

# Biotechnologische Prozesse mit Basidiomyceten zur Produktion von Enzymen und Aromastoffen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-LMChem. Matthias Rheinheimer**

geboren am 21. Mai 1983 in Braunschweig

2013

Referent: Prof. Dr. Ralf G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 07.03.2013

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung, die anregenden Diskussionen und das entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Arbeitsthemas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die Betreuung der analytischen und biotechnologischen Arbeiten sowie Frau Dr. Diana Linke für die Unterstützung bei proteinanalytischen Fragestellungen. Beide haben mit ihren Anregungen maßgeblich zu der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und die Möglichkeit, biotechnologische Arbeiten am Institut für Technische Chemie durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen (Institut für Pflanzengenetik, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die finanzielle Förderung durch das BMWi über die AiF und den Forschungskreis der Ernährungsindustrie (AIF 299 ZN) möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie und am Institut für Technische Chemie für das hervorragende Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude sowie eine unvergessliche Zeit. Besonders möchte ich mich bei Frau Silke Schimanski bedanken, die mich nicht zuletzt mit der Durchführung eines Großteils der gaschromatographischen Arbeiten unterstützt hat.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass sie stets zu mir standen und mich schon in jungen Jahren zum Forschen motiviert haben.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau Minh für ihren aufbauenden Optimismus, ihren liebevollen Beistand und ihre unendliche Geduld.





## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
<b>1 Zusammenfassung und Abstract .....</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung .....	1
1.2 Abstract .....	2
<b>2 Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
2.1 Biotechnologisches Potential von Basidiomyceten.....	4
2.1.1 Enzyme .....	5
2.1.2 Metabolite .....	7
2.1.3 Aromen .....	8
2.1.4 Weitere Anwendungen .....	10
2.2 Zellkultur mit Basidiomyceten.....	10
2.2.1 Wachstum und Vermehrung von Pilzen .....	10
2.2.2 Stammhaltung und -veredelung.....	11
2.2.3 Medien und Kulturparameter.....	16
2.2.4 Kultur im Labormaßstab .....	21
2.3 Basidiomyceten in Bioreaktoren.....	23
2.3.1 Feststoff-Bioreaktor .....	24
2.3.2 Rührkessel-Bioreaktor.....	26
2.3.3 Festbett-Bioreaktor .....	27
2.3.4 Weitere Bioreaktor-Systeme.....	30
<b>3 Zielsetzung .....</b>	<b>31</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
4.1 Geräte und Chemikalien.....	32
4.1.1 Allgemeine Geräte .....	32
4.1.2 Chemikalien .....	33
4.1.3 Verbrauchsmaterial.....	35
4.2 Medien .....	35
4.2.1 Standardnährlösung (SNL).....	35

4.2.2	Minimalmedium .....	36
4.2.3	SNL-Agar .....	36
4.2.4	SNL mit Hanfextrakt .....	36
4.2.5	HAj-Medium .....	37
4.3	Puffer.....	37
4.4	Kulturführung .....	38
4.4.1	Kultivierung auf SNL-Agar in Petrischalen.....	38
4.4.2	SNL-Vorkultur.....	38
4.4.3	Hauptkultur .....	38
4.4.4	Schüttelkultur mit Sauerstoffbestimmung.....	38
4.4.5	Screening.....	39
4.4.6	Bioreaktor-Kultivierung.....	39
4.4.7	Verwendete Organismen .....	41
4.5	Gaschromatographie.....	43
4.5.1	Probenvorbereitung.....	43
4.5.2	Instrumentelle Methodik.....	44
4.5.3	Thin Layer High Vacuum Distillation (TLHVD) .....	46
4.5.4	Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) .....	46
4.6	Flüssigchromatographie .....	47
4.6.1	Gel-Permeations-Chromatographie .....	47
4.6.2	Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) .....	47
4.7	Glucose.....	47
4.8	Biotrockenmasse-Bestimmung.....	48
4.9	Aufarbeitung von <i>Paecilomyces farinosus</i> .....	48
4.10	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	48
4.10.1	Laccase- und Peroxidaseaktivität.....	48
4.10.2	Peptidase-Aktivität.....	48
4.10.3	$\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität .....	49
4.10.4	Ferulasäuredecarboxylase .....	50
4.10.5	Esterase-Aktivität.....	50
4.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
4.11.1	Coomassie-Färbung.....	52

4.11.2	Zymographie.....	53
4.12	Isoelektrische Fokussierung.....	53
4.13	Entsorgungshinweise.....	54
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>55</b>
5.1	Grundlegende Versuche.....	55
5.1.1	Abschätzung der Biomasse einer Kultur.....	55
5.1.2	Animpfen der Kulturen.....	59
5.1.3	Sauerstoffversorgung der Kulturen.....	62
5.2	Vergleichende Kultivierung ausgewählter Enzym-Produzenten mittels Rührkessel- und Festbett-Bioreaktor.....	68
5.2.1	Produktion von Peptidasen mit <i>Flammulina velutipes</i> .....	69
5.2.2	Produktion eines $\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyms mit <i>Pleurotus pulmonarius</i> .....	76
5.2.3	$\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität und Esterasen aus <i>Ganoderma applanatum</i> .....	80
5.2.4	Produktion einer <i>dye decolorizing</i> Peroxidase mit <i>Hirneola auricula-judae</i> .....	83
5.2.5	Resultat des Bioreaktorvergleichs mit ausgewählten Enzym-Produzenten.....	88
5.3	Biotechnologische Erzeugung von hochwertigen Aromastoffen aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie.....	91
5.3.1	Selektion von aromagenerierenden Basidiomyceten.....	91
5.3.2	Aromabildung mit <i>Paecilomyces farinosus</i> .....	94
5.3.3	Aromabildung mit <i>Fomitopsis rosea</i> .....	97
5.3.4	Maßstabsvergrößerung mit <i>Fomitopsis rosea</i> .....	102
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

4-VG	4-Vinylguajacol (4-Ethenyl-2-methoxyphenol)
AA	Acrylamid
AAPF	N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -Nitroanilid
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AEVA	Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aU	<i>Arbitrary unit</i>
BAA	Bisacrylamid
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CBB	Coomassie-Brillant-Blau
DO	Gelöstsauerstoff
DTT	Dithiothreitol
DyP	<i>Dye decolorizing</i> Peroxidase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
EI	Elektronenstoßionisation
FA	Ferulasäure
FB	Festbett-Bioreaktor
FD	<i>Flavour dilution</i>
FVe	<i>Flammulina velutipes</i>
GAp	<i>Ganaoderma applanatum</i>
GC-FID	Gaschromatograph gekoppelt mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
GC-O	Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion
HAj	<i>Hirneola auricula-judae</i>
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung

IEX	Ionenaustauschchromatographie
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
$k_{La}$	volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient
MS	Massenspektroskopie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
OD	Optische Dichte
OTR	Sauerstofftransportrate
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
pI	Isoelektrischer Punkt
PNPB	Butansäure-p-nitrophenylester
<i>PPu</i>	<i>Pleurotus pulmonarius</i>
RI	Retentionsindex
RK	Rührkessel-Bioreaktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SNL	Standardnährlösung
TCA	Trichloressigsäure
TDS	Thermodesorption
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TLHVD	Dünnschicht-Hochvakuumdestillation
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
vvm	Volumen Gas pro Volumen Medium und Minute



# 1 Zusammenfassung und Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Aufgrund des steigenden industriellen Bedarfs an natürlichen Aromastoffen besteht Interesse an neuartigen Bildungswegen. Das pflanzennahe biochemische Potenzial von Basidiomyceten (Ständerpilzen) bietet Möglichkeiten, aus geeigneten Präkursoren natürliche Aromen zu gewinnen. Die Kultivierung von 32 Pilzstämmen unter Verwendung des industriellen Nebenstroms Rapspresskuchen als Substrat führte zur Bildung einer Vielzahl natürlicher Aromastoffgemische. Besonders vielversprechend waren die folgenden Organismen:

- *Paecilomyces farinosus*: geräucherter Schinken, Nelkenblüte sowie
- *Fomitopsis rosea*: fruchtig, blumig, breites Aromaspektrum.

Als Hauptaromakomponente der Kultur mit *P. farinosus* konnte 4-Vinylguajacol identifiziert werden. Die Aromabildung erfolgte durch Decarboxylierung von Ferulasäure. Die Reaktion wurde durch eine intrazelluläre Decarboxylase katalysiert, deren Aktivität nicht von einem Cofaktor abhing. Das Enzym hat eine native molekulare Größe von 29 kDa und einen pI von 5,2. Für eine weitere Aufreinigung wurden Ausgangsbedingungen geschaffen. Da bisher ausschließlich prokaryotische Ferulasäuredecarboxylasen charakterisiert wurden, verspricht das Enzym aus *P. farinosus* neuartige Eigenschaften, die für die kalte Produktion von Raucharoma genutzt werden könnten. Im Gegensatz zu konventionellem Raucharoma wäre dieses herstellungsbedingt frei von kanzerogenen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen.

Eine Aromaverdünnungsanalyse des Extraktes einer *F. rosea*-Kultur ergab, dass Octansäuremethylester, 1-Hexanol, 1-Octen-3-ol und 1-Octen-3-on die Hauptkomponenten des Aromas sind. Da die beiden letztgenannten Verbindungen für ihr pilziges Aroma geläufig sind und keine der Substanzen dem Aromaeindruck der Kultur ähnelt, kann angenommen werden, dass das Aroma durch weitere Bestandteile geprägt wird. Als weitere Komponenten wurden z. B. Acetophenon, 4-Methylbenzaldehyd und Methyl-3-methylbutanoat identifiziert.

Für eine vergleichende Maßstabsvergrößerung in einem neuartigen Festbett-Bioreaktor und einem herkömmlichen Rührkessel-Bioreaktor wurden biotechnologische Grundlagen erarbeitet. Der Vergleich von vier verschiedenen Enzymproduzenten ergab in allen Fällen deutlich höhere Enzymaktivitäten mit dem Rührkessel-Bioreaktor. Untersucht wurden verschiedene Oxidasen und Hydrolasen aus *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Hirneola auricula-judae* und *Pleurotus pulmonarius*. Ein Bioreaktorvergleich mit *F. rosea* ergab dagegen, dass die Ausbeute einiger Aromastoffe, wie Methyl-3-methylbutanoat, im Festbett bis zu zehn Mal höher ausfiel als im Rührkessel. Der verminderte Scherstress im Festbett-Bioreaktor scheint daher der Enzymproduktion mit den gewählten Stämmen keinen Vorteil zu verschaffen, könnte aber für die Aromaproduktion und die Kultur besonders scherkraftsensiver Stämme eine Alternative zu klassischen Kulturmethoden darstellen.

**Schlagerworte:** Basidiomycet, Aromastoff, Enzym

## 1.2 Abstract

Novel production procedures of natural flavours and fragrances are required to meet their increasing industrial demand. The plant-like metabolism of basidiomycota (higher fungi) promises the feasibility to generate natural flavours out of appropriate precursor compounds. Cultivation of 32 fungal strains on rapeseed oil cake, an industrial by-product, resulted in the formation of a variety of natural flavour mixtures. The most promising strains were:

- *Paecilomyces farinosus*: smoked ham, carnation, and
- *Fomitopsis rosea*: fruity, flowery, broad flavour spectrum.

4-vinyl guaiacol was identified as the main flavour compound in *P. farinosus* cultures. The substance was generated by decarboxylation of ferulic acid. This reaction was catalyzed by an intracellular enzyme which was independent from any cofactor. The decarboxylase had a native molecular size of 29 kDa and a pI of 5.2. The starting conditions for further enzyme purification are available. So far solely prokaryotic ferulic acid decarboxylases have been characterized. A fungal enzyme may have superior properties for a cold production of smoke flavourings. In contrast to conventional smoke flavourings, such enzymatic product is absent of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

Aroma extract dilution analysis of an extract of *F. rosea* culture broth resulted in octanoic acid methyl ester, 1-hexanol, 1-octen-3-ol and 1-octen-3-one as most potent odourants. Since the two latter compounds are known for fungal flavour and none of the odourants resembles the *F. rosea* extract, the flavour composition is expected to be more complex. Further determined components are acetophenone, 4-methylbenzaldehyde and methyl 3-methylbutanoate.

In a scale-up, a novel fixed bed bioreactor and a common stirred tank bioreactor were compared using four different enzyme producing strains. Hydrolases and oxidases from *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Hirneola auricula-judae* and *Pleurotus pulmonarius* were examined. In all examples the enzyme production was more efficient in the stirred tank bioreactor. However, comparison with the flavour producing strain *F. rosea* in both bioreactor types reveals an up to ten times higher amount of some compounds, as methyl 3-methylbutanoate, with the fixed bed bioreactor. Hence, the decreased shear stress in fixed bed cultivation did not stimulate the enzyme production of the tested strains, but may be of advantage for flavour production or cultivation of particularly sensitive organisms.

**Key words:** basidiomycete, flavour, enzyme



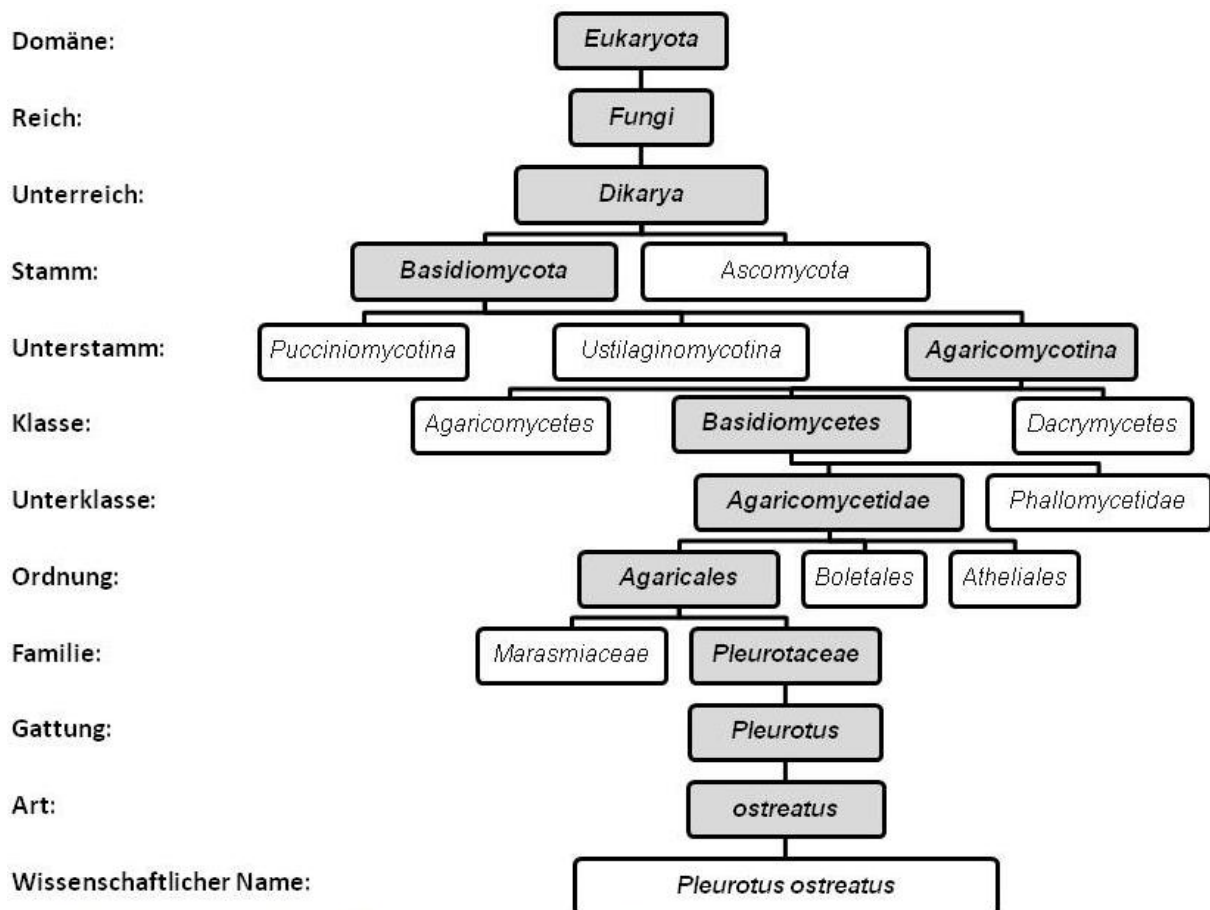
## 2 Grundlagen

Die breitgefächerten Stoffwechselfähigkeiten von Pilzen (*Fungi*) werden seit Anbeginn der Biotechnologie genutzt, um Metabolite zu gewinnen und Lebensmittel zu veredeln. Gärprozesse mit Hefen beherrscht man seit Jahrtausenden. Geläufig sind die Produktion von organischen Säuren mit *Aspergillus niger* oder die Herstellung von Penicillin mit *Penicillium chrysogenum*. Auf dem Markt sind auch Aminosäuren, Antibiotika, Aromen, Brennstoffe (Biogas, Ethanol), Einzellerprotein, Herbizide, Käse, Konservierungsmittel, Lebensmittel-Farbstoffe, Pestizide, Pilz-Fruchtkörper, Soja-Soße und Vitamine. Des Weiteren werden Peptidasen, Pektinasen, Amylasen, Lipasen, Cellulasen und zahlreiche andere Enzyme im industriellen Maßstab mittels Pilzen hergestellt (Lambert (1983); Wainwright (1992); Charaya *et al.* (1999)).

Die wirtschaftliche Nutzung von Pilzen erfordert meist aufwändige Vorarbeiten, um die Produktausbeute zu maximieren und die Kulturdauer zu reduzieren. So untersuchten beispielsweise Mehrotra *et al.* (1966) 897 *Aspergillus*-Stämme, um einen geeigneten Amylase-Bildner zu identifizieren. Im Labor werden Genom-Rekombinationen mittels Stammkreuzungen, parasexuellen Mechanismen oder Protoplastenfusion erreicht. Darüber hinaus werden zur Stammoptimierung Kombinationen aus induzierten Mutationen und Selektionsschritten eingesetzt. Für eine zunehmende Zahl an Arten ermöglichen molekularbiologische Methoden die homo- und heterologe Expression von Proteinen. Auf diese Weise kann nicht nur der Ertrag an Enzymen oder Metaboliten gesteigert werden – mit transformierten Pilzen steht außerdem eine Möglichkeit zur preiswerten Erzeugung von z. B. Säugerproteinen zur Verfügung (Nevalainen *et al.* (2001)). Neben der Verbesserung von Produktionsstämmen spielt die Optimierung der Prozessführung eine entscheidende Rolle: Medium, Bioreaktor-System und Betriebsparameter beeinflussen die Produktbildung grundlegend. Das Leistungsvermögen all dieser Methoden und das der Mikroorganismen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass die Penicillin-Produktion von ursprünglich 2 U ml<sup>-1</sup> (Fleming's original Isolat; 1 U ≈ 0.6 µg) auf über 70.000 U ml<sup>-1</sup> gesteigert wurde (Penalva *et al.* (1998)).

Betrachtet man die Produktvielfalt im ersten Abschnitt dieses Kapitels, so fällt auf, dass nahezu alle Erzeugnisse mittels Arten des Stammes *Ascomycota* (Schlauchpilze) gewonnen werden. Lediglich bei der Produktion von Fruchtkörpern dominieren *Basidiomycota*, die auch als Basidiomyceten oder Ständerpilze bezeichnet werden. In den Anfängen der Biotechnologie

wurden die omnipräsenten Ascomycota aufgrund ihrer einfachen Handhabung und des schnelleren Wachstums bevorzugt. In den vergangenen Jahrzehnten rückten *Basidiomycota*, die den *Ascomycota* sehr nahe stehen (vgl. Abbildung 2-1), vermehrt in den Fokus von Biotechnologen und Wirkstoffchemikern.



**Abbildung 2-1:** Taxonomie am Beispiel von *Pleurotus ostreatus* (Austernseitling). Der besseren Übersicht halber wird nur eine Auswahl an verwandten Taxa dargestellt.

Nach Raven *et al.* (2006); Sayers *et al.* (2009).

## 2.1 Biotechnologisches Potential von Basidiomyceten

Gegenüber anderen Mikroorganismen haben Basidiomyceten den Vorteil, dass die Pathogenität zahlreicher Arten gut untersucht ist. Die gezielte Auswahl von Speisepilzen stellt daher nicht nur die Verträglichkeit von Produkten sicher, sondern hat als vertrautes Lebensmittel auch eine hohe Akzeptanz beim Verbraucher zur Folge (Lomascolo *et al.* (1999)). *Basidiomycota* machen mit geschätzten 30.000 Arten etwa 30 % aller Pilze aus (Bresinsky *et al.* (2008)), von denen allein in China etwa 980 Arten, überwiegend *Agaricomycotina*, als essbar bekannt sind (Chang (2005)).

Daneben werden diese Organismen aufgrund ihres breiten Spektrums an Sekundärmetaboliten und Enzymen beforscht.

### 2.1.1 Enzyme

Die Lebensweise saprophytischer wie parasitärer Basidiomyceten basiert auf dem Abbau von Biopolymeren. Hierfür sekretieren sie eine einzigartige Vielfalt an Enzymen, die es ihnen erlaubt, sich an eine Fülle von Substraten anzupassen. Besonders bedeutend ist der Abbau von Lignin, einer hoch polydispersen Gruppe von phenolischen Makromolekülen. Lignin wird bei der Verholzung von Pflanzenzellwänden in ein Strukturgerüst aus Cellulose und Hemicellulose eingelagert und trägt maßgeblich zur Festigkeit von Lignocellulose bei. Die komplexe Vernetzung und dichte Struktur von Lignin behindern einen enzymatischen Abbau erheblich. Weißfäulepilze, eine taxonomisch heterologe Gruppe höherer Pilze, sind die effizientesten (Kirk *et al.* (1998)) und vermutlich wichtigsten Organismen des natürlichen Lignocellulose-Kreislaufes (Hatakka (2001)). Basidiomyceten depolymerisieren Lignin mittels einer Reihe an Exoenzymen (siehe Tabelle 2-1). Bakterielle Lignin-Destruenten sind hingegen kaum erforscht – Sequenz-Homologie-Analysen mit bekannten Enzymen, wie einer DypB Peroxidase des Actinobacteriums *Rhodococcus jostii*, lassen jedoch eine hohe Diversität erwarten (Bugg *et al.* (2011)).

**Tabelle 2-1:** Lignolytische Enzyme und ihre Hauptreaktionen (modifiziert nach Hatakka (2001))

Enzym	Cofaktor oder Substrat, Mediator	Wichtigste Reaktionen
Lignin-Peroxidase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Veratrylalkohol	Aromatischer Ring wird zu Kation-Radikal oxidiert
Mangan-Peroxidase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Mn, organische Säure als Chelator, Thiole, ungesättigte Fettsäuren	Mn(II) wird zu Mn(III) oxidiert, komplexiertes Mn(III) oxidiert Phenol-Verbindungen zu Radikalen; andere Reaktionen in Abhängigkeit von Mediatoren
Laccase (Monophenoloxidase)	O <sub>2</sub> ; Mediatoren, z. B. 4-Hydroxybenzoesäure oder 3-Hydroxyanthranilsäure	Phenole werden zu Radikalen oxidiert; andere Reaktionen in Abhängigkeit von Mediatoren
Glyoxal-Oxidase	Glyoxal, Methylglyoxal	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung
Pyranose-2-Oxidase	Glucose, Sorbose	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung
Arylalkohol-Oxidase	Aromatische Alkohole (Anisyl-, Veratrylalkohol)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung

Enzyme des Lignin-Abbaus finden bei diversen biotechnologischen Verfahren Verwendung. Laccasen beispielsweise sind nicht substratspezifisch und oxidieren o- und p-Diphenole, Aminophenole, Polyphenole, Polyamine, Methoxyphenole, Aryldiamine und einige anorganische Ionen (Yaropolov *et al.* (1994); Solomon *et al.* (1996); Morozova *et al.* (2007); Sakurai (1992); Gianfreda *et al.* (1999)). Sie sind über einen weiten pH- und Temperaturbereich aktiv. Stabilität und Aktivität kann durch eine zusätzliche Untereinheit erhöht werden (Faraco *et al.* (2008)). Durch den Einsatz von Mediatoren kann der Anwendungsbereich von Laccasen noch erweitert werden (Morozova *et al.* (2007)). So wird z. B. Indigo mit DeniLite® (Novozyme, Dänemark), einem Präparat aus Laccase und Mediator, bei der Herstellung von Jeans mit *used look* geblichen. Lignolytische Enzyme werden in der Papier-, Zellstoff- und Textilindustrie eingesetzt. Sie können für organische Synthesen, Polymerisationen, Entfärbung, bei der Bioethanol- und Biogas-Produktion, zur Sanierung von Böden und Abwässern sowie für Biosensoren und Brennstoffzellen verwendet werden. Auch die Lebensmittelverarbeitung kann von diesen Enzymen profitieren: Wein- und Bierstabilisation, Fruchtsaftherstellung, Back- und Gelierprozesse sowie die Verbesserung sensorischer Eigenschaften werden erforscht (Brijwani *et al.* (2010); Shraddha *et al.* (2011)). Unter dem Namen Maxibright™ (DSM, Niederlande) wird beispielsweise eine Peroxidase zum Entfärben von Molke vertrieben (Zorn *et al.* (2006)).

Auch Hydrolasen aus Basidiomyceten sind vielseitig einsetzbar. Beschrieben werden etwa Amylasen, Chitinasen, Cellulasen, Esterasen, Glycosidasen, Lipasen, pektinabbauende Enzyme, Phytasen oder Xylanasen. Extrazelluläre Peptidasen sind aufgrund ihrer breiten Substratspezifität und hoher Stabilität unter extremen Bedingungen (Kudryavtseva *et al.* (2008)) für Proteinhydrolyse und Speisewürze-Produktion interessant. Die Diversität an Peptidasen aus Basidiomyceten wurde bisher selten thematisiert (Zorn *et al.* (2005); Wymelenberg *et al.* (2006); Sabotic *et al.* (2007)). Grimrath *et al.* (2011) zogen 28 Arten auf unterschiedlichen Substraten. Dabei zeigte sich, dass *Flammulina velutipes* wegen hoher proteolytischer Aktivität, kurzer Kulturdauer und der Fähigkeit, Gluten zu hydrolysieren, ein geeigneter Organismus für weitere Untersuchungen ist. Dieser Speisepilz wurde bereits als Peptidaseproduzent beschrieben (Kawai *et al.* (1972); Fedorova *et al.* (1974)). Zwei Metallopeptidasen wurden näher untersucht (Shin *et al.* (1998); Park *et al.* (2007)). Aus dem Überstand von *F. velutipes* wurde außerdem eine neue

Asparaginase isoliert, die keine signifikante Homologie zu bekannten Asparaginasen aufweist (Eisele *et al.* (2011)).

Meist produzieren Basidiomyceten für eine industrielle Verwendung keine ausreichenden Enzymmengen. Neben Ansätzen zur Produktions- und Stammoptimierung verspricht die heterologe Expression von Enzymen eine deutliche Verringerung der Produktionskosten. Als Expressionssysteme werden vor allem Ascomyceten wie *Aspergillus niger* eingesetzt. Eine Übersicht über rekombinanter Laccasen findet sich z. B. in Desai *et al.* (2011). Aufgrund unterschiedlicher post-translationaler Modifikationen kann es bei diesen Ansätzen zu instabilen oder inaktiven Enzymen kommen (Conesa *et al.* (2002)). Deshalb wurden Laccasen (Rühl *et al.* (2007)) und Peroxidasen (Tsukihara *et al.* (2006)) homolog exprimiert.

Neben der extrazellulären Proteinvielfalt bilden Basidiomyceten auch neuartige intrazelluläre Enzyme. So wurde beispielsweise eine Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* isoliert, die Valencen selektiv zum begehrten Nootkaton umwandelt, welches eine natürliche Komponente des Grapefruitaromas ist (Krügener *et al.* (2010)). Basidiomyceten bilden zahlreiche Metabolite, deren Verwendung als Wirkstoff möglich ist. Enzyme, die die Synthese dieser Metabolite katalysieren, bieten das Potenzial einer biotechnologischen Wirkstoffproduktion.

### 2.1.2 Metabolite

Fruchtkörper von Basidiomyceten werden seit Jahrtausenden als Heilpilze verwendet. Bereits der Eismensch Ötzi trug vor 5300 Jahren einen Birkenporling (*Piptoporus betulinus*) mit sich – vermutlich wegen seiner antibiotischen Wirkung (Fowler (2001)). Basidiomyceten bilden Wirkstoffe mit antioxidativen, antitumoralen, immunmodulierenden, cholesterolsenkenden, antiviralen, antibakteriellen oder antiparasitären Eigenschaften (Wasser *et al.* (1999)). Der Sekundärstoffwechsel von Basidiomyceten bildet vor allem Terpene und Polyacetylene (Erkel *et al.* (1997)). Viele dieser Strukturen sind bisher nur von Basidiomyceten bekannt, wohingegen andere pflanzlichen Metaboliten gleichen (Fraga (1990)). Neben pharmakologisch wirksamen Metaboliten werden Fungizide, Herbizide, Insektizide, Aromen und Farbstoffe erforscht. Eine Auswahl findet sich in Tabelle 2-2.

Zahlreiche Polysaccharide (z. B.  $\beta$ -Glucane) und Polysaccharid-Proteinkomplexe werden unter anderem aufgrund ihrer immunmodulierenden Wirkung untersucht. Lentinan (*Lentinus edodes*),

Schizophyllan (*Schizophyllum commune*) sowie Fraktionen von *Grifola frondosa* und *Trametes versicolor* werden aufgrund vielversprechender klinischer Studien vor allem in Japan und China in Kombination mit herkömmlichen Krebstherapien eingesetzt (Lindequist *et al.* (2005)). Die verwendeten Extrakte werden vor allem aus Fruchtkörpern gewonnen. Exopolymere aus submersen Kulturen könnten jedoch über eine vergleichbare Wirkung verfügen (Kim *et al.* (2001)) und werden als Nahrungsergänzungsmittel diskutiert.

**Tabelle 2-2:** Metabolite aus Basidiomyceten und ihre Wirkung

Substanz	Produzent (Bsp.)	Wirkung	Literatur
Ergosterol	(sehr verbreitet)	Cyclooxygenase-Hemmer, Antioxidans	Zhang <i>et al.</i> (2003)
Hyphodontal	<i>Hyphodontia spec.</i>	antiviral	Erkel <i>et al.</i> (1994)
Illudine	<i>Clitocybe illudens</i>	cytostatisch, antitumoral	Shinozawa <i>et al.</i> (1979)
Lentinacin	<i>Lentinus edodes</i>	hypocholesterolemisch	Chibata <i>et al.</i> (1969)
Muscimol	<i>Amantia spec.</i>	Insektizid, Halluzinogen	Bresinsky <i>et al.</i> (1985)
Mycenon	<i>Mycena spec.</i>	Herbizid	Hautzel <i>et al.</i> (1990)
Pleuromutilin	<i>Pleurotus mutilus</i> <i>Clitopilus passeckerianus</i>	Antibiotikum	Kavanagh <i>et al.</i> (1951) Knauseder <i>et al.</i> (1976)
Strobilurine	<i>Strobilurus tenacellus</i>	Fungizid	Anke <i>et al.</i> (1977)

### 2.1.3 Aromen

Aromen sind eine besondere Klasse der Wirkstoffe: Ihre Wirkung ist eine Sinneswahrnehmung. Die Fähigkeit von Basidiomyceten, Aromen zu erzeugen, kann bereits dem Art-Epitheton vieler Spezies wie *alliaceus*, *balsameus*, *fragrans*, *hyacinthinus*, *melliolens*, *odorata*, *odoratissimum*, *pelargonium*, *putrefaciens*, *sambuceus* und *suaveolens* entnommen werden. Neben artspezifischen Komponenten sind typische Bestandteile des Aromas roher Pilze 1-Octen-3-ol, 1-Octen-3-on, 3-Octenon, 1-Octanol, 2-Octen-1-ol und Benzaldehyd sowie die geschmacksverstärkenden Verbindungen Guanosin-5'-monophosphat und Glutaminsäure. Die sensorische Qualität von submers kultiviertem Myzel unterscheidet sich meist deutlich von Fruchtkörpern. Vor allem Morcheln könnten für die submerse Produktion von Pilzaroma geeignet sein (Eyal (1991)). Zu den nicht-pilzigen Aromastoffen zählen Alkohole, Carbonyle, Terpene, Lactone, Benzoate, Phenylacetate und andere Derivate von Phenylpropanoiden. Eine Übersicht über *de novo*-synthetisierte und mittels Biotransformation gebildete Aromastoffe aus Basidiomyceten findet

sich z. B. in Jong *et al.* (1993), Krings *et al.* (1998), Lomascolo *et al.* (1999) und Chiron *et al.* (2005).

Flüchtige Verbindungen aus Fruchtkörpern locken Insekten an und können damit zu einer besseren Verbreitung von Sporen beitragen (z. B. Fäldt *et al.* (1999)). Bei den Ascomyceten *Penicillium spp.* und *Aspergillus spp.* wurde eine vermehrte Bildung an flüchtigen organischen Stoffen mit dem Zeitpunkt der Sporulation in Zusammenhang gebracht (Boerjesson *et al.* (1993)).

Die Aroma-Synthese einzelner Verbindungen kann durch Supplementierung mit Präkursoren gesteigert werden. So kann z. B. Benzaldehyd aus Phenylalanin gewonnen werden (Krings *et al.* (1996)). Durch gezielte Umsetzung von preiswerten Präkursoren können hochwertige, Pilz-untypische Aromastoffe wie Vanillin (Krings *et al.* (2001)) oder Himbeerketon (Zorn *et al.* (2003a)) produziert werden.

Obwohl die biotechnologische Produktion von Aromen als unwirtschaftlich gilt (Chmiel (2005)), werden inzwischen mehr als 100 solcher Produkte vermarktet (Schrader (2007)). Dies ist auch damit zu begründen, dass natürliche Lebensmittelinhaltsstoffe vom Konsumenten bevorzugt werden. Die resultierende Nachfrage, die durch pflanzliche Rohstoffquellen allein nicht mehr ausreichend gedeckt werden kann, führt zu einem Mehrwert natürlicher Aromastoffe. Als solche dürfen im Sinne der EG-Aromenverordnung 1334/2008 auch mit mikrobiologischen Verfahren hergestellte Aromen bezeichnet werden. Ausgangsstoffe können pflanzlicher, tierischer oder mikrobiologischer Herkunft sein.

Im Vergleich mit anderen biotechnologischen Verfahren stellt bei der Produktion von Aromen neben der Produktinhibierung vor allem die Produktgewinnung eine Hürde dar. Auch eine cytotoxische Wirkung von Edukt oder Produkt kann den Prozess behindern. Sequentielle Eduktzugabe oder *in situ* Produktgewinnung sind in solchen Fällen mögliche Vorgehensweisen. Produktgewinnung kann durch Adsorption aus dem Medium, mittels *stripping* oder Adsorption aus der Abluft, durch Extraktion (Zweiphasenprozess) oder mittels Pervaporation erfolgen. Anwendungsbeispiele wurden von Schrader (2007) zusammengefasst.

#### 2.1.4 Weitere Anwendungen

Allein in China verzehrt man die Fruchtkörper von etwa 980 Pilzarten – davon werden etwa 50 kommerziell kultiviert (Chang (2005)). Sieht man von einigen Ascomyceten wie *Tuber spp.* (Echte Trüffeln) und *Morchella spp.* (Morcheln) ab, so sind alle Speisepilze Basidiomyceten. Neben deren Fruchtkörpern kann das Myzel als Lebensmittel verwendet werden. Dieses Myzel könnte mit preiswerten Substraten produziert werden und als Protein- und Lipidquelle dienen (Eyal (1991)). Auch eine Verwendung als funktionelles Lebensmittel („Nutraceutical“) ist aufgrund der enthaltenen Nähr- und Wirkstoffe denkbar (Cheung (2008)). Hierfür könnte man den Nutzeffekt durch eine gezielte Anreicherung an Wirkstoffen steigern. Beispielsweise kann durch UV-B-Bestrahlung Vitamin D<sub>2</sub> aus Ergosterol gebildet werden (Ko *et al.* (2008)).

Aufgrund ihrer lignolytischen Enzyme eignen sich Basidiomyeten gut für die biologische Sanierung. Untersucht wurden etwa die Entfärbung industrieller Abwässer, der Abbau persistenter organischer Verbindungen im Erdreich, die Sorption von Schwermetallen und der Abbau von chlorierten Verbindungen, Pestiziden oder polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Solche Anwendungen werden aus meist mit lebenden Kulturen anstelle von Enzympräparaten realisiert.

## 2.2 Zellkultur mit Basidiomyceten

### 2.2.1 Wachstum und Vermehrung von Pilzen

Die meisten biotechnologisch interessanten Basidiomyceten sind Saprobionten, die im Waldboden, in Holz oder Laubresten gefunden werden. Daneben spielen in der Natur vor allem Mykorrhiza-Pilze eine Rolle, die in Symbiose mit Pflanzen wachsen. Außerdem gibt es zahlreiche, auch ökonomisch bedeutsame pflanzen- (Rost- und Brandpilze) und humanpathogene Arten (z. B. *Cryptococcus spp.*).

Basidiomyceten sind nahe mit Ascomyceten verwandt. Zusammen bilden beide Stämme das Unterreich der *Dikarya* (Hibbett *et al.* (2007)), deren synapomorphes Merkmal ist, dass sie innerhalb ihres Lebenszyklus über ein Stadium mit zwei monoploiden Zellkernen pro Zelle (Dikaryon) verfügen (z. B. Moore-Landecker (1996); Sadava *et al.* (2011)). Unterschieden werden beide Stämme durch die Form der Meiosporen-Bildung: bei Ascomyceten erfolgt diese als schlauchförmige Aneinanderreihung von Sporen (*Ascus*, daher der Name Schlauchpilz), bei



Basidiomyceten hingegen erfolgt die Sporenbildung auf einer ständerartigen Zelle (*Basidium*, daher der Name Ständerpilz). Ascomyceten und Basidiomyceten wachsen meist in Form von fadenförmigen Zellen (Hyphen), deren Zusammenschluss als Myzel bezeichnet wird. Daneben existieren auch einzellige Formen (Hefen), die sich teilweise unter bestimmten Bedingungen in Hyphen überführen lassen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, Raven *et al.* (2006)) oder ein Entwicklungsstadium ausmachen (z. B. Brandpilze). In beiden Stämmen gibt es Arten, die Fruchtkörper zur besseren Verteilung der Sporen bilden. Bei vielen Arten erfolgt die Bildung der Meiosporen ohne Fruchtkörperbildung; einige kommen ohne eine Befruchtungs-Phase aus (*Fungi imperfecti*). Außerdem unterscheidet man verschiedene Formen von Mitosporen (Konidien), die der asexuellen Vermehrung dienen: bei Basidiomyceten sind dies vor allem Blastosporen, Chlamydosporen und Oidien (Webster *et al.* (2007)). Konidienbildung kann durch mono- und dikaryotisches Myzel erfolgen. Bei einigen Arten ist die Plasmogamie von haploiden Oidien und kompatiblen, monokaryotischen Hyphen Teil des Lebenszyklus. Da die gezielte Sporenbildung und -keimung vieler Basidiomycetenarten mit erheblichem Aufwand verbunden ist, werden Laborstämme meist vegetativ vermehrt.

### 2.2.2 Stammhaltung und -veredelung

Die Bewahrung von lebensfähigen Zellen ohne morphologische, physiologische oder genetische Abweichung über lange Zeiträume ist nicht nur die Grundlage jeder Forschungsarbeit, sondern auch für industrielle Anwendungen unerlässlich. Die zur Erhaltung von Stämmen verwendeten Verfahren können prinzipiell in Dauerpräparate (Trocknung, Tiefkühlen) und Methoden, bei denen der Organismus seriell auf frisches Medium übertragen wird, eingeteilt werden. Zu letzteren zählen auch Öl- und Wasser-Präparate, die zwar langlebig sind, aber aufgrund des vorhandenen Wachstums zu Selektion führen können. Selektion kann auch bei Methoden mit höherer Wachstumsrate nicht ausgeschlossen werden. Erschwerend kommt hinzu, dass einige Stämme bei anhaltender Kultur auf dem gleichen Medium verkümmern, so dass das Medium regelmäßig gewechselt werden sollte (Smith *et al.* (1996)). Um reproduzierbare Eigenschaften sicherzustellen, sollte in regelmäßigen Abständen auf den ursprünglichen Stamm zurückgegriffen werden, da es kaum möglich zu sein scheint, einen Stamm über längere Zeit ohne genetische und physiologische Abweichungen zu bewahren (Ohga *et al.* (1997)). Dikaryotische Zellen verfügen über verschiedene Mechanismen zur somatischen Rekombination (Anderson *et al.* (2007)), die

diese Instabilität mit begründen könnten. Methoden der Stammhaltung von Pilzen wurden zum Beispiel von Onions *et al.* (1994), Smith *et al.* (1996) und Nakasone *et al.* (2004) zusammengefasst.

Die Auswahl eines geeigneten Organismus für ein biotechnologisches Projekt erfolgt durch Selektion geeigneter Stämme. Beim Aufbau eines solchen *screenings* liegt ein besonderes Augenmerk auf dem Detektionsverfahren geeigneter Kandidaten. Dieses sollte durch minimalen Aufwand eine hohe Durchsatzrate ermöglichen, dabei aber möglichst wenige falsch-positive oder -negative Ergebnisse liefern. Daneben ist zu beachten, dass der mikrobielle Metabolismus von den Kulturbedingungen abhängt. Die Wahl geeigneter Kulturparameter, Medien, Induktoren und der Zeitpunkt der Probenahme sollten daher auf die Fragestellung angepasst werden. Die positiven Treffer der ersten Selektion können einer weiteren Auswahl mit strengeren Kriterien unterzogen werden.

Ein naturnaher Stamm kann für Untersuchungen im Labor ausreichende Produktmengen produzieren, schöpft aber selten das Potenzial des Mikroorganismus vollständig aus. Für wirtschaftliche Anwendungen kann der Stamm den Produktionsbedingungen angepasst und die Leistung des Stammes verbessert werden. Dieser Vorgang wird als Stammoptimierung bezeichnet. Dabei wird die Produktausbeute durch eine Maximierung der Syntheseleistung und durch das Einschränken von produktzersetzenden Mechanismen erhöht. Eine Begrenzung von Nebenprodukten führt nicht nur zu einer effizienteren Ausnutzung der Nährstoffe, sondern reduziert auch den Aufwand der Produktaufreinigung. Da in den meisten Fällen die Produktbildung mit der Wachstumsgeschwindigkeit bzw. der vorhandenen Biomasse korreliert, wird diese oft gezielt erhöht. Bei einigen kontinuierlich produzierenden Anwendungen versucht man hingegen, das Wachstum zu begrenzen, um die zu entsorgende Biomasse zu verringern und lange Standzeiten zu ermöglichen. Um den wirtschaftlichen Nutzen zu erhöhen, wird eine hohe Produkttoleranz sowie eine Anpassung an preiswerte Medien (z. B. Nebenströme, Bulk-Chemikalien) und an die angestrebten Kulturbedingungen (z. B. Rührkessel- oder Festbett-Kultur) anvisiert. Produktabbau wird möglichst unterbunden. Ein weiteres Ziel kann es sein, unerwünschte Eigenschaften wie Pathogenität oder, vor allem bei Speisepilzen, Sporenbildung zu minimieren. Der erlangte Hochleistungsstamm muss über stabile Eigenschaften für eine langfristig planbare Produktion verfügen. Neben der Stammoptimierung steigert die Wahl einer

geeigneten Betriebsweise (*batch*, *fed-batch*, kontinuierlich) und die Strategie der Medien- und Substratzugabe die Effizienz.

Die Arbeitsweisen der Stammoptimierung von Basidiomyceten wurden in erster Linie zur Verbesserung von Zuchtstämmen zur Fruchtkörpererzeugung entwickelt und ähneln teilweise botanischen Zuchtverfahren, teils auch mit Ascomyceten etablierten mikrobiologischen Methoden. Ziel dieser Verfahren sind im Allgemeinen ein Stamm mit maximierter oder regelmäßigerer Fruchtkörperbildung, verkürztem Anbauzyklus, qualitativ hochwertigeren Fruchtkörpern (Aroma, Erscheinungsbild, Textur, Haltbarkeit, Nährwert), Resistenzen, vereinfachten Kulturparametern, Adaption an neue Substrate oder Reduktion der Sporulation zum Arbeitsschutz.

Traditionell wurden neue Zuchtformen durch Selektion nach spontaner Mutation gewonnen (Miles *et al.* (1997)) – ein langwieriges Verfahren, welches durch den Einsatz von Mutagenen (z. B. UV-Licht, Hydroxylamin) beschleunigt werden kann. Daneben sind vor allem Zuchtmethoden verbreitet, die auf Kreuzung basieren. Hierfür werden mit vorselektierten Stämmen Fruchtkörper generiert und Sporen gewonnen. Bei monoploiden Stämmen muss dem eine Plasmogamie mit einem zweiten Stamm vorausgehen. Die Sporen werden gegebenenfalls aktiviert (Miles (1992)), auf geeigneten Agarplatten angezogen und die neu generierten Stämme vereinzelt. Es folgt eine Selektion geeigneter Kandidaten, aus denen unter Umständen durch eine erneute Kreuzung ein neuer, dikaryotischer Stamm gewonnen wird.

Bei homothallischen Arten, zu denen ca. 10 % aller Basidiomyceten (Raper (1966)) zählen, muss bei der Kreuzung nicht auf Paarungstypen geachtet werden. Bei heterothallischen Arten hingegen bestehen Selbstinkompatibilitäts-Mechanismen, die verhindern, dass sich genetisch gleichartiges monokaryotisches Myzel paart. Arten des bipolaren Kreuzungstyps verfügen über einen einzigen Kreuzungsfaktor, von dem zwei unterschiedliche Allele für die Plasmogamie erforderlich sind. Tetrapolare Arten besitzen zwei unabhängige Kreuzungsfaktoren (A und B). Eine dikaryotische Zelle dieses Typs weist demnach für jeden der Faktoren zwei Allele auf ( $A_1B_1 + A_2B_2$ ). Bei der Sporenbildung ergeben sich folglich vier Kombinationsmöglichkeiten der Allele – zwei vom parental Typ ( $A_1B_1$ ,  $A_2B_2$ ) und zwei Rekombinationen ( $A_1B_2$ ,  $A_2B_1$ ). Das Myzel dieser vier Sporentypen kann miteinander nur dann ein neues, fruchtbares Dikaryon bilden, wenn die

zusammentreffenden Zellen unterschiedliche Allele für beide Faktoren haben. Da dies nur bei 25 % der denkbaren Möglichkeiten der Fall ist, wird im Vergleich zu homothalischen (100%) und bipolaren Typen (50%) das Inzucht-Risiko reduziert. Die Zahl verschiedener Allele pro Kreuzungsfaktor variiert je nach Art. Bei *Coprinopsis cinerea* schätzt man 160 A- und 79 B-Typen. Ihre Kombination ergibt 12640 Kreuzungstypen, und andere Arten sollen diese Zahl noch übertreffen (Casselton (2002)). Damit erklärt sich, wieso Sporen unterschiedlicher Herkunft meist 100% Paarungserfolg haben.

Obwohl Stammverbesserung mittels Kreuzung viel Aufmerksamkeit gewidmet wurde, wird der Erfolg dieser Methode durch eine Reihe an Gründen begrenzt (Miles *et al.* (1997)). Selektion ist meist aufwendig und zielführende Mutationen bzw. Rekombinationen treten selten auf. Physiologische Eigenschaften werden oft durch mehrere Gene beeinflusst, was die Wahrscheinlichkeit einer vorteilhaften Änderung mindert. Das Keimen von Sporen kann Schwierigkeiten bereiten, und auch kompatible Monokaryoten paaren sich nicht unbedingt korrekt. Beispielsweise bilden nicht alle resultierenden dikaryotischen Stämme Fruchtkörper.

Neben der klassischen sexuellen Rekombination wurden für Basidiomyceten weitere Mechanismen beschrieben, die eine inter- oder intra-chromosomale Rekombination zur Folge haben. Unter parasexueller Rekombination versteht man Formen der genetischen Neuordnung, denen keine Meiose vorangeht. Prinzipiell erfolgt dabei durch Zellfusion der Transfer des genetischen Materials zweier Zellen in eine, Verschmelzung der Kerne und *crossing over*, sowie anschließende Haploidisierung der Kerne. Parasexualität kann auch zwischen inkompatiblen Paarungstypen erfolgen. Bei Basidiomyceten findet sie häufiger als bei Ascomyceten statt (Miles *et al.* (1997)). Das Buller-Phänomen (Buller (1931)) beschreibt die Entstehung eines neuen dikaryotischen Stammes aus einem Monokaryon und einem Dikaryon. Auch wenn dabei Kreuzungsfaktoren berücksichtigt werden, können dikaryotische Zellen mit inkompatiblen Faktoren entstehen (Webster *et al.* (2007)). Dikaryotische Zellen verfügen über verschiedene Mechanismen zur somatischen Rekombination, die parasexuellen Mechanismen oder Meiose ähneln, aber auch spezifischen Gentransfer umfassen können (Anderson *et al.* (2007)). Parasexuelle Mechanismen spielten vor allem bei der Verbesserung industriell relevanter Anamorphe, wie dem Ascomyceten *Penicillium chrysogenum*, eine Rolle (Singh *et al.* (1999)). Dass bei solchen Verfahren ein Heterokaryon entsteht, ist jedoch eine Einschränkung. Dieses Problem

wurde mit der Entwicklung der Protoplasten-Fusion umgangen. Diese *in vitro*-Verschmelzung wurde für die Anwendung mit Basidiomyceten angepasst und spielt bei der Stammentwicklung von Speisepilzen eine bedeutende Rolle (Peberdy *et al.* (1993)). Protoplasten-Fusion ermöglicht auch interspezifische Rekombinationen. So erhielten Dhitaphichit *et al.* (2005) durch die Fusion von *Pleurotus ostreatus* und *P. djamora* eine Hybride, die Eigenschaften beider parentalen Arten aufwies und schneller als diese wuchs.

Erfolgreiche gentechnologische Modifikationen von Basidiomyceten werden regelmäßig beschrieben, beispielsweise von *Coprinopsis cinerea* (Binnering *et al.* (1987); Ogawa *et al.* (1998)), *Pleurotus ostreatus* (Peng *et al.* (1992)), *Agrocybe aegerita* (Noel *et al.* (1994)), *Agaricus bisporus* (van de Rhee *et al.* (1996)), *Lentinus edodes* (Sato *et al.* (1998)) und *Flammulina velutipes* (Cho *et al.* (2006); siehe auch S. 7). Die alltägliche Anwendung scheitert aber meist an einem Mangel an Effizienz der Methoden (Meyer (2008)). Die Entwicklung neuer Transformations- und Genmanipulations-Techniken, die steigende Zahl sequenzierter Genome sowie das bessere Verständnis von Genfunktionen und molekularer Zellbiologie fördern jedoch Fortschritte in dieser Disziplin. So wurden etwa für den meistproduzierten Speisepilz *A. bisporus* neue Transformationssysteme (Romaine *et al.* (2002); Romaine *et al.* (2011)) und Promotorsequenzen (Shi *et al.* (2012)) patentiert. Diese könnten nicht nur eine Veredlung von Zuchtstämmen, sondern auch die Produktion transgener Produkte für pharmazeutische Anwendungen ermöglichen. Gegenüber Tierzell-Systemen wachsen Speisepilze nicht nur schneller, sondern haben eine geringe Anfälligkeit gegen Verunreinigungen mit Humanpathogenen (Romaine (2005)). Gegenüber anderen Mikroorganismen heben sich Basidiomyceten durch ihr Glycosylierungsmuster ab, was für die Produktion von Therapeutika Vorzüge verspricht (Berends *et al.* (2009)).

Molekularbiologische Methoden tragen auch dazu bei, klassische Zuchtansätze zu beschleunigen. So kann nicht nur die Bestimmung des Paarungstyps, sondern auch die Zuordnung von Zielesigenschaften mit spezifischen molekularbiologischen Markern erfolgen (Ramirez *et al.* (2000)).

Stammverbesserung von Basidiomyceten wurde bisher selten außerhalb der Fruchtkörperproduzierenden Industrie angewendet. Da eine verbesserte Verwertung von Lignocellulose, einem

Substratbestandteil der meisten Substrate zur Fruchtkörperproduktion, eine Effizienzsteigerung zur Folge haben könnte (Ohga *et al.* (1997)), gibt es Schnittmengen mit enzymtechnologischen Anwendungen, die auf Neuentwicklungen hoffen lassen. Homolka *et al.* (1995) untersuchten die Variabilität der Produktion verschiedener Oxidasen mit *Pleurotus ostreatus* und *Lentinus tigrinus* nach UV-Bestrahlung von Protoplasten. Die Varianz der Enzymaktivitäten war allerdings bei Stämmen, die aus Basidiosporen von *Pleurotus ostreatus* generiert wurden, höher als die Varianz nach Mutagenese (Eichlerová-Voláková *et al.* (1997)). Eichlerová *et al.* (1999) untersuchten Laccase- und Peroxidaseaktivität sowie Wachstumseigenschaften von solchen monokaryotischen Stämmen und aus diesen gekreuzten Dikaryen. Neu gekreuzte Dikaryen bildeten bis zu zehn Mal mehr Laccase und hatten eine höhere Wachstumsrate. Mit einem vergleichbaren Ansatz vervierfachten del Vecchio *et al.* (2012) die Laccase-Produktion von *Pleurotus ostreatus*. Hiscox *et al.* (2010) verglichen Wachstum und Enzymaktivitäten von homo- und heterokaryotischen *Trametes versicolor*-Stämmen. Die Varianz innerhalb beider Gruppen unterschied sich nicht von der zwischen den Gruppen. Neue Kreuzungen übernahmen meist eine Mischung der Eigenschaften der elterlichen Homokaryen, verfügten aber selten über höhere Enzymaktivitäten als diese. Da ferner Clark *et al.* (2004) zeigten, dass Homokaryen von *Schizophyllum commune* 18 Monate mit gleichbleibender Geschwindigkeit wuchsen, wogegen sich Dikaryen an die Bedingungen anpassen, könnten homokaryotische Stämme für biotechnologische Anwendungen eine Alternative darstellen. Allerdings wäre es auch möglich, dass die erwähnte Anpassung, eine beschleunigtes Wachstum, Vorteile bietet.

### 2.2.3 Medien und Kulturparameter

Die Substratanforderungen der meisten Pilze sind verhältnismäßig niedrig. Als Kohlenstoffquelle kommen diverse Mono- und Polysaccharide, organische Säuren, Alkohole, Aminosäuren und teilweise Lignin infrage. In universellen Medien wird überwiegend Glucose eingesetzt. Als Stickstoffquellen eignen sich anorganische Salze und organische Quellen. Letztere werden von vielen Arten besser umgesetzt. Wichtig sind außerdem Sulfat (einige Spezies bevorzugen reduzierte Schwefelverbindungen), Phosphat, Natrium und Magnesium sowie die Spurenelemente Eisen, Zink, Mangan, Kupfer und Molybdän. Der Bedarf an einzelnen Komponenten ist nicht nur stammabhängig, sondern wird auch durch andere Kulturparameter beeinflusst. So steigt z. B. die optimale Molybdän-Konzentration durch den Gebrauch von Nitrat

als Stickstoffquelle, da Molybdän Bestandteil der Nitratreduktase ist (Miles *et al.* (1997)). Im verbreiteten Universalmedium nach Sprecher (1959) ist hingegen kein Molybdän enthalten. Möglicherweise besteht aufgrund der organischen Stickstoffquelle Asparagin kein Bedarf an Molybdän, oder es reicht der Eintrag durch Fremdbestandteile anderer Komponenten.

Zahlreiche Pilzarten sind aufgrund ihrer Spezialisierung auf nährstoffreiche ökologische Nischen auxotroph. Verbreitet ist vor allem ein Defizit an Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>), wobei oft nur Mangel an einer Untereinheit – Thiazol- oder Pyrimidin-Ring – herrscht. Auch Biotin (Vitamin B<sub>7</sub>) muss einigen Stämmen supplementiert werden. Seltener sind laut Miles *et al.* (1997) ein Mangel an Nicotinsäure (Vitamin B<sub>3</sub>), Pantothensäure (Vitamin B<sub>5</sub>) und p-Aminobenzoesäure (Baustein von Folsäure). In einigen Fällen ist eine Supplementierung aufgrund einer geringen Eigensynthese nicht zwingend erforderlich, beschleunigt aber das Wachstum erheblich.

Vollmedien sind einem schnellen Wachstum dienlich, während Minimalmedien gezielt selektieren, physiologische Effekte auslösen oder Sporulation fördern. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen definierten Medien, die aus genau abzugrenzenden Reinstoffen bestehen (z. B. Sprecher (1959)), und Komplexmedien, die Bestandteile wechselnder Qualität wie Hefeextrakt oder Pepton enthalten. Erstere erhöhen die Reproduzierbarkeit und Rückverfolgbarkeit von Ergebnissen, letztere sind universeller und preiswerter. Nährmedium dient nicht nur als Wachstumsgrundlage, sondern beeinflusst Morphologie und Physiologie. So konnte z. B. durch die Wahl der Stickstoffquelle nicht nur Wachstumsgeschwindigkeit und proteolytische Aktivität von *Rhizoctonia solani* gesteigert werden, sondern mittels substratspezifischer Induktion einzelne Peptidase-Typen vermehrt erhalten werden (Kudryavtseva *et al.* (2010)). Übersichten gängiger Medien finden sich etwa in Kirk *et al.* (2008). Eyal (1991) fasst den Einfluss von Substratkomponenten auf die Myzel- und Pilzarombildung wie folgt zusammen:

- Eine hohe Konzentration an Kohlenhydraten ist für eine hohe Biomasseausbeute nötig; eine zu hohe Glucose-Konzentration kann jedoch das Wachstum einiger Arten hemmen.
- Das Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis (C:N) beeinflusst Geschwindigkeit und Ausbeute der Biomassebildung sowie den Lipid- und Proteingehalt der Zellen.
- Die Biomasse-Konzentration fällt in synthetischen Medien geringer aus als in komplexen.

- Die Effizienz der Protein- und Aromabildung hängt von der C- und N-Quelle ab.
- Die Verwertung von Nebenströmen kann den Zusatz einer Stickstoffquelle und Spurenelementen erfordern.
- Medienkomponenten, wie z. B. Spurenelemente, beeinflussen Gehalt und die Verteilung von Aromen und Aminosäuren.
- Zusatz von nichtionischen Tensiden, Fettsäuren und Lipiden kann die Wachstumsrate stimulieren (z. B. Wardle *et al.* (1969), Yang *et al.* (2000), Bolla *et al.* (2011)).

Letzteres könnte durch eine veränderte Morphologie, einem wichtigen Parameter bei der Kultur filamentöser Pilze (Grimm *et al.* (2005); Tepwong *et al.* (2012)), erklärt werden. So führen filamentöse Wachstumsformen, wie sie auch durch den Zusatz von Polyacrylsäure erzielt werden, mit verschiedenen Basidiomyceten zu einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit und Biomasse-Ausbeute (Jones *et al.* (1988)). Auch Ascomyceten wurden diesbezüglich untersucht. Einige Polymerzusätze (Natriumalginat, Dextran, Polyacrylsäure) führen zu einem dispersem Wachstum (Elamayerhi *et al.* (1973a); Elamayerhi *et al.* (1973b); Elamayerhi (1975); Wang *et al.* (2005)). Allerdings wurde durch den Zusatz von Natrium-Carboxymethylcellulose die Pelletgröße erhöht (Metz *et al.* (1977)). Auch ein Effekt nichtionischer Tenside wurde für Ascomyceten beschrieben. Eine erhöhte Cellulase-Produktion mit *Nectria catalinensis* (Pardo (1996)) oder *Aspergillus terreus* (Shahriarinnour *et al.* (2011)) durch Zusatz von nichtionischen Tensiden oder Polyethylenglycol könnte mit einer Interaktion an der Zellwand begründbar sein, die zu erhöhter Permeabilität der Membran oder Freisetzung zellgebundener Enzyme führt (Rege *et al.* (2002); Shahriarinnour *et al.* (2011)). Ein enzymstabilisierender Effekt ist ebenfalls denkbar (Reese (1980)). Der Zusatz nichtionischer Tenside reduziert den Sauerstoffeintrag. Daher könnte eine vermehrte Enzymproduktion durch metabolische Regulation zu erklären sein (Hulme *et al.* (1970)). Mikropartikel beeinflussten ebenfalls die Wachstumsform von Pilzen (Kaup *et al.* (2008); Driouch *et al.* (2012)). Phospholipide steigerten die Peroxidase-Sekretion von *Phanerochaete chrysosporium*. Dies korrelierte mit einer gesteigerten Zahl an endoplasmischen Retikula und Mitochondrien (Capdevila *et al.* (1990)).

Die genannten Substanzklassen werden auch als Hilfsmittel, wie beispielsweise als Antischaummittel oder zur Emulsion von Substraten, eingesetzt. Ihr Einfluss auf die Enzymproduktion mit Basidiomyceten-Kulturen ist bekannt. Beispielsweise wurde bei Arbeiten



von Bettin *et al.* (2009) mit *Pleurotus sajor-caju* durch Polypropylenglycol eine verminderte Laccase-Aktivität, aber eine gesteigerte Aktivität von Peroxidasen festgestellt.

Der oben erwähnte Einfluss der Morphologie auf die Produktbildung kann auch zu Mess- und Regelungszwecken genutzt werden (Znidarsic *et al.* (2001)). Diese hängt mit einfach bestimmbar rheologischen Eigenschaften zusammen (Stanbury (1995)), die ihrerseits verschiedene Effekte haben: beeinflusst werden Stoff- und Temperatureaustausch, Scherstress und Mischungseffizienz (Olsvik *et al.* (1992)). Umgekehrt wird die Morphologie neben den aufgezählten auch von Standardparametern (Medium, pH, Durchmischung) beeinflusst (Panda *et al.* (2009)). Zu diesen zählt auch die Sauerstoffversorgung (Fazenda *et al.* (2010)).

Vor allem für die Produktion von Speisepilzen (Vorkultur), aber auch für andere Anwendungen wurden Medien angepasst (Tabelle 2-3). Nicht nur das Optimieren von Nährmedien spielt für den ökonomischen Erfolg eines biotechnologischen Projektes eine bedeutende Rolle. Wahl und Konzentration von Induktoren haben ebenfalls bedeutenden Einfluss. Methoden für die Medienoptimierung wurden z. B. kürzlich von Link *et al.* (2011) verglichen.

**Tabelle 2-3:** Auswahl an optimierten Medien für verschiedene Basidiomyceten

<b>Art</b>	<b>Produkt</b>	<b>Literatur</b>
<i>Flammulina velutipes</i>	Biomasse	Song <i>et al.</i> (1995)
<i>Lentinus edodes</i>	Biomasse	Spaether (2000)
<i>Ganoderma australe</i>	Biomasse, $\beta$ -Glucan	Papaspyridi <i>et al.</i> (2011)
<i>Grifola frondosa</i>	Biomasse, Exopolymer	Cui <i>et al.</i> (2006)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Laccase	Tinoco <i>et al.</i> (2011)
<i>Trametes multicolor</i>	Laccase	Hess <i>et al.</i> (2002)
<i>Trametes versicolor</i>	Laccase	Tavares <i>et al.</i> (2006)

Eine gewisse Sonderstellung unter den Medien nimmt die Verwendung von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie als Substrat ein. Dabei handelt es sich meist um Rückstände von Verarbeitungsprozessen wie Reinigungsschritten, Extraktionen oder Fermentationen. Biotreber, Karottenschalen, Melasse, Molke, Gluten oder Kaffeesatz sind geläufige Beispiele. Der Großteil der Nebenströme wird als Futter- und Düngemittel oder thermisch verwertet. Sie stehen daher preiswert zur Verfügung, unterliegen aber chargenabhängigen Schwankungen. Ihre

Zusammensetzung ist meist heterogen und kann Mikroorganismen ohne weitere Supplementierung ausreichendes Wachstum ermöglichen. Ein Zusatz von Spurenelementen oder Stickstoff kann, in Abhängigkeit vom Organismus, die Produktausbeute erhöhen (Elisashvili *et al.* (2008)).

Des Weiteren wird die Produktivität eines Ansatzes von den Kulturbedingungen beeinflusst, die teilweise methodenabhängig sind. Je nach Kulturtyp gibt es verschiedene Ansätze, den Sauerstoffeintrag zu verbessern. Diese Ansätze stehen jedoch oft im Gegensatz zu den physiologischen Anforderungen des Produktionsstammes, so dass ein Kompromiss eingegangen werden muss (siehe Abschnitt 2.3.2). Optimale Einstellung von Temperatur- und pH-Wert sind nicht nur stamm-, sondern gegebenenfalls auch produktabhängig. Standardmedien sind meist gar nicht oder schwach gepuffert, so dass Organismen den pH-Wert leicht beeinflussen können – eine genauere Steuerung kann jedoch mittels geeigneter Puffer erreicht werden (Child *et al.* (1973)). Der pH-Wert lenkt das Wachstum nicht nur über den Einfluss auf Enzymaktivitäten, sondern auch über die Löslichkeit von Nährstoffen und die Permeabilität der Zellwand. Mikroorganismen beeinflussen den pH-Wert durch die Aufnahme von Nährstoffen (Säure-Aufnahme: Erhöhung des pH-Werts,  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme: Verringerung des pH-Werts) und durch Konversion neutraler Komponenten (aus Glucose: Bernsteinsäure, Brenztraubensäure, Gluconsäure, Oxalsäure, Zitronensäure). Pilze können in einem vergleichsweise breiten pH-Bereich wachsen, der in Abhängigkeit der Verfügbarkeit verschiedener Substrate mehrere Optima haben kann. Natürlich findet man auch hier eine breite Streuung: Neben zahlreichen säuretoleranten Arten sind auch alkalitolerante Arten bekannt (*ammonia fungi*, Sagara (1975)). Da Ascomyceten sich an den Umgebungs-pH-Wert durch Expression geeigneter Proteine anpassen (Penalva *et al.* (2002)), ist ein vergleichbarer Mechanismus bei Basidiomyceten zu erwarten. Besseres Wachstum und höhere Produktausbeute konnten durch pH-Kontrolle auch mit Basidiomyceten erreicht werden (z. B. Lee *et al.* (1999), Janusz *et al.* (2006), Tavares *et al.* (2006), Zou *et al.* (2009), Zhu *et al.* (2011)).

Die mögliche Einwirkung von Licht überrascht vielleicht bei nicht-photosynthetischen Organismen, wurde aber mit zahlreichen Beispielen belegt. Vor allem die Entwicklung von Fruchtkörpern wird durch Licht gesteuert. So wächst *Lentinula edodes* (Shiitake) im dunkeln besser (Miles *et al.* (1997)) – seine Fruchtkörperbildung ist jedoch durch die Wahl einer

geeigneten Wellenlänge beeinflussbar (Leatham *et al.* (1987)). Bei der Fruchtkörperbildung von *Coprinopsis cinerea* werden Gewebeentwicklung, Karyogamie, Meiose und Sporenbildung durch einen Tag/Nacht-Rhythmus kontrolliert (Chaisaena (2009)). Licht kann auch zu physiologischen Änderungen führen. So ist bei *Nidula niveo-tomentosa* die Synthese von Himbeerketon, der *character impact*-Verbindung von Himbeeraroma, durch UV-A Licht induzierbar (Taupp *et al.* (2008)).

Die Wirtschaftlichkeit eines biotechnologischen Prozesses kann weiterhin gesteigert werden, indem die Prozesssicherheit gegenüber Kontaminationen erhöht wird. Dies kann durch den Zusatz von Antibiotika, einen niedrigen pH-Wert oder – bei Festphasen-Fermentation – durch eine geringe Wasseraktivität erreicht werden. Vermutlich tragen Basidiomyceten durch die Produktion von Säuren und antibiotischen Metaboliten hierzu bei.

#### 2.2.4 Kultur im Labormaßstab

Zellkultur-Methoden mit Basidiomyceten lassen sich nach verschiedenen Kriterien einteilen. Kulturen mit direktem Luftkontakt der Zellen werden als *emers* bezeichnet, Kulturen innerhalb einer wässrigen Phase als *submers*. Unterschieden wird nach Aggregatzustand des Substrates und einem möglichen Energieeintrag zur Durchmischung.

Das Animpfen von Basidiomyceten-Kulturen birgt Hürden, die in anderen Bereichen der Mikrobiologie selten sind. Wird das Inokulum aus einer vorangegangenen Kultur gewonnen, so ist es aufgrund des pelletösen Wachstums und der Inhomogenität nicht möglich, mittels optischen Verfahren die Zellzahl zu bestimmen. Auch das Bestimmen der Feucht- oder Biotrockenmasse ist nicht zweckdienlich, da wegen der Inhomogenität der Pellets kein Rückschluss auf die vitale Zellzahl getroffen werden kann. Wegen Größe, Inhomogenität und Dichte der Pellets können Zählkammern nicht verwendet werden. Verwendet man zur Inokulation eine Agar-Platte, so ergeben sich ähnliche Schwierigkeiten. Hinzu kommt, dass der Ausschnitt aus der Platte schlecht normierbar ist (Plattendicke, variierende Bewuchsdichte, Gradienten). Das Homogenisieren des Ausschnitts birgt eine zusätzliche Varianz.

Sporen werden im Allgemeinen als Alternative zum Animpfen von Kulturen hyphaler Organismen gesehen. Viele Basidiomyceten-Arten bilden im Laufe ihres normalen Lebenszyklus jedoch keine asexuellen Sporen. Meiosporen werden meist nur in Fruchtkörpern gebildet, die

teils aufwändig zu induzieren sind. Die dabei erfolgende Gen-Rekombination birgt neue Schwierigkeiten. Entsprechend ist reproduzierbares Arbeiten auf Basis von Sporen ebenfalls problematisch (Rühl (2011)). Um dennoch reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, müssen alle Teilschritte der Kulturführung exakt vereinheitlicht werden.

Die wohl häufigste Form ist die Kultur auf mit Agar gefestigtem Medium in Petrischalen oder als Schrägagar. Diese sind schnell anzusetzen und leicht handhabbar. Sie eignen sich nicht nur zu Stammhaltung, Sporen- und Biomasseproduktion, sondern auch zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit, für Selektionen, direkte Enzymaktivitätsassays und die Umsetzung von im Substrat eingegossenen Edukten. Da Zellwachstum von der Grenzfläche Medium/Luft abhängt und die Schichtdicke begrenzt ist, ist das Verfahren nicht sehr effizient. Die einzige Möglichkeit, größere Ansätze durchzuführen, besteht im gleichzeitigen Ansatz zahlreicher Platten.

Die Morphologie von Basidiomyceten auf Agar-Platten ähnelt der anderer Pilze. Hyphales Wachstum beginnt radial um den Punkt der anfänglichen Inokulation. Auffällig sind morphologische Änderungen einiger Arten, die in Form von Ringen sichtbar werden. Sie lassen auf einen Wandel schließen, der für nachfolgend angeimpfte Kulturen bedeutsam sein könnte. Stücke von Agar-Platten dienen meist als Inokulum für andere Kulturen.

Kulturen mit festen, porösen Substraten können in beliebigen Gefäßen durchgeführt werden, solange eine ausreichende Luftzufuhr besteht. Basidiomyceten können auf Holzspänen, Pflanzenfasern, Nebenströmen der Lebensmittelindustrie und anderen naturnahen Substraten kultiviert werden. Daneben werden auch Agarperlen und inerte Substrate, die mit flüssigen Medien angereichert wurden, verwendet. Auf diese sogenannte Festphasen-Kultivierung, die der natürlichen Umgebung von Basidiomyceten ähnelt, wird in Abschnitt 2.3.1 näher eingegangen.

Oberflächenkulturen auf flüssigem Nährmedium („Stand-Kulturen“) weisen Charakteristika von Festphasen- und Flüssigkulturen auf. Basidiomyceten wachsen, vergleichbar mit Agar-Platten, an der Oberfläche und bilden emerses Luftmyzel aus. Daneben wachsen Zellen submers. Dabei wachsen sie, vermutlich aufgrund von Sauerstofflimitierung, nicht beliebig tief. Entsprechend kann durch eine geringe Schichtdicke die Verdünnung der Produkte reduziert werden. Zwar kann dieses Verfahren die Produktaufarbeitung vereinfachen – sonst gelten aber ähnliche Einschränkungen wie bei der Kultivierung auf Agar-Platten.

Basidiomyceten mit ausreichender Scherkraft-Toleranz können in Schüttelkultur gehalten werden. Dies wurde vermutlich erstmals von Humfeld (1948) beschrieben. In Schüttelkultur variiert die morphologische Form der Pilze von dispersen Hyphen (freie Filamente) bis zu Pellets. Letztere Form führt aufgrund des begrenzten, diffusiven Transports in die Aggregate (van Suijdam *et al.* (1981)) zu einem inhomogenen Myzel. Wittier *et al.* (1986) haben an Zellaggregaten von *Penicillium chrysogenum* gezeigt, dass ca. 150 µm unter der Oberfläche kein Sauerstoff messbar war. Die Anzahl und Größenverteilung von Pellets beeinflusst also Wachstumsrate und Produktivität, da große Pellets über weniger aktive Oberfläche pro Volumen verfügen. Die Zahl und Größe der Pellets wird durch das Inokulum beeinflusst: Besteht es aus Pellets, so vergrößern diese sich radial und begründen mit Bruchstücken wenige neue Pellets. Wird das Inokulum dagegen homogenisiert, so stehen deutlich mehr Bruchstücke als Keime für neue Pellets zur Verfügung – dies kann langfristig zu einer Wachstumsbeschleunigung führen. Homogenisieren ist jedoch schlecht normierbar und kann aufgrund von Stress- und Anpassungsprozessen eine längere *lag*-Phase der angeimpften Kultur verursachen. Der Einfluss von Kulturbedingungen auf die Pelletgröße und damit auf die Produktbildung bei Basidiomyceten ist bekannt: Neben Kolbenform, Füllhöhe, Inokulum und Medium spielt die Drehzahl und die Auslenkung des Schüttlers eine entscheidende Rolle (Kim *et al.* (2009)). Auch Ascomyceten wurden diesbezüglich untersucht (Grimm *et al.* (2005)). Medienzusätze, wie Tenside, Mikropartikel oder Polymere, können sich ebenfalls auf die Morphologie und damit auf die Produktivität auswirken (siehe S. 7). Die Wachstumsform beeinflusst auch die Viskosität und damit den Stofftransport im Medium: Ein hoher Anteil freier Hyphen führt zu einer erhöhten dynamischen Viskosität und nicht-newtonscher Rheologie.

### 2.3 Basidiomyceten in Bioreaktoren

Im Gegensatz zu vielen Ascomyceten, die meist in herkömmlichen Rührkessel-Bioreaktoren kultiviert werden können, sind die meisten Basidiomyceten in solchen Systemen schwer zu handhaben. Ihre Scherkraftempfindlichkeit sowie das pelletöse und adhärente Wachstum erfordern angepasste Bioreaktoren. Da Basidiomyceten über einzigartige Fähigkeiten der Biokonversion verfügen und das Klonen eukaryotischer, extrazellulärer Enzyme problematisch ist, besteht für wissenschaftliche wie industrielle Anwendungen Bedarf an großvolumigen Bioreaktor-Systemen.

### 2.3.1 Feststoff-Bioreaktor

Moderne Feststoff-Bioreaktoren arbeiten meist mit perforierten Tablett, auf denen sich eine Schicht von maximal 4 cm Substrat befindet. Zum besseren Luftaustausch werden diese geneigt in einem Reaktorraum unter definierten Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchte, Ventilation) positioniert. Feststoff-Bioreaktoren sind kompliziert zu standardisieren und kontrollieren; eine homogene und sterile Probenahme ist kaum realisierbar. Besonders aufgrund von unzureichendem Temperatur- und Stoffaustausch ist eine Maßstabsvergrößerung anspruchsvoll (Krishna (2005)). In Abhängigkeit der Schichtdicke des Substrates kann es infolge mangelnder Ventilation zu Sauerstofflimitierung sowie zu überschüssigem CO<sub>2</sub> kommen. Temperaturgradienten können zum Austrocknen und zu irreversiblen Zellschäden führen. Daher erfolgt eine Maßstabsvergrößerung meist lediglich durch den Einsatz von größeren Tablett. Die Schichtdicke kann durch den Einsatz von Füllkörpern erhöht werden.

Den genannten Hürden stehen diverse Vorteile gegenüber: Die im Vergleich zu submersen Verfahren oft hohe Zelldichte bedingt eine hohe Produktkonzentration und verringert damit den Aufwand des *downstream processings*. Die gute Sauerstoffzirkulation in optimierten Systemen fördert die Kapazität zusätzlich. Als Substrate können meist günstige Nebenströme verwendet werden, die dem natürlichen Lebensraum vieler Mikroorganismen ähneln und daher optimale Ausgangsbedingungen bieten. Hiervon profitieren vor allem scherkraftsensitive Organismen. Da die Bioreaktoren technisch vergleichsweise einfach konzipiert sind, fallen geringere Betriebskosten an; operative Probleme sind vergleichsweise selten (Couto *et al.* (2006)).

Die Kultur auf Tablett wird im industriellen Maßstab seit Jahrzehnten in vollautomatisierte Anlagen eingesetzt. Um die Kapazitätsrate zu verbessern, haben sich daneben andere Systeme bewährt. So gibt es Anlagen mit höherer Schichtdicke, wie beispielsweise Turmreaktoren. Dabei wird Substratumwälzung zur Kapazitätserhöhung eingesetzt; diese kann aber zu einer Wachstumsverzögerung führen. Beispiele hierfür sind Trommelreaktoren, in denen meist eine kontinuierliche Durchmischung erfolgt, und Turmreaktoren mit Rührwerk, welches auch in Intervallen eingesetzt werden kann (Durand (2003)). Eine kontinuierliche Betriebsweise erhöht ebenfalls die Kapazität (Khanahmadi *et al.* (2006)).

In einer Modifikation des Feststoff-Bioreaktors, dem Rieselbett-Bioreaktor, wird das Substrat mit Wasser oder Medium besprüht. Auf diese Art können extrazelluläre Enzyme kontinuierlich ausgewaschen werden. Bei Verwendung inerter Träger ermöglicht die Nährstoffzufuhr über das Medium eine bessere Prozesskontrolle. Im Vergleich mit submersen Verfahren konnten mit einem Rieselbett-Bioreaktor deutlich höhere Laccase- (*Pleurotus ostreatus*) und Lipase-Konzentrationen (*Neurospora intermedia*) erzielt werden (Lenz *et al.* (2004)).

Die überwiegend statischen Bedingungen in Feststoff-Bioreaktoren begünstigen filamentöses Wachstum. Daher werden vor allem mit jenen Pilzen mit Feststoff-Bioreaktoren bessere Ausbeuten als mit submersen Verfahren erzielt, deren natürlichem Habitat das feste Substrat nahe kommt. Im industriellen Maßstab werden inzwischen mittels diversen Organismen Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen, Pektinasen, Amylasen,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidasen, Tannasen und Peptidasen mit dieser Methode gewonnen (Singh *et al.* (2008)). Auch Metabolite, wie z. B. Aromastoffe, können wirtschaftlich auf festen Substraten produziert werden. So stellte das britische Unternehmen *Stafford Speciality Ingredients* ein Verfahren vor, bei dem *Aspergillus niger* aus Kokosnussöl eine Mischung an Methylketonen mit einer Ausbeute von 40% bildete (Humphrey *et al.* (1990), Janssens *et al.* (1992)).

Alle traditionellen biotechnologischen Prozesse, die bislang mit filamentösen Pilzen durchgeführt wurden, basierten auf Feststoff-Prozessen. Geläufig sind die *Kōji*-Fermentation mit *Aspergillus oryzae*, mit der unter anderem Sojasauce hergestellt wird, oder die Erzeugung von Fruchtkörpern als Speisepilze. Dennoch wurden die ersten industriellen Prozesse zur Enzymproduktion mit Ascomyceten wie *A. niger* und *A. oryzae* submers durchgeführt (Hjort (2007)). Trotz der Vorteile von Feststoff-Bioreaktoren, die beispielsweise von Hölker *et al.* (2004) zusammengefasst wurden, wird diese Kulturform bestehende Methoden kaum ablösen: Die Investition in neue Systeme zur Ablösung bereits vorhandener ist selten rentabel. Hinzu kommt der Aufwand durch die Prozessumstellung. Gleichwohl ist zu erwarten, dass mit zunehmender technischer Entwicklung immer mehr neue Prozesse auf Basis von Feststoff-Bioreaktoren etabliert werden (Pandey *et al.* (2008)).

### 2.3.2 Rührkessel-Bioreaktor

Obwohl andere Bioreaktortypen bezüglich Bau- und Unterhaltskosten ökonomischer sind (Wainwright (1995)) und die Produktausbeute mit anderen Systemen höher sein kann (z. B. Zhang *et al.* (2010)), ist der klassische Rührkessel der am weitesten verbreitete Bioreaktortyp. Sein wesentlicher Vorteil ist die Eignung für alle technische Maßstäbe sowie seine flexiblen Einsatzmöglichkeiten (Storhas (2000)).

Bei einem Rührkessel-Bioreaktor handelt es sich um einen aufrecht stehenden Zylinder mit eingebautem Rührwerk und gegebenenfalls Strombrecher, in dem Nährmedium, Biomasse und Luft durchmischt werden. Unter den diversen Rührern ist aufgrund seines hohen Wirkungsgrades der Sechsstab-Scheibenturbinenrührer, kombiniert mit Strombrechern, am geläufigsten. Temperiert wird über einen Doppelmantel, eine Heizmanschette oder Tauchsonden, bei größeren Ausführungen auch über Halb- oder Vollrohrschlangen.

Scherkraftempfindliche Organismen wie Basidiomyceten können im Rührkessel-Bioreaktor nur mit niedrigen Drehzahlen des Rührwerkes kultiviert werden. Zur weiteren Reduktion der Scherkräfte setzt man meist große Propellerrührer ein und verzichtet auf Kosten von Wirbelbildung auf strömungsbrechende Einbauten. Da Basidiomyceten adhärent wachsen, erfolgt der Lufteintrag nicht mittels einer Fritte, sondern über einen Ringbegaser. Erschwerend kommt bei filamentösen Pilzen hinzu, dass diese sich in strömungsarmen Bereichen ansammeln, festsetzen und große Agglomerate bilden. Dadurch entstehen nicht nur unterversorgte Bereiche – ist eine Sonde betroffen, so fällt die Regelung des Bioreaktors aus. Entsprechende Einschränkungen kann es mit der Armatur zur Probeentnahme geben. Germerdonk *et al.* (1987) schlagen als Lösung dieser Problematik von oben bis unten durchgehende Wendelrührer vor, die vom Wellenschaft bis zur Fermenterwand reichen. Mit Stufen, Löchern oder einem Leitrohr versehen ermöglichen solche Rührer nicht nur einen gleichmäßigen Energieeintrag, sondern erhöhen auch die Verweilzeit von Luftblasen und damit den Sauerstoffeintrag.

Trotz dieser Modifikationen ist Rührkessel-Kultivierung für adhärente Zellen oder scherkraftempfindliche Pilze nur begrenzt einsetzbar (Couto *et al.* (2005)). Viele Basidiomyceten-Arten wachsen im Rührkessel schlecht oder gar nicht. Andere wachsen zwar, aber verändern ihre Morphologie nachteilig. Viele Autoren setzen daher auf Feststoff-Bioreaktoren (siehe Abschnitt



2.3.1). Bisher wurde kaum Beispiele beschrieben, bei denen Basidiomyceten im Rührkessel höhere Enzymaktivitäten produzierten als in Feststoff-Bioreaktoren (Télez-Télez *et al.* (2008)).

Wie bei Schüttelkulturen (siehe Abschnitt 2.2.4) wird die Produktivität von Pilzen im Rührkessel durch die Morphologie beeinflusst. Die Ausbildung von Pellets wird hier zusätzlich durch die Belüftungsrate und die Umdrehungszahl des Rührwerks beeinflusst – für ausgeprägte Pelletbildung muss meist beides niedrig gewählt werden (Eyal (1991)). Beide Parameter beeinflussen zudem den Sauerstoffeintrag und den zellulären Stress durch Scherkräfteintrag. Es muss also ein auf das Produkt abgestimmter Kompromiss gefunden werden. Erschwerend kommt hinzu, dass sich mit der Morphologie auch die rheologischen Eigenschaften der Kulturbrühe ändern. Diese Zusammenhänge wurden vor allem für Ascomyceten näher untersucht (z. B. Pavko (2001); Wucherpfennig *et al.* (2010)).

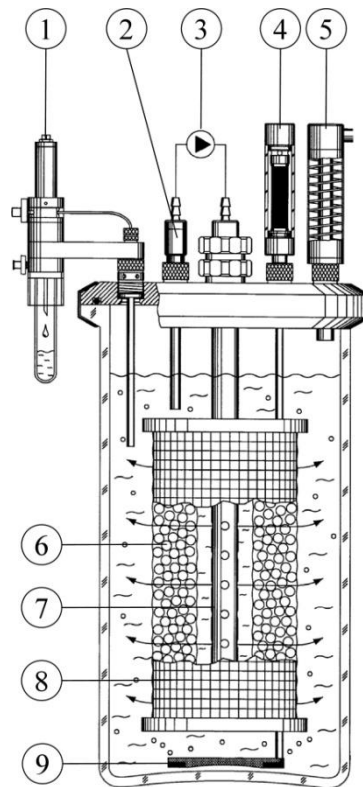
### 2.3.3 Festbett-Bioreaktor

Rührkessel- und Feststoff-Bioreaktor sind die geläufigsten Kultursysteme, um filamentöse Pilze zu kultivieren. Beide Kulturformen haben ihre Vorzüge, aber bei gewissen Anwendungen auch schwerwiegende Nachteile (vgl. Abschnitt 2.3.1 und 2.3.2). Da er Vorzüge von Rührkessel- und Feststoff-Systemen vereint, könnte der Festbett-Bioreaktor eine alternative Prozessform für die Kultivierung von Basidiomyceten darstellen. Festbett-Bioreaktoren wurden in der Säugerzellkultur als scherkraftarme Methode etabliert (Fassnacht (2001)).

In einem Festbett-Bioreaktor wachsen Zellen immobilisiert auf einem Träger, durch den mit Sauerstoff angereichertes Medium gepumpt wird (Abbildung 2-2). Das Trägergefäß befindet sich aus praktischen Gründen meist im Inneren des Konditionierungs-Behälters, in dem das Medium belüftet, temperiert, der pH reguliert und ggf. Medium ausgetauscht wird. Dieses Prinzip ermöglicht den Transfer vieler Vorzüge submerser Kulturformen, bietet aber gleichzeitig eine scherkraftarme Umgebung.

Kennzeichnend für Festbett-Bioreaktoren ist demnach, dass adhären Zellen in makroporösen Trägermaterialien eine Oberfläche zum Besiedeln geboten wird. Dabei kann eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet werden, ohne Zellen durch direkte Begasung zu schädigen. Die Betriebsweise ermöglicht nicht nur eine scherkraftarme Umgebung, sondern ist aufgrund der Zell-Rückhaltung gut für kontinuierliche Arbeiten über lange Standzeiten geeignet. Mit

Säugerzellen wird zudem aufgrund der hohen Zelldichte im Vergleich zu herkömmlichen Suspensionsreaktoren eine deutlich höhere Produktausbeute erreicht (Bohmann *et al.* (1995a)).



**Abbildung 2-2:** Prinzip eines Festbett-Bioreaktors der Firma medorex mit radialer Anordnung.  
 1: Probeentnahme-Armatur, 2: Ansaugrohr, 3: Medienkreislauf mit peristaltischer Pumpe, 4: Zuluftarmatur mit Sterilfilter, 5: Abluftkondensator, 6: Zellträger, 7: Medienauslass in das Festbett, 8: Gitterkäfig als Behältnis des Zellträgers, 9: Ringbegaser. Die Tauchsonden für die Temperatur-Regulierung, pH- und O<sub>2</sub>-Messung sind nicht abgebildet. (Abbildung modifiziert nach medorex e. K.)

Prinzipiell unterscheidet man zwei Formen an Festbett-Bioreaktoren. In der einfacheren Bauweise wird das Festbett linear durchströmt. Dies ermöglicht beispielsweise die genaue Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und lässt damit Rückschlüsse auf Zellzahl und Stoffwechselaktivität zu. Daher ist diese Form, auch aufgrund einer einfachen Parallelisierung mehrerer Reaktoren, besonders gut für das Optimieren von Betriebsparametern geeignet. Limitierend ist jedoch, dass mit zunehmender Länge des Bettes die Sauerstoff- und Substratkonzentration des Mediums sinkt sowie die von Metaboliten steigt. Eine Maßstabsvergrößerung wird daher durchgeführt, indem der Zellträger um ein zentrales Rohr angeordnet wird (Bohmann *et al.* (1995b), Pörtner *et al.* (2007)). Durch dieses wird Medium gepumpt, welches den Träger radial durchströmt (Abbildung 2-2). Bei dieser Bauweise kann die Länge des Festbettes variiert werden - lediglich der Radius ist

aufgrund des Sauerstoffverbrauchs limitiert. Da sich das Medium, welches aus dem Festbett in das Konditionierungsgefäß fließt, mit frisch begastem Medium mischt, ist bei dieser Anordnung eine direkte Überwachung des Sauerstoffverbrauches nicht möglich. Im Handel finden sich Bioreaktoren mit einem maximalen Festbett-Volumen von 6,5 L – ein Modell zeigte aber am Beispiel eines Systems mit 84,5 L Festbett-Volumen, dass Kulturen im technischen Maßstab möglich sind (Fassnacht (2001)).

Bisher beschränkte sich die Anwendung von Festbett-Bioreaktoren im Wesentlichen auf verschiedene Säugerzelllinien. Produkte waren beispielsweise Antikörper, Enzyme, Impfstoffe und Viren. Daneben wurden transgene Insektenzelllinien (Kwon *et al.* (2005)) eingesetzt. Des Weiteren wurden auch anaerobe Anwendungen mit Bakterien beschrieben. Beispielsweise wurde Abwasseraufbereitung von zahlreichen Autoren thematisiert (z. B. Lemmer *et al.* (1997)). Die Kultur von *Lactococcus lactis* in Festbett-Bioreaktoren ist eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Rührkessel-Verfahren (Pörtner *et al.* (2004)).

Neben dem oben beschriebenen Prinzip eines Festbett-Bioreaktors gibt es auch zahlreiche Modifikationen, in denen meist eine direkte Belüftung in den Trägerraum erfolgt. Diese wird oft mit einer deutlich geringeren Flussrate ohne Kreislauf kombiniert, um die Verweilzeit von Edukten im zellnahen Raum zu erhöhen und damit den Umsatz zu steigern. Nachteilig bei solchen Systemen ist der Scherkrafteintrag durch die direkte Belüftung sowie das Ausbilden von Kanälen und stark unterversorgten Bereichen. Säulenreaktoren dieses Typs wurden auch mit Basidiomyceten verwendet. Jaeger *et al.* (1990), Feijoo *et al.* (1995) und Moreira *et al.* (1998) produzierten so Ligninperoxidasen mit *Phanerochaete chrysosporium*. Den gleichen Organismus setzten Lewandowski *et al.* (1990) zum Abbau von 2-Chlorophenol und Zhang *et al.* (1999) zum Entfärben eines Azofarbstoffes ein. Enayatzamir *et al.* (2009) nutzten den Laccase-Produzenten *Trametes pubescens* zum Entfärben eines Diazofarbstoffs. *Bjerkandera adusta* konnte von Anastasi *et al.* (2010) unter unsterilen Bedingungen 70 Tage lang zur Sanierung von Abwasser aus der Textilindustrie eingesetzt werden. Keiner der Autoren verglich sein System bisher direkt mit einem herkömmlichen Rührkessel-Bioreaktor.

#### 2.3.4 Weitere Bioreaktor-Systeme

Neben den beschriebenen Bioreaktor-Systemen gibt es zahlreiche weitere technische Lösungen, von denen viele zur Kultur von Basidiomyceten verwendet wurden. Eine Auswahl wird im Folgenden wiedergegeben.

Die wohl einfachste Form eines submersen Bioreaktors ist der Turm- bzw. Blasensäulenreaktor. Dabei handelt es sich um ein zylinderförmiges Kulturgefäß, in dem die Luftzufuhr am Boden erfolgt. Die aufsteigenden Gasblasen führen zu einer Durchmischung. In Airlift- oder Schlaufen-Bioreaktoren wird der Fluss durch ein internes oder externes Leitrohr kreisförmig geführt, um eine bessere Durchmischung zu erzielen. Im Vergleich mit einem Rührkessel konnten Song *et al.* (1987) in einem solchen System eine fünffache Steigerung der Wachstumsrate von *Lentinula edodes* erzielen. Schlaufenreaktoren werden für die Produktion von Zitronensäure und Einzellerprotein eingesetzt. Für die Abwasseraufbereitung werden *deep shaft*-Reaktoren eingesetzt, die eine Tiefe von bis zu 150 m erreichen (Präve *et al.* (1994)).

In Hohlfaser-Bioreaktoren können Zellen auf Membranen immobilisiert wachsen. Erfolgt dabei die Versorgung mit Nährstoffen durch die Membran und die mit Sauerstoff von der Außenseite, so führen die entgegengesetzten Gradienten zu unterschiedlich versorgten Bereichen, die denen des Habitats von Basidiomyceten ähneln. Dieses Prinzip ermöglichte mit *Phanerochaete chrysosporium* die Produktion von Mangan-Peroxidase über längere Zeiträume (Sheldon *et al.* (2005); Govender *et al.* (2010)).

Einweg-Beutelreaktoren (Singh (1999)) haben sich vor allem bei der Kultur von Säuger-, Pflanzen- und Insektenzellen bewährt. Bei diesem Bioreaktor werden in einen zur Hälfte gefüllten Polyethylen-Beutel mittels einer Wippbewegung Wellen induziert. Dieses Agitationsprinzip ermöglicht eine scherkraftarme Durchmischung, wie sie auch für Basidiomyceten erforderlich ist. Der Sauerstoffeintrag erfolgt blasenfrei über die ständig erneuerte Oberfläche und ist daher begrenzt. Da die Sauerstofftransferate auch bei scherkraftminimierten Rührkessel-Bioreaktoren gering ist, könnten Beutelreaktoren eine Alternative für die Kultur von Basidiomyceten darstellen. Der gleichmäßige Energieeintrag durch Wellen könnte für filamentöse Organismen günstiger als ein Rührwerk sein.

### 3 Zielsetzung

Die Bedeutung von biotechnologisch erzeugten Feinchemikalien wie Aromastoffen stieg in den letzten Jahrzehnten stetig. Grund dafür sind nicht nur die Vorteile stereo- und regioselektiver Synthesen und umweltfreundlicherer Prozesse, sondern auch das Interesse von Verbrauchern an „natürlichen“ und „biologischen“ Produkten (Serra *et al.* (2005)). Im Gegensatz zu Prokaryoten, die hauptsächlich Fermentationsaromen wie einfache Alkohole und Ester generieren, synthetisieren Eukaryoten, insbesondere *Plantae*, das ganze Spektrum an Aromastoffen. Ein pflanzenähnlicher Aroma-Metabolismus wird auch für höhere Pilze, insbesondere für *Basidiomycota* beschrieben.

Die Projektidee besteht in der Übertragung der fermentativen Stoffbildung der klassischen Lebensmittelbiotechnologie auf submers kultivierte, biochemisch komplexe Speisepilze (*Basidiomycota*). Ausgewählte Stämme sollten im Rahmen dieser Arbeit auf Restströmen der Lebensmittelindustrie, die reich an potentiellen Präkursor-Verbindungen sind, kultiviert werden. Dabei sollten neue Stamm/ Substrat-Kombinationen für die Produktion natürlicher Aromastoff-Gemische gemäß dem EU-Recht identifiziert werden.

Als weiteres Ziel dieses Projektes waren bioprozesstechnische Grundlagen für eine Maßstabsvergrößerung der Pilzkulturen zu schaffen. Zu diesem Zweck sollten für die Aromaproduktion bedeutsame Enzymsbildner in einem herkömmlichen Rührkessel-Bioreaktor und einem neuartigen Festbett-Bioreaktor kultiviert werden. Letzterer zeichnet sich durch die Kombination der Vorzüge von Rührkessel- und Festphasen-Kultivierung aus und ist vor allem für scherkraftminimierte Prozesse etabliