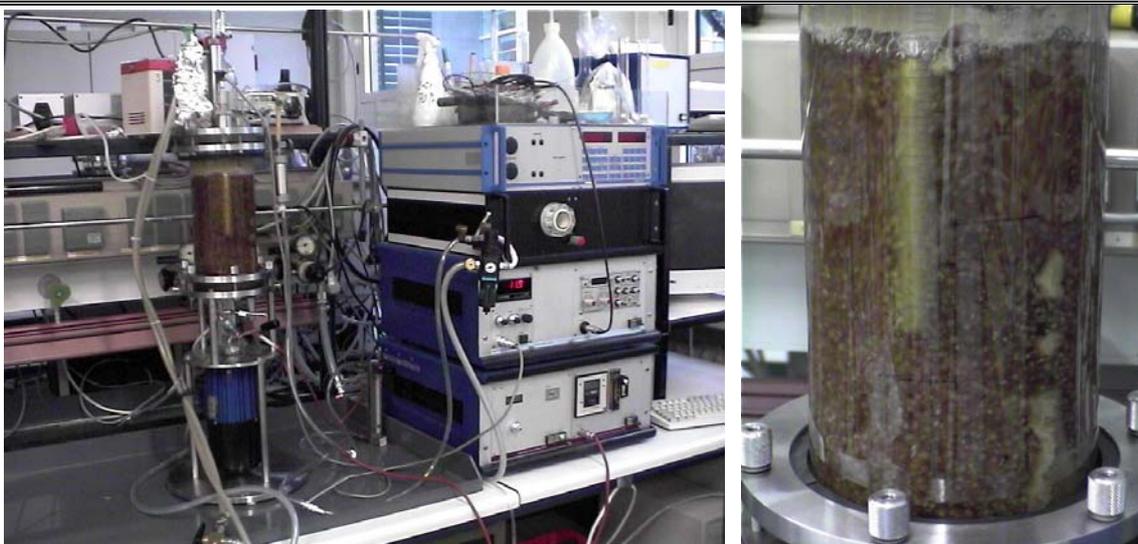
<b>Bioreaktor</b>	<b>Infors HT- ISF 100, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland</b>
Software	Iris NT PRO Version 4.11 Build 469, History Version 4.11 Build 487, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland
Kulturgefäß	2,00 L
Max. Arbeitsvolumen	1,75 L
Sauerstoffelektrode	Ingold 19/25 mm, Nr. 32 275 6701/77299, Steinbach (Taunus), Deutschland
pH-Elektrode	Gelelektrode Nr. 104054481, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Belüftung	Druckluft
Standardbedingungen	25°C



**Abb. 5-1** Infors-Bioreaktor (links) und Pelletbildung von *Chaetomium globosum* im Kulturgefäß (rechts)

### 5.3.2.2 Bioengineering

<b>Bioreaktor</b>	<b>Bioengineering KLF 2000, Bioengineering AG, Wald, Schweiz</b>
Software	BioLogics, Bioengineering AG, Wald, Schweiz
Kulturgefäß	3,7 L
Max. Arbeitsvolumen	2,7 L
Sauerstoffelektrode	Ingold, Nr. 27 22021/73545, Steinbach (Taunus), Deutschland
pH-Elektrode	Gelektrode Nr. 104054481, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Belüftung	Druckluft
Standardbedingungen	25°C



**Abb. 5-2 Bioengineering-Bioreaktor (links) und Pelletbildung von *Chaetomium globosum* im Kulturgefäß (rechts)**

### 5.3.2.3 Rieselbettreaktor

<b>Bioreaktor</b>	<b>Rieselbettreaktor, Eigenbau</b>
Kulturgefäß	1 L Füllmaterial
Füllmaterial	Schaumstoffwürfel (Kantenlänge 1 cm), Porengröße 0,5 mm
Belüftung	Druckluft, sterilfiltriert über PFTE-Membranfilter, Midisart 2000, 0,2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Umwälzpumpe	IKA Schlauchpumpe PA20, Janke & Kunkel
Standardbedingungen	25°C



**Abb. 5-3 Kultivierung von *Pleurotus sapidus* im Rieselbett-Reaktor**

## 5.3.2.4 Spinnerflask

Bioreaktor	Spinnerflask
Kulturgefäß	Bell Flo Spinner System Flask (Kat.-Nr. 1965-61005), 1000 mL Totalvolumen, Bellco Glas, Vineland, USA
Rührer	Bearing Impeller Assembly (Bellco Glas, Vineland, USA), Ika Labortechnik RTC basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Max. Arbeitsvolumen	800 mL
Sauerstoffmessung	Fiber-optic oxygen meter Fibox 2 mit sauerstoffsensitiven Folien (Abb. 5-4), Presens GmbH, Regensburg, Deutschland
Belüftung	Druckluft, sterilfiltriert über PFTE-Membranfilter, Midisart 2000, 0,2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen, Deutschland Zu- und Abluft wurden mit Edelstahlhähnen ausgerüstet, um das System luftdicht abzuschliessen zu können
Belüftungsart	Edelstahlnadel, Edelstahlfritten (2 µm) oder Polypropylenmembran (ACCUREL PP V8/2 HF, 30 cm, Porenweite 0,2 µm, $d_i = 5,5$ mm; $d_a = 8,6$ mm, Membrana, Obernburg, Deutschland)
Abluft	sterilfiltriert über PFTE-Membranfilter
Standardbedingungen	25°C, 200 rpm (bei Biotransformationen)



**Abb. 5-4** Spinnerflask-Kultivierung von *Chaetomium globosum* mit interner Sauerstoffmessung

---

**5.3.3 GCMS**


---

<b>Geräte</b>	<b>GC-17A Gas Chromatograph, Shimadzu, Kyoto, Japan</b> <b>GCMS QP5050 Gas Chromatograph Mass Spectrometer, Shimadzu, Kyoto, Japan</b> <b>AOC-20i Auto injector, Shimadzu, Kyoto, Japan</b> <b>AOC-20s Auto sampler, Shimadzu, Kyoto, Japan</b>
Software	CGMSsolution Version 1.01 Su3A 1999, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
Stationäre Phase	DB 5, J&W Scientific Incorporated, USA VB 5, Valco Bond®, Valco Instruments Co. Inc., Gig Harbor, USA
Säulenlänge	30 m
Säuleninnendurchmesser	0,251 mm
Filmdicke	0,25 µm
Trägergas	Helium
Splitratio	je nach Bedarf 5 oder splitless
Injektortemperatur	220 °C
Detektor	MS, Quadrupol, 70 eV
Detektortemperatur	240°C
Temperaturprogramme	Limonen/Carvon: 50/0/5/150/5 Valencen/Nootkaton: 50/3/5/240/10

---

**5.3.4 Sonstige Laborgeräte**

Auflichtmikroskop	Leica DMRME, Bensheim, Deutschland; Software: ImageAccess V4.0 Release 42, Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz
Autoklav	Varioklav® H+P Dampsterilisator, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
Feuchtebestimmer	Sartorius MA 100, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Glucosemessung	Glucose Analyzer YSI 2700 Select, Version 2.56, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA
Inkubatoren	Brutschrank Heraeus, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland Heraeus ST 5042, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kompressor	Hi Flo Aquarium Air Pump, Double type 7000

---

Kryostat	Kältebad K 20 mit Polystat cc1, Peter Huber Kältemaschinen GmbH, Offenburg-Elgersweier, Deutschland
Leitfähigkeitsmessung	Leitfähigkeitsmessgerät WTW LF 91, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Mikroskop	Olympus BH-2, Olympus Deutschland GmbH, Deutschland
pH-Meter	WTW pH 521, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Photometer	Perkin Elmer 552 Spectrophotometer, Perkin Elmer, Boston, USA Perkin Elmer instruments Lambda 25 UV/VIS Spektrometer; Software: UV Winlab, Perkin Elmer, Boston, USA
Reinstwasseranlage	Elga Purelab ultra, Elga Vivendi Water Systems Deutschland Holding GmbH, Siershahn, Deutschland
Rührer	Ika Labortechnik RTC basic, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Schüttler mit Inkubatorhaube	Certomat R mit Haube Certomat HK, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Stereolupe	Wild M3Z, Heerbrugg, Schweiz; Software: ImageAccess V4.0 Release 42, Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz
Sterilwerkbank	Gelaire®, Flow Laboratories, BSB 3A, Flow Laboratories, Milan, Italien
Ultraturrax	TP 18/10, 170 W, max. 20 000 rpm, Janke & Kunkel, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie, Scientific Industries INC, Bohemia, USA
Waagen	Sartorius CP 2202 S, Sartorius, Göttingen, Deutschland Mettler Toledo AB 204, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Zentrifuge	Centrikon H-401, Kontron Hermle, Schweiz, Rotoren: A8.24 und A6.9

## 5.4 Kultivierung und Biotransformation

### 5.4.1 Submers-Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Chaetomium globosum*

Die Standardnährlösung (SNLH) wurde mit den in Tab. 5-1 angegebenen Bestandteilen angesetzt. Dabei wurde eine Lösung von  $\alpha$ -D(+)-Glucosemonohydrat separat angesetzt ( $150 \text{ gL}^{-1}$ ) und bei  $121^\circ\text{C}$  20 min autoklaviert. Die restlichen Bestandteile wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt (Bestandteile für 1 L Medium wurden in 800 mL gelöst) und mit 1-n-Kaliumhydroxidlösung auf pH 6 eingestellt und ebenfalls autoklaviert. Danach wurde Medium mit 20% der Glucoselösung angesetzt, um die unten angegebene Zusammensetzung zu erhalten. SNLH-Agar enthielt zusätzlich  $15 \text{ gL}^{-1}$  Agar.

**Tab. 5-1**      **Zusammensetzung der Standardnährlösung (SNLH)**

D-Glucose-Monohydrat	$30 \text{ gL}^{-1}$
L-Asparagin-Monohydrat	$4,5 \text{ gL}^{-1}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$1,5 \text{ gL}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$0,5 \text{ gL}^{-1}$
Hefeextrakt	$3 \text{ g L}^{-1}$
Spurenelementlösung	$1 \text{ mL}^{-1}$ (0,1% vol)

Spurenelementlösung:

$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	$80 \text{ mgL}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	$90 \text{ mgL}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$30 \text{ mgL}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	$5 \text{ mgL}^{-1}$
Titriplex III	$400 \text{ mgL}^{-1}$

Puffer wurde hergestellt, indem Citronensäurelösung (0,1 M) zu di-Natriumhydrogenphosphatlösung (0,2 M) gegeben wurde, bis der pH-Wert 6 betrug.

**Tab. 5-2     Standardbedingungen für Submers-Kultivierungen in Schüttelkolben**

Kultivierungstemperatur	25°C
Schüttelgeschwindigkeit	150 rpm
Kulturvolumen	100 mL in 300 mL Erlenmeyerkolben 200 mL in 500 mL Erlenmeyerkolben 400 mL in 1000 mL Erlenmeyerkolben

**Vorkulturen**

Zum Animpfen von Vorkulturen wurde jeweils ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück der Agarplatten-Stammkultur in 300 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Medium überführt. Diese Vorkulturen wurden im Schüttler (Tab. 5-2) inkubiert. Bei *Pleurotus sapidus* wurde die Kultur nach ca. 7 Tagen mit dem Ultraturrax (5.3.4) auf Stufe 6 für 30 s homogenisiert (vgl. Taubert et al. 2000) und mit der erhaltenen viskosen Masse die experimentellen Kulturen angeimpft. Es wurden Vorkulturen bis zum Alter von maximal 336 h (2 Wochen) verwendet. Bei *Chaetomium globosum* wurde in der Regel 72 h nach der Inkubation der Vorkulturen die experimentellen Kulturen ohne vorheriges Turraxen angesetzt, nach etwa 168 h (1 Woche) wurden die Vorkulturen erneuert.

**Experimentelle Kulturen**

Von den Vorkulturen wurden steril jeweils 10 mL in 300 mL Erlenmeyerkolben mit 90 mL Medium pipettiert und ohne erneute Homogenisation inkubiert (Tab. 5-2).

**Stammhaltung auf Agarplatten**

Ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück der Agarplatten-Stammkultur wurde auf einen sterilen SNLH-Agar gelegt und leicht angedrückt. Die Kultivierung der Agarplatten erfolgte im Brutschrank bei 25°C, bis die Hälfte der Agaroberfläche vollständig mit Pilzmyzel bewachsen war. Danach wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank (4 bis 7°C) gelagert. Spätestens alle 6 Monate wurden aus den gelagerten Kulturen nach dem gleichen Verfahren neue Stammkulturen angelegt.

## 5.4.2 Zugabe von Terpenen zum Kultivierungsmedium

### 5.4.2.1 Art und Weise der Zugabe von Terpenkohlenwasserstoffen

Die Terpenkohlenwasserstoffe wurden im Falle der Submers-Kultivierungen in flüssiger Form direkt in die Kulturbrühe gegeben. Bei Zwei-Phasen-Kultivierungen wurde das Substrat in die organische Phase (n-Decan) gegeben. Da (+)-Limonen leichtflüchtig ist, konnte es im Bioreaktor über die Zuluft zugegeben werden. Dazu wurde die Zuluft durch ein Vorratsgefäß (Glasgefäß mit einem Totalvolumen von 20 mL), in dem sich (+)-Limonen befand, geleitet und (+)-Limonen auf diese Weise in den Reaktor in gasförmigen Zustand eingebracht.

### 5.4.2.2 Berechnung der Angaben der Konzentrationserhöhung

Die Terpene wurden größtenteils in Mengen zugegeben, die für eine optimale Biotransformation ermittelt wurden. Diese lagen zum Teil über der Löslichkeit der betreffenden Terpene im Medium (vgl. Fichan et al. 1999, Weidenhamer et al. 1993). Die Löslichkeit von (+)-Limonen in Wasser beträgt  $13 \text{ mgL}^{-1}$  (0,1 mM), die von (+)-Valencen  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  (0,002 mM). Bei der Zugabe von Terpenen zum Kulturmedium wurden nicht die absoluten Flüssigkeitsmengen, sondern zur besseren Vergleichbarkeit die Konzentrationserhöhungen an den jeweiligen Terpenen angegeben. Dabei wurden die Konzentrationserhöhungen unter Beachtung des Gehaltes an (+)-Limonen bzw. (+)-Valencen so berechnet, als ob die Menge sich komplett im Kulturmedium lösen würde, auch wenn die Löslichkeit überschritten wurde (Tab. 5-3). Eine Absorption von Terpenen in die Membranen der transformierenden Pilze, die bei höheren Gehalten an Biomasse und kleineren Pellets tendenziell größer ausfällt, wurde bei den Konzentrationsangaben vernachlässigt.

**Tab. 5-3 Beispielberechnung der Konzentrationserhöhungen an Terpenen**

Substanz	Molmasse $\text{gmol}^{-1}$	Gehalt %	Dichte $\text{gmL}^{-1}$	Zugabe $\mu\text{L}$	Volumen mL	Erhöhung mM
(+)-Limonen	136,24	98%	0,842	100	100	6,05
				300	200	9,08
(+)-Valencen	204,36	60%	~ 0,918	100	100	2,70
						90%
		60%	~ 0,918	20	5	10,78
						90%

---

Bei der Zugabe von Terpenen zu Zwei-Phasen-Systemen wurde der Gehalt jeweils nur auf das Volumen der wässrigen Phase bezogen.

## 5.5 Amperometrie

### 5.5.1 Allgemeiner Versuchsaufbau für amperometrische Messungen

Die Messungen erfolgten in einem 250 mL fassenden Minireaktor (Glaszylinder von 8 cm Höhe und 6 cm Innendurchmesser) mit fünf NS 14/15 Schliffhülsen im Deckel zur Aufnahme der Elektroden und der Belüftungseinheit (Abb. 5-5). Deckel und Minireaktor wurden mit einer Deckelklammer luftdicht verschlossen.



**Abb. 5-5 Amperometrisches Messsystem im Minireaktor**

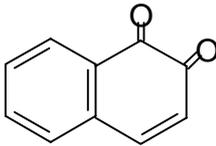
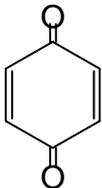
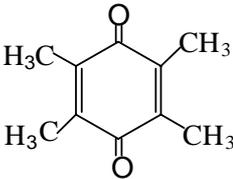
Für die amperometrischen Untersuchungen wurde eine Doppel-Platinelektrode (je 0,15x8x8 mm; 1,316 cm<sup>2</sup> je Elektrode), NS 14/15 (Art.Nr. 6.0309.100, Deutsche Metrohm GmbH & CO., Filderstadt, Deutschland) und eine Silber/Silberchlorid-Elektrode, NS 14/15 (Art.Nr. 6.0726.100, Deutsche Metrohm GmbH & CO., Filderstadt, Deutschland) eingesetzt. Dabei wurde ein Blech der Doppel-Platinelektrode als Arbeitselektrode, das andere als Gegenelektrode angeschlossen. Die Silber/Silberchlorid-Elektrode wurde über eine Luggin-Kapillare, die mit Elektrolytlösung (KCl) luftfrei gefüllt wurde, im Abstand von ca. 1 bis 2 mm auf den Mittelpunkt der Arbeitselektrode ausgerichtet. Für Langzeitmessungen wurde dieser Aufbau bei 121°C und 1 bar für 20 min autoklaviert und unter der Sterilwerkbank mit der

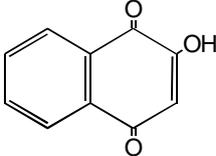
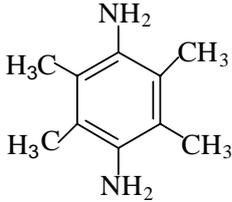
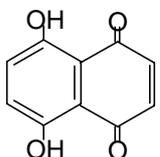
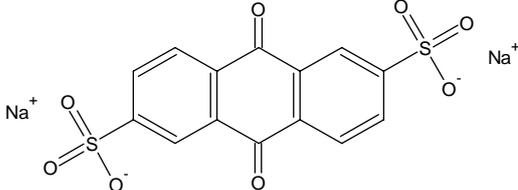
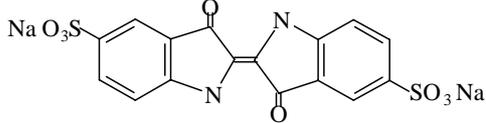
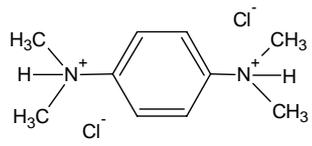
Kultur und entsprechenden Redoxmediatoren befüllt. Redoxmediatoren in flüssiger Form wurden durch Sterilfiltration, in fester Form durch Bestrahlung mit UV-Licht sterilisiert. Falls erforderlich, wurde die Doppelblechelektrode zur Reinigung mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1) behandelt. Referenz- und pH-Elektroden wurden bei Bedarf mit Diaphragmareiniger und Reaktivierungslösung behandelt.

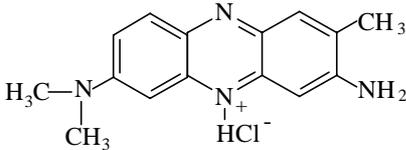
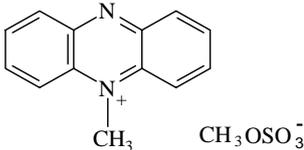
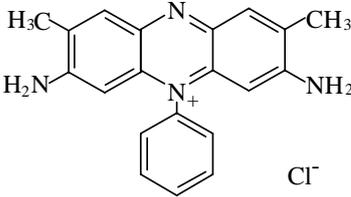
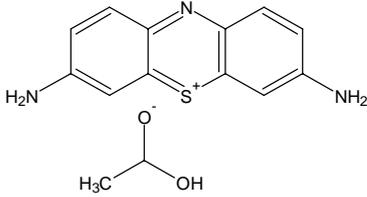
### 5.5.2 Cyclovoltammetrische Untersuchungen (Redoxmediatorscreening)

Vor jeder Messung wurde die Submerskultur 10 min mit Stickstoff (0,17 vvm) begast, Redoxmediator in oxidierter Form zugegeben und nach einer Mischzeit von 180 s die Cyclovoltammogramme mit einer Scangeschwindigkeit von 10 mVs<sup>-1</sup> aufgenommen. Während der isothermen Messung bei 25°C wurde mit 200 rpm gerührt. Für das Screening der Redoxmediatoren wurden die in Tab. 5-4 angegebenen Redoxmediatoren verwendet. Es wurden sowohl hydrophile als auch lipophile Substanzen ausgewählt. Die Konzentration der Redoxmediatoren sollte 1 mM betragen, so dass die in Tab. 5-4 angegebenen Mengen für 200 mL Submerskulturen verwendet wurden.

**Tab. 5-4 Redoxmediatoren für das Screening mit *Pleurotus sapidus***

Substanz	Molmasse mg pro 200 mL	
	gmol <sup>-1</sup>	Kultur
1,2-Naphthochinon 	158,16	31,632
1,4-Benzochinon 	108,1	21,62
2,3,5,6-Tetramethyl-p-benzochinon (Durochinon) 	164,21	32,842

2-Hydroxy-1,4-naphthochinon	174,16	34,832
		
3,6-Diamino-durol	164,25	32,85
		
5,8-Dihydroxy-1,4-Naphthochinon	190,16	38,032
		
Antrachinon-2,6,disulfonsäure, Dinatriumsalz	412,31	82,462
		
Indigocarmin	466,36	93,272
		
Kaliumhexacyanoferrat III	329,29	65,858
$K_3[Fe(CN)_6]$		
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylen-diamin- dihydrochlorid	237,18	47,436
		

<p>Neutral-Rot</p> 	288,78	57,756
<p>N-Methylphenazoniummethylsulfat (PMS)</p> 	306,34	61,268
<p>Safranin T</p> 	350,85	70,17
<p>Thionin</p> 	287,34	57,468

### 5.5.3 Aufnahme von Strom/Zeit-Kurven

Zur Aufnahme der Strom/Zeit-Kurven wurden Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit sterilfiltrierter Redoxmediatorlösung in einen zuvor autoklavierten Minireaktor gegeben. Die Zu- und Abluft (0,17 vvm) wurde über Spritzenfilter (PET, 25 mm, 0,2 µm) sterilfiltriert.

## 5.6 Respirometrie

Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Sauerstoffsensoren (5.3.1.2) findet sich im theoretischen Teil unter 2.3.2 (Funktionsweise und Messzelligeometrie). Der in dieser Arbeit verwendete Begriff eines „externen Sensors“ verdeutlicht, dass die Messung in einem aliquoten Teil der Submerskultur (durch Probenahme) außerhalb des Reaktors stattfand (5.6.2 und 5.6.4). Die „internen Sensoren“ waren direkt in den zu untersuchenden Submerskulturen vorhanden (5.6.3 und 5.6.5).

---

### 5.6.1 Aufnahme der Sauerstoffzehrung als Aktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Sauerstoffzehrung wurden die jeweiligen Proben bzw. der Bioreaktorinhalt belüftet, bis sich Sauerstoffgehalte von ca. 4 bis 7 mgL<sup>-1</sup> einstellten. Während der Messung wurde die Belüftung abgestellt und der Sauerstoffgehalt in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen (vgl. 3.3.2). Je nach Versuchsaufbau wurden die Kulturen vom überstehenden Gasraum getrennt (Stempel oder Miglyolüberschichtung, 3.3.5.3). Der Anfangsgehalt an Sauerstoff ist für die Bestimmung der Steigungswerte (3.3.2) unerheblich. Wichtig ist, dass ein linearer Abschnitt im Verlauf der Sauerstoffzehrungsmessung zur Auswertung bestimmt werden kann.

### 5.6.2 Aktivitätsmessung mit externer Clark-Elektrode

Bei den Messzellen des Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerätes (Rank Brothers Ltd, 5.3.1.2) wurden die Elektroden etwa alle zwei Wochen poliert und der Elektrolyt erneuert. Das Gerät wurde täglich mit Wechselbegasung Luft/Stickstoff kalibriert. Zur Aufnahme von externen Sauerstoffzehrungen wurden 5 mL Probe in eine auf 25°C temperierte Respirationsskammer gegeben, und bis zu einem Gehalt an 6 bis 7 mgL<sup>-1</sup> Sauerstoff über einen Kompressor belüftet. Anschließend wurde ein Stempel in die Respirationsskammer eingeführt, dass sich kein Gasraum mehr, sondern nur noch Probe in der Messzelle befand (5.6.1, Abb. 5-6 rechts). Der Gehalt an gelöstem Sauerstoff wurde mit 1 Hz gemessen und über eine A/D-Karte rechnergestützt ausgelesen. Während der Messung wurde die gesamte Probe (auf Stufe 7) mittels eingebautem Magnetrührer gerührt.

Nach der Messung wurden die Proben entnommen und gegebenenfalls zur Bestimmung der Biotrockenmasse verwendet. Vor einer weiteren Messung erfolgte eine gründliche Spülung mit Wasser, um die Pellets zu entfernen, sowie eine Desinfektion mit Ethanol (70% vol).

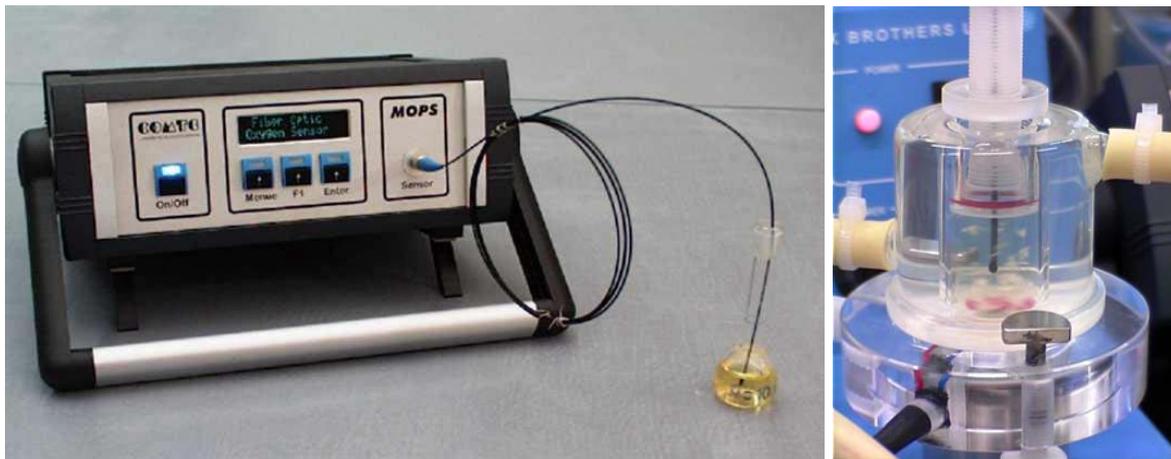
### 5.6.3 Aktivitätsmessung mit interner Clark-Elektrode

Aktivitätsmessungen mit interner Clark-Elektrode wurden nur in den Bioreaktoren (5.3.2) durchgeführt, indem der Sauerstoffgehalt der Kulturbrühe nach Zudrehen der Be- und Entlüftung über die jeweils verwendete Sauerstoffelektrode mit verschiedenen Messraten bestimmt wurde (5.6.1). Eine Überschichtung mit sauerstoffundurchlässigem Material fand in den Bioreaktoren nicht statt.

---

#### 5.6.4 Aktivitätsmessung mit externem optisch sensitiven Sauerstoffsensor

Zur Aktivitätsmessung mit externer sauerstoffsensitiver Optode wurde die Respirationskammer des Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerätes von Rank Brothers Ltd als Probenkammer verwendet, um isotherme Messungen zu gewährleisten. Die Kalibrierung erfolgte jeweils täglich unter Wechselbegasung mit Luft/Stickstoff. Eine 5 mL Probe wurde (wie in 5.6.2 beschrieben) eingefüllt und begast. Bei dem MOPS (Comte GmbH, 5.3.1.2) ist der sauerstoffsensitive Indikator auf die Spitze eines Glasfaserkabels aufgetragen und optisch nach außen isoliert. Das Glasfaserkabel dient nicht nur als Träger für den Indikator, sondern auch als Zuleitung für das Anregungslicht und führt das Emissionslicht in die Auswerteeinheit zurück. Die Optode wurde durch das Loch im Stempel (ca. 1 mm Durchmesser) eingeführt und über die optische Einheit über einen A/D-Wandler rechnergestützt mit 1 Hz ausgelesen. Dieser Aufbau ermöglichte es, mit der externen Optode und der externen Clark-Elektrode den Sauerstoffgehalt gleichzeitig zu bestimmen und unmittelbar zu vergleichen (Abb. 5-6). Die Optode wurde nach jeder Messung mit Ethanol (70% vol) desinfiziert.



**Abb. 5-6 MOPS (mikrocontroller gesteuerter optischer portabler Sauerstoffsensor) der Comte GmbH (links) und paralleles Messen der Sauerstoffzehrung mit externer Optode und externer Clark-Elektrode (rechts)**

#### 5.6.5 Aktivitätsmessung mit internem optisch sensitiven Sauerstoffsensor

Die Aktivitätsmessungen mit internem optisch sensitiven Sauerstoffsensor wurden in Schüttelkolben, im Bioreaktor und bei den Spinnerflask-Kultivierungen durchgeführt, es wurde das Fiber-optic oxygen meter Fibox 2 (Presens GmbH, 5.3.1.2) eingesetzt. Der sauerstoffsensitive Indikator ist in diesem Falle auf kleine Glasplättchen (ca 5x5 mm) als Trägermaterial aufgebracht und optisch isoliert (schwarze Rückseite). Diese Sensoren

(sauerstoffsensitive Folien auf Glas immobilisiert) wurden vor dem ersten Einsatz dreimal in Wasser autoklaviert, um die Messstabilität zu erhöhen, da sich der aufgebrauchte Indikator durch Hitzeeinwirkung während der ersten Autoklavierzyklen geringfügig verändert. Danach wurden die Sensorplättchen jeweils mit farblosem Silikon an die Innenseite der Spinnerflask geklebt (schwarze Seite Richtung Kulturbrühe) und die Kanten zusätzlich mit Silikon abgedichtet. Die Erfassung der Messwerte erfolgte extern, indem das Glasfaserkabel von außen mit Hilfe eines Adapters direkt auf das Sensorplättchen ausgerichtet und fixiert wurde (Abb. 5-7).



**Abb. 5-7 Internes Sauerstoffmesssystem; eingeklebte sauerstoffsensitive Folien (links) und Auslesen der Messsignale über das Glasfaserkabel (rechts, Fibox 2, Presens GmbH)**

Die optischen Signale wurden also durch die Glaswand ausgelesen. Es wurde Wasser in die Spinnerflask gegeben und unter Wechselbegasung mit Luft/Stickstoff die optische Einheit kalibriert. Alle Messungen wurden mit diesen Kalibrierdaten durchgeführt, da sie unabhängig von den verwendeten Sensorfolien waren (kalibrierfreie Sensoren). Zur Aufnahme der Sauerstoffzehrung wurde intensiv belüftet, um einen Sauerstoffgehalt von 4 bis 7 mgL<sup>-1</sup> zu erreichen, die Hähne der Zu- und Abluft geschlossen und der Sauerstoffgehalt mit 0,2 Hz aufgezeichnet (5.6.1). Falls nicht anders angegeben, wurde während der Messung mit 200 rpm gerührt.

## 5.7 Analytik

### 5.7.1 Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse und des Glucosegehaltes

Zur Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse wurden jeweils 5 mL der Submerskulturen 15 min bei 25°C und 15000 min<sup>-1</sup> (ca. 25000 g) zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet in Puffer aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Danach wurden die Pellets bei 105°C im Trockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aufgrund der unterschiedlichen Pelletformen und Größen konnte keine repräsentative Probenahme erfolgen. Der Fehler in der Probenahme überwog den Fehler bei der Biotrockenmassebestimmung deutlich, so dass auf eine Angabe der Fehlergrenzen verzichtet wurde. Aus einer Kultur konnten bei Mehrfachbestimmungen Differenzen in der Biotrockenmasse bis zu 2 gL<sup>-1</sup> gemessen werden. Um diesen Fehler zu minimieren, wurde im Falle der externen Aktivitätsmessung mit dem Zwei-Kanal-Sauerstoffmessgerät zur Bestimmung des Gehaltes an Biotrockenmasse jeweils der komplette Messzelleninhalt verwendet.

Die Gehalte an Biotrockenmasse, die bei den Kultivierungen in den Spinnerflasks bestimmt wurden, wurden nach einer Schnellmethode mit dem Feuchtebestimmer von Sartorius ermittelt. Dabei wurden 5 mL über ein zuvor konstant getrocknetes Membranfilter abfiltriert, der Filterkuchen mit Wasser gewaschen und anschließend bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet.

Der Glucosegehalt wurde über ein enzymatisches Messprinzip mit YSI 2700 Select bestimmt, wobei membranfiltriertes Kulturmedium oder der Überstand aus der Zentrifugation eingesetzt wurde.

### 5.7.2 Bestimmung der Gehalte an Terpenkohlenwasserstoffen mit GCMS

#### 5.7.2.1 Probenvorbereitung für die Gaschromatographie

Die Terpene wurden aus dem Zentrifugat oder aus dem Filtrat extrahiert. Nach Zugabe einer ethanolschen Lösung des verwendeten internen Standards wurde die Probe durch Vortexen gemischt und zur Extraktion ein organisches Lösungsmittel zugegeben. Nach intensivem Vermischen wurde die organische Phase abgenommen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und mit GCMS analysiert.

**Tab. 5-5 Extraktion von Submerskulturen für die Terpenanalyse**

	<b>Limonen/Carvon</b>	<b>Valencen/Nootkaton</b>
Probenvolumen	5 mL	5 mL
Abtrennung der Pellets	Zentrifugation	Filtration
Extraktionsmittelvolumen	1 mL	1 bis 2 mL
Interner Standard	Campher	Thymol
verwendetes Lösungsmittel	n-Hexan	Essigsäureethylester

Die Menge bzw. Konzentration des zugegebenen internen Standards wurde jeweils an die Proben angepasst. Im Falle der Zwei-Phasen-Spinnerflask-Kultivierungen wurde eine 100  $\mu\text{L}$  Probe aus der n-Decanphase gezogen, diese über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und über externe Kalibrierung analysiert.

#### 5.7.2.2 Berechnung der Terpengehalte

Zur Bestimmung der Terpengehalte wurde grundsätzlich das Programm GCMSolutions der Shimadzu GmbH verwendet. Falls die Kriterien zur automatischen Auswertung nicht erfüllt wurden (z.B. mangelnde Identifikation über MS, nicht basisliniengetrennte Peaks etc.) und keine automatische Auswertung stattfinden konnte, wurden die Peaks manuell nachintegriert, und die Gehalte in der Probe ( $\omega$ ) über Gleichung 6 berechnet:

$$\omega \text{ [mgL}^{-1}\text{]} = \frac{A_x \cdot R_f \cdot m_{\text{IST}} \cdot V_f}{A_{\text{IST}}} \quad (6)$$

$\omega$	Gehalt an Terpen in der Probe
$A_x$	Peakfläche des zu bestimmenden Stoffes
$R_f$	Responsefaktor des jeweiligen Stoffes
$m_{\text{IST}}$	Konzentration des eingesetzten internen Standards in $\text{mgL}^{-1}$
$V_f$	Verdünnungsfaktor
$A_{\text{IST}}$	Peakfläche des internen Standards

Als Responsefaktor  $R_f$  wurde jeweils der Mittelwert aus drei nach Gleichung 7 berechneten Responsefaktoren verwendet:

$$R_f = \frac{m_x \cdot A_{IST}}{m_{IST} \cdot A_x} \quad (7)$$

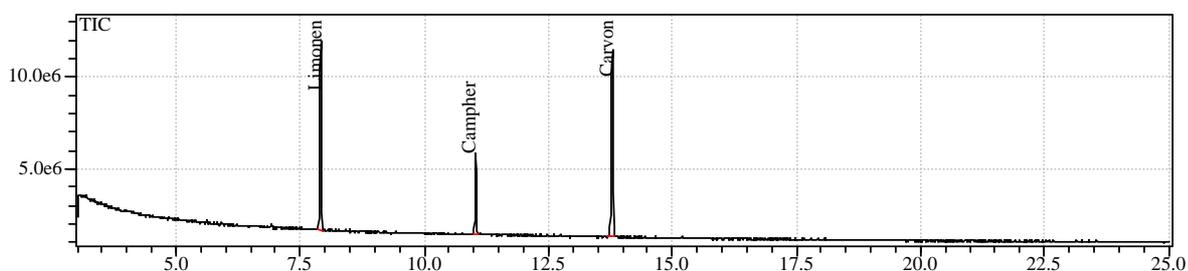
$R_f$	Responsefaktor des Analytmoleküls
$m_x$	Konzentration des Standards in $\text{mgL}^{-1}$
$A_x$	Fläche des Standardpeaks
$m_{IST}$	Konzentration des internen Standards in $\text{mgL}^{-1}$
$A_{IST}$	Peakfläche des internen Standards

Bei der Auswertung wurden jeweils die Standards, bei denen die Flächen des Produktpeaks annähernd gleich groß wie in der zu vermessenden Probe waren, zur Berechnung des Responsefaktors verwendet.

### 5.7.2.3 Bestimmung der Gehalte an Limonen und Carvon

Als optimales Temperaturprogramm für die gaschromatographische Trennung von Limonen, Carvon und Campher (interner Standard) wurde 50/0/5/150/5 ermittelt. Es wurde festgestellt, dass keine Thermoumsetzung von Limonen im Injektor stattfand. Die Standards und die Kalibrierung wurden immer an die jeweiligen Proben angepasst.

Zur Analytik der Terpene wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Standardlösungen (splitless) mit dem oben angegebenen Temperaturprogramm chromatographiert. Aus den Chromatogrammen der Standards wurden Kalibrierkurven sowie Responsefaktoren für die IST-Methode errechnet. In Abb. 5-8 ist beispielhaft ein Standard-Chromatogramm zur Analytik von Limonen/Carvon dargestellt.



**Abb. 5-8 Chromatogramm zur Analytik von Limonen/Carvon (Limonen  $10,1 \text{ mgL}^{-1}$ ; Carvon  $16,6 \text{ mgL}^{-1}$  und Campher  $6,1 \text{ mgL}^{-1}$ )**

Nachdem die Kalibrierung abgeschlossen war, wurden Probelösungen eingespritzt, um das System zu überprüfen (Tab. 5-6):

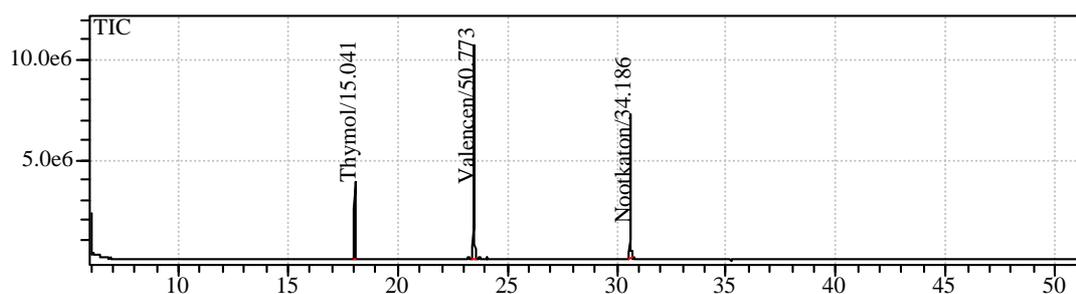
**Tab. 5-6 Überprüfung der Standardlösungen (stan1-7) mit der ermittelten IST-Kalibrierung für die Analytik von Limonen/Carvon**

Substanz		stan1	stan2	stan3	stan4	stan5	stan6	stan7
(+)-Limonen	Soll	1,45	2,89	4,34	5,78	7,23	8,68	10,12
(-)-Carvon	mgL <sup>-1</sup>	1,67	2,50	4,17	5,00	8,33	12,50	16,67
Limonen	Ist (gemessen)	1,57	2,99	4,33	6,01	7,42	8,68	10,14
Carvon	mgL <sup>-1</sup>	1,65	2,50	4,25	4,94	8,64	12,61	16,31
Limonen	Verhältnis	1,09	1,03	1,00	1,04	1,03	1,00	1,00
Carvon	Ist/soll	0,99	1,00	1,02	0,99	1,04	1,01	0,98

Die bestimmten Gehalte lagen im Rahmen der Messungenauigkeit dieser Methode.

5.7.2.4 Bestimmung der Gehalte an Valencen und Nootkaton

Für die Analytik von Valencen, Nootkaton und Thymol (interner Standard) wurde als optimales Temperaturprogramm 50/3/5/240/10 ermittelt. Die Standardlösungen wurden in der GCMS splitless eingespritzt. In Abb. 5-9 ist beispielhaft ein Standard-Chromatogramm zur Analytik von Valencen/Nootkaton dargestellt.



**Abb. 5-9 Chromatogramm zur Analytik von Valencen/Nootkaton (Valencen 25,50 mgL<sup>-1</sup>; Nootkaton 25,16 mgL<sup>-1</sup> und Thymol 10,95 mgL<sup>-1</sup>)**

Auch in diesem Fall wurde das Analytiksystem durch Einspritzen von Probelösungen als Proben überprüft (Tab. 5-7).

**Tab. 5-7 Überprüfung der Standardlösungen (stan1-7) mit der ermittelten IST-Kalibrierung für die Analytik von Valencen/Nootkaton**

Substanz		stan1	stan2	stan3	stan4	stan5	stan6	stan7
(+)-Valencen	Soll	2,55	5,1	7,65	10,2	12,75	19,13	25,5
(+)-Nootkaton	mgL <sup>-1</sup>	0,67	1,68	3,35	6,71	10,06	16,77	25,16
Valencen	Ist (gemessen)	2,63	5,21	7,29	9,92	12,21	17,88	25,37
Nootkaton	mgL <sup>-1</sup>	-	-	3,08	5,66	8,9	15,47	23,96
Valencen	Verhältnis	1,03	1,02	0,95	0,97	0,96	0,93	0,99
Nootkaton	Ist/soll	-	-	0,92	0,84	0,88	0,92	0,95

Die Wiederfindung konnte für Valencen zu 93-103%, für Nootkaton zu 84-95% bestimmt werden. Es zeigte sich, dass das kalibrierte System Nootkaton nur in Konzentrationen von > 2 mgL<sup>-1</sup> in der Probelösung zu detektieren vermochte. Bei kleineren Konzentrationen werden die Massenspektren der Analytionen von denen des Grundrauschens überdeckt.

Bei den Analysen mit Myzelkonzentrat wurde eine weitere Kalibrierung (interne und externe Standardmethode) mit höheren Konzentrationen mit dem gleichen Temperaturprogramm

durchgeführt. Dabei wurde der Valencenpeak nicht massenspektrometrisch analysiert, da die Konzentrationen sehr hoch waren und dadurch das Massenspektrometer überladen worden wäre (Cut von 20-28 min). Auf diese Weise konnte die Analyse und Auswertung der Nootkatongehalte im Überschuss von (+)-Valencen ermöglicht werden.

#### 5.7.2.5 Reinheitskontrolle der eingesetzten Valencen-Substrate

Bei den Biotransformationen wurden nicht nur (+)-Valencen mit einer Reinheit von 90% (Fluka), sondern auch Valencen mit den Reinheitsgraden 60 und 80% (maxens<sup>TM</sup> Degussa Flavors & Fruit Systems, Grasse, France) eingesetzt (5.2.4). Dabei handelte es sich um aufgereinigte Fraktionen. Diese Substrate wurden mittels GCMS untersucht, um den Gehalt an Valencen zu bestimmen. Bei den in Tab. 5-8 angegebenen Valencengehalten ist keine Angabe zur Stereoisomie vorhanden, da mit dem vorhandenen Analysesystem keine Stereoisomere getrennt werden konnten.

**Tab. 5-8**      **Ermittelte Valencengehalte der eingesetzten Substrate (n.n. nicht nachweisbar)**

<b>Substanz</b>	<b>Gehalt an Valencen</b>	<b>Gehalt an Nootkaton</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>
Valencen (Fluka)	90	n.n.
Valencen 60% (maxens <sup>TM</sup> )	42,23	n.n.
Valencen 85-90% (maxens <sup>TM</sup> )	80,66	n.n.

## **5.8 Entsorgungshinweise**

### **5.8.1 Entsorgung von Chemikalien**

Es wurde stetig versucht, den Einsatz von umweltgefährlichen oder giftigen Substanzen zu minimieren. Soweit die Verwendung solcher Chemikalien aus wissenschaftlicher Sicht erforderlich war, wurden die Gefahrenhinweise (R-Sätze) und die Sicherheitsratschläge (S-Sätze) der betreffenden Substanzen strengstens beachtet.

Auf den Einsatz halogenerter Lösungsmittel wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Soweit der Einsatz von Lösungsmitteln erforderlich war, wurden diese im Falle eines Zwei-Phasensystems nach Verwendung abgetrennt und als Sonderabfall in der Gruppe nichthalogenierte, nicht wassermischbare Lösungsmittel entsorgt. Sofern es sich um wassermischbare Lösungsmittel handelte, wurden diese mit der Submerskultur autoklaviert und nach Abfiltrieren des Pilzmyzels in der Gruppe der nichthalogenierten, wassermischbaren Lösungsmittel entsorgt. Umweltgefährliche Substanzen wurden ebenso wie weitere Sonderabfälle der zentralen Entsorgung des Karl-Winnacker-Institutes der DECHEMA e.V. zugeführt.

### **5.8.2 Entsorgen von biologischem Material**

Alle verwendeten Kulturen, Kulturreste und die mit den lebenden Kulturen in Kontakt gekommenen Laborgeräte wurden unmittelbar nach dem Versuch unter Standardbedingungen (20 min bei 121°C) autoklaviert und das Pilzmyzel nach Abtrennung des Mediums über den Laborabfall entsorgt. Das abfiltrierte Medium wurde, falls es keine Lösungsmittel oder speziell zu entsorgende Stoffe enthielt, über das Laborabwasser entsorgt.

---

## 6 Literatur

- Abraham, B., Krings, U., Berger, R.G. (1994)  
Biotechnologische Produktion von Aromastoffen durch Basidiomyceten (Ständerpilze).  
GIT Fachz. Lab., 4, 370-375.
- Anderlei, T., Büchs, J. (2000)  
Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks.  
Biochem. Eng. J., 3478, 1-6.
- Aromenverordnung vom 22. Dezember 1981  
(BGBl. I S. 1625), BGBl. III/FNA 2125-40-27, zuletzt geänd. durch Art. 1 VO zur Änd.  
der AromenV und zur Aufhebung lebensmittelrechtl. Vorschriften für Teigwaren v.  
18.06.2001 (BGBl. I S.1178)
- Barberel, S.I., Walker, J.R.L. (2000)  
The Effect of Aeration upon the Secondary Metabolism of Microorganisms. *Biotechnol.  
and Genetic Eng. Rev.*, 17, 281-323.
- Bauer, K., Garbe, D., Surburg, H. (2001)  
Common fragrance and flavor materials, preparation, properties and uses. 4. Aufl., VCH,  
Weinheim Basel Cambridge ISBN 3-527-30364-2.
- Becker, C. (1994)  
Versuche zur biosensorischen Anwendung einer bioelektrochemischen Brennstoffzelle,  
Diplomarbeit, FH Darmstadt.
- Belitz, H-D., Grosch, W. (1992)  
Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg,  
ISBN 3-540-55449-1, 305.
- Bennetto, H.P., Box, J., Delaney, G.M.M., Mason, J.R., Roller, S.D., Stirling, J.L., Thurston,  
C.F. (1987)  
Redox-mediated electrochemistry of whole micro-organisms: from fuel cells to  
biosensors. In: Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S. (Hrsg). *Biosensors*, Oxford  
University Press, Oxford, 291-314.
- Bennetto, H.P., Stirling, J.L., Tanaka, K., Vega, C.A. (1983)  
Anodic Reactions in Microbial Fuel Cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 559-568.
- Berger, R.G. (2000)  
Genetic Engineering: Food Flavors. In: F.J. Francis (Hrsg). *Encyclopedia Food Science  
& Technology*, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, New York, 1188-1198.

- Berger, R.G., De Bont, J.A., Eggink, G., Da Fonseca, M., Gehrke, M., Gros, J.-B., Van Keulen, F., Krings, U., Larroche, C., Leak, D. J., Van der Werf, M.J. (1999)  
Biotransformations in the Flavour Industry. In: Swift, K.A.D. (Hrsg). Current Topics in Flavours and Fragrances, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 139-170.
- Birou, B., Marison, I.W., Stockar, U.v. (1987)  
Calorimetric investigation of aerobic fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 650-660.
- Braha, A. (2000)  
Intelligentes Toximeter zum Schutz der Biologie im rumänischen Großklärwerk Iasi (Moldova). *Wasser, Luft und Boden*, 1-2, 32-37.
- Busmann, D., Berger, R.G. (1994)  
Bioconversion of terpenoid hydrocarbons by basidiomycetes. In: Maarse, H., Heij van der, D.G. (Hrsg). Trends in flavour research: proceedings of the 7th Weurman flavour research symposium, Noordwijkerhout, June 1993, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 503-507.
- Camici, L., Sermonti, G., Chain, E.B. (1952)  
Observations on *Penicillium Chrysogenum* in submerged culture, Mycelial Growth and Autolysis. *Bull. World Hlth. Org.*, 6, 265-276.
- Carragher, J.M., McClean, W.S., Woodley, J.M., Hack, C.J. (2001)  
The use of oxygen uptake rate measurements to control the supply of toxic substrate: toluene hydroxylation by *Pseudomonas putida* UV4. *Enzyme and Microb. Technol.*, 28, 183-188.
- Ceen, E.G., Dunnill, P., Herrmann, J.P.R. (1988)  
Two-Liquid Phase Reactor Studies of 11 $\alpha$ -Hydroxylation of Progesterone by *Aspergillus ochraceus*. *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 743-746.
- Clark, L.C. (1956)  
Monitor and control of blood and tissue oxygen tension. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 2.41-46.
- Cohen, R., Persky, L., Hadar, Y. (2002)  
Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 582-594.
- Cohn, E.M. (1965)  
Fuel Cell Systems, *Advances in Chemistry Series 47*, American Chemical Society, 1-9.
- Compere, A.L., Griffith, W.L., Greene, S.V. (1980)  
Polymer production by *Pleurotus sapidus*. *Dev. Ind. Microbiol.*, 21, 461-469.
- Costa-Fernández, J.M., Bordel, N., Campo, J. C., Ferrero, F.J., Pérez, M.A., Sanz-Medel, A. (2000)  
Portable Fibre Optic Oxygen Sensor Based on Room-Temperature Phosphorescence Lifetime. *Microchim. Acta*, 134, 145-152.
-

- 
- Crognale, S., Federici, F., Petruccioli, M. (2002)  
Enhanced separation of filamentous fungi by ultrasonic field: possible usage in repeated batch processes. *J. Biotechnol.*, 97, 191-197.
- Cui A.Q., Okkerse W.J., van der Lans R.G.J.M., Lyuben K.C.A.M. (1998)  
Modeling and Measurements of Fungal Growth and Morphology in Submerged Fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 216-229.
- Demyttenaere, J.C.R., Van Belleghem, K., De Kimpe, N. (2001)  
Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. *Phytochemistry*, 57, 199-208.
- Duetz W.A., Beilen van J.B., Witholt B. (2001)  
Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 419-425.
- Duetz, W.A., Bouwnmeester, H., van Beilen, J.B., Witholt, B. (2003)  
Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 269-277.
- El-Enshasy, H.A. (2003)  
Production of Gluconic Acid by Free and Immobilized Cells of Recombinant *Aspergillus niger* in Batch and Repeated Batch Cultures. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 99 (10), 409-415.
- Fichan, I., Larroche, C., Gros, J. B. (1999)  
Water Solubility, Vapor Pressure and Activity Coefficients of Terpenes and Terpenoids. *J. Chem. Eng. Data*, 44, 56-62.
- Fuchs, S., Zinn, S., Beck, Th., Mosandl, A. (1999)  
Biosynthesis of Menthofuran in *Mentha x piperita*: Stereoselective and Mechanistic Studies. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4100-4105.
- Gibbs, J.N., Gulliver, C.C. (1977)  
Fungal decay of dead elms. *Eur. J. Dor. Path*, 7, 193-200.
- Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M., Gold, M.H. (1983)  
An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - requiring enzyme preparation involved in Lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114, 1077-1083.
- Hammel, K.E., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K. (1986)  
Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 261, 16948-16952.
- Hashimoto, T., Asakawa, Y., Noma, Y., Murakami, C., Tanaka, M., Kanisawa, T., Emura, M. (2003)  
Nootkatone manufacture with *Clorella* from valencene or hydroxyvalencene. *Jpn. Kokai Tokyo Koho*, Patentnr. JP2003-70492.
-

- Hatakka, A. (1994)  
Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13, 125 - 135.
- Heinzkill, M., Messner, K. (1997)  
The Lignolytic System of Fungi. In: Timm Anke (Hrsg). *Fungal Biotechnology*. Chapman & Hall, Weinheim, 213-227.
- Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., de Bont, J.A.M. (1994)  
Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents, *TIBTECH* 12 (1994), 409-414.
- Higgins, I.J., Hill, H.A.O. (1979)  
Microbial Generation and Interconversion of Energy Sources. In: Bull, A.T., Ellwood, D.C, Ratledge, C. (Hrsg). *Microbial Technology: Current state, future prospects*, Cambridge University Press, Cambridge, 359-377.
- Holst, G., Mizaikoff, B. (2002)  
Fiber optic sensors for environmental applications. In: López-Higuera, J.M. (Hrsg). *Handbook of Optical Fibre Sensing Technology*, Wiley, Weinheim, 729-755.
- Holtmann, D., Sell, D. (2001)  
Electrochemical detection of the microbial activity of heterotrophic and autotrophic activated sludge organisms. *Biosensor 2001 Symposium, online-Proceedings*  
[http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2002/455/pdf/Holtmann%20+Sell\\_255\\_pic.pdf](http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2002/455/pdf/Holtmann%20+Sell_255_pic.pdf).
- Holtmann, D., Sell, D. (2002)  
Detection of the microbial activity of aerobic heterotrophic, anoxic heterotrophic and aerobic autotrophic activated sludge organisms with an electrochemical sensor. *Biotechnol. Lett.*, 24, 1313-1318.
- Huang, M.Y., Bungay, H.R. (1973)  
Microbe Measurements of Oxygen Concentrations in Mycelial Pellets. *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 1193-1197.
- Huang, R., Christenson, P.A., Labuda, I.M. (2001)  
Process for the Preparation of Nootkatone by Laccase Catalysis. Patentnr. US6200786.
- Janssens, L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M., Vandamme, E.J. (1992)  
Production of Flavous by Microorganisms. *Process Biochem.*, 27, 195-215.
- John, G.T., Klimant, I., Wittmann, C., Heinzle, E. (2003)  
Integrated Optical Sensing of Dissolved Oxygen in Microtiter Plates: A Novel Tool for Microbial Cultivation. *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 829-836.
- Karube, I., Suzuki, S., Matsunaga, T., Kuriyama, S. (1981)  
Biochemical energy conversion by immobilized whole cells. *Annals New York Academy of sciences*, 91-99.

- 
- Kaspera, R., Krings, U., Onken, J., Berger, R.G. (2002)  
Stereospecific allylic oxidation of limonene: a route to pure S-(+)-carvone. In: *Frontiers of Flavour Science, Proc. 10<sup>th</sup> Weurman Congress, Dijon*, 397-400.
- Klimant, I., Meyer, V., Köhl, M. (1995)  
Fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology. *Limnol. Oceanogr.*, 40 (6), 1159-1165.
- Köhne, M., Schuhen, M. (1996)  
On-line-Zehrungs- und Aktivitätsmessungen zur Überwachung und Regelung von Kläranlagen. *Abwassertechnik*, 5, 52-55.
- Kraft P., Bajgrowicz J. A., Denis C., Frater G. (2000)  
Allerlei Trends: die neuesten Entwicklungen in der Riechstoffchemie. *Angew. Chem.* 112, 3106-3138.
- Kreiner, M., Harvey, L.M., McNeil, B. (2003)  
Morphological and enzymatic responses of a recombinant *Aspergillus niger* to oxidativ stressors in chemostat cultures. *J. Biotechnol.*, 100, 251-260.
- Kreysa, G., Sell, D., Krämer, P. (1990)  
Bioelectrochemical fuel cells. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem*, 94, 1042-1045.
- Krings, U., Berger, R.G. (1998)  
Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 1-8.
- Lämmel, A. (1999)  
Entwicklung eines Sensorsystems zur Messung der biologischen Aktivität von Mikroorganismen und tierischen Zellen. Dissertation FB Chemie Universität Hannover
- Lee B. K., Ryu D.Y., Thoma R.W., Brown W.E. (1969)  
Induction and Repression of Steroid Hydroxylases and Dehydrogenases in Mixed Culture Fermentations. *J.gen. Microbiol.* 55, 145-153.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997)  
Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway, *FEBS Lett.*, 400, 271-274.
- Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M., Lesage-Meessen, L. (1999)  
Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Tibtech July*, 17, 282-289.
- Loza-Tavera, H. (1999)  
Monoterpenes in Essential Oils. In: Shahidi, F., Kolodziejczyk, P., Whitaker, J.R., Lopez Munguia, A., Fuller, G. (Hrsg). *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*. In: Back, N., Cohen, I. R., Kritchevsky, D., Lajtha, A., Paoletti, R. (Hrsg). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York. 49-62.
-

- Luckner, M. (1990)  
Biosynthesis of Isoprenoids. In: Luckner, M. (ed) Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. Springer, Berlin, 182-214.
- Martens, R., Wetzstein, H.G., Zadrazil, F., Capelari, M., Hofmann, P., Schmeer, N. (1996)  
Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by wood-rotting fungi. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4206-4209.
- Matsunaga, T., Karube, I., Suzuki, S. (1979)  
Electrode System for the Determination of Microbial Populations. Appl. Environ. Microbiol., 37, 117-121.
- Muheim, A., Häusler, A., Schilling, B., Lerch, K. (1997)  
The Impact of Recombinant DNA-Technology on the Flavour and Fragrance Industry. In: Flavours and fragrances: proceedings of a conference, Warwick, RSC, Cambridge, 11-20.
- Muheim, A., Lerch, K. (1999)  
Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 456-461.
- Muheim, A., Müller, B., Münch, T., Wetli, M. (1998)  
Process for the production of vanillin. Patentnr. EP 0885968A1.
- Nobile, A. (1958)  
Process for Production of Dienes by *Corynebacteria*. Patentnr. 2837464.
- O'Riordan, T.C., Buckley, D.O.V., O'Connor, R., Papkovsky, D.B. (2000)  
A Cell Viability Assay Based on Monitoring Respiration by Optical Oxygen Sensing. Anal. Biochem., 278, 221-227.
- Ohloff, G. (1994)  
Scent and fragrances - the fascination of odors and their chemical perspectives. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg. ISBN 0-387-57108-6, 127-133.
- Onken, J. (1998)  
Biotechnologie lipophiler Substrate in wässrigen Systemen: Terpenttransformationen durch Basidiomyceten als Modell. Dissertation FB Chemie Universität Hannover
- Onken J., Berger R. G. (1999)  
Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. J. Biotechnol., 69, 163-168.
- Pagga, U. (1985)  
Stoffprüfungen in einem Kläranlagenmodell - Abbaubarkeits- und Toxizitätstests im BASF-Toximeter. Z. Wasser- Abwasser-Forsch., 18, 222-232.
- Patchett, R.A., Kelly A.F., Kroll R.G. (1989)  
Investigation of a Simple Amperometric Electrode System to Rapidly Quantify and Detect Bacteria in Foods. J. Appl. Bacteriol., 66, 49-55.

- 
- Pescheck, M., Schrader, J., Sell, D. (2002)  
Characterization of Starter Cultures by Determining Microbial Activity Using an Electrochemical Gel Cell. *Food Biotechnol.*, Vol.16, No. 2, 121-134.
- Peterson, D.H., Murray, H.C., Eppstein, S.H., Reineke, L.M., Weintraub, A., Meister, P.D., Leigh, H.M. (1952)  
Microbiological Transformations of Steroids: I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 5933-5936.
- Petzold, K., Wiechert, R. (1976)  
Verfahren zur Herstellung von Östren-3,17-dion-Derivaten. *Offenlegungsschrift DE 2456068*.
- Piel, J., Boland, W. (1997)  
Highly Efficient and Versatile Synthesis of Isotopically Labelled 1-Deoxy-D-xylulose, *Tetrahedron Lett.*, Vol.38, No. 36, 6387-6390
- Pollard, D.J., Buccino, R., Connors, N.C., Kirschner, T.F., Olewinski R.C., Saini, K., Salmon P.M. (2001)  
*Real-time* analyte monitoring of a fungal fermentation, at pilot scale, using *in situ* mid-infrared spectroscopy. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 24, 13-24.
- Potter, M.C. (1911)  
Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. *Durham Univ. Phil. Soc. Proc.* 3 (22), 260-276.
- Ramsay, G., Turner, A.P.F., Higgins, I.J. (1985)  
Rapid Bioelectrochemical Methods for the Detection of living Microorganisms. *IFAC Modelling and Control of Biotechnological Processes*, 95-101.
- Richtlinie (88/388/EWG)  
Richtlinie des Rates vom 22.Juni 1988 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Aromen zur Verwendung in Lebensmitteln und über Ausgangsstoffe für ihre Herstellung (ABl. L 184 vom 15.7.1988, S.61)
- Richtlinie (98/73/EG)  
Richtlinie 98/73/EG der Kommission vom 18. September 1998 zur vierundzwanzigsten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt
- Riedel, K., Kloos, R., Uthemann, R. (1993)  
Minutenschnelle Bestimmung des BSB. *Wasser Luft Boden* 11/12, 34-38.
- Rosenbrock, P., Martens, R., Buscot, F., Zadrazil, F., Munch, J.C. (1997)  
Enhancing mineralization of [U-14-C]-dibenzo-p-dioxin in three different soils by addition of organic substrate or inoculation with white rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 665-670.
-

- Schrader, J., Berger, R.G. (2001)  
Biotechnological Production of Terpenoid Flavor and Fragrance Compounds. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Hrsg). Biotechnology, Wiley, Weinheim, 374-422.
- Sell, D. (1991)  
Untersuchungen zur Elektrochemie und Biochemie einer bioelektrochemischen Brennstoffzelle, Dissertation, Universität Dortmund
- Sell, D. (2001)  
Bioelectrochemical Fuel Cells. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Hrsg). Biotechnology, Wiley, Weinheim, 1-22.
- Shaw, A.D., Li, Z., Thomas, Z., Stevens, C.W. (2002)  
Assessment of tissue oxygen tension: comparison of dynamic fluorescence quenching and polarographic electrode technique. *Critical Care* 6 (1), 76-80.
- Shukla, V.B., Parasu Veera, U., Kulkarni, P.R., Pandit, A.B. (2001)  
Scale-up of Biotransformation Process in Stirred Tank Reactor Using Dual Impeller Bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, 8, 19-29.
- Sikkema, J., Bont de, J.A.M., Poolman, B. (1995)  
Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Rev.*, 59 (2), 201-222.
- Smith, L.L. (1984)  
Steroids. In: H.-J. Rehm, G. Reed (Hrsg). Biotechnology, Vol 6a Biotransformations, VCH, Weinheim, 31-78.
- Sprecher, E., Hanssen, H.-P. (1985)  
Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen - Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen, *Forum Mikrobiol.* 8, Nr. 1, 17-21
- Straathof, A.J.J. (2003)  
Auxiliary Phase Guidelines for Microbial Biotransformations of Toxic Substrate into Toxic Product. *Biotechnol. Prog.* 19, 755-762.
- Straathof, A.J.J., Panke, S., Schmid, A. (2002)  
The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13 (6), 548-556.
- Tan, Q., Day, D.F. (1998)  
Bioconversion of limonene to  $\alpha$ -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 96-101.
- Taubert J., Krings U., Berger R.G. (2000)  
A comparative study on the disintegration of filamentous fungi. *J. Microbiological Methods*, 42, 225-232.

- 
- Trettnak W., Kolle C., Reiningger F., Dolezahl C.O.P., Binot R.A. (1998)  
Optical oxygen sensor instrumentation based on the detection of luminescence lifetime.  
Adv. Space Res. 22 (10), 1465-1474.
- Umikalsom, M.S., Ariff, A.B., Hassan, M.A., Karim, M.I.A. (1998)  
Kinetics of cellulase production by *Chaetomium globosum* at different levels of dissolved oxygen tension using oil palm empty fruit bunch fibre as substrate. World J. Microbiol. Biotechnol., 14, 491-498.
- Van der Werft, M.J., Bont de, J.A.M, Leak, D.J. (1997)  
Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes. In: Berger, R.G. (Hrsg).  
Biotechnology of Aroma compounds. In: Scheper, T. (Hrsg). Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol 55, Springer, Berlin, 147-177.
- Vandamme, E.J., Soetaert, W. (2002)  
Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. J. Chem. Technol. Biotechnol., 77, 1323-1332.
- Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten (ABl. Nr. L 43 S.1) EU-Dok.-Nr. 3 1997 R 0258
- Vogel, A., Binz, D.  
Vorrichtung und Verfahren zur Überprüfung von Flüssigkeiten. Offenlegungsschrift DE 195 47 655 A1.
- Weber, R.W.S., Pitt, D. (2001)  
Filamentous fungi – growth and physiology. In: Khachatourians, G.G. & Arora, D.K. (Hrsg). Applied Mycology and Biotechnology, Vol.1, Elsevier, Amsterdam, 13-54.
- Weidenhamer, J.D., Macias, F.A., Fischer, N.H., Williamson, G.B. (1993)  
Just how insoluble are monoterpenes?. J. Chem. Ecol. 19, Nr. 8, 1799-1807.
- Wittmann, C., Min Kim, H., John, G., Heinzle, E. (2003)  
Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O<sub>2</sub> in shake-flasks. Biotechnol. Lett., 25, 377-380.
- Wolken, W. A. M. ., Tramper, J., van der Werf, M.J. (2002)  
Toxicity of Terpenes to Spores and Mycelium of *Penicillium digitatum*. Biotechnol. Bioeng., 80, 685-690.
- Xiang-Ming Li, Fu-Chang Ruan, Wing-Yan Ng, Kwok-Yin Wong (1994)  
Scanning optical sensor for the measurement of dissolved oxygen and BOD. Sens. Actuators, B, 21, 143-149.
-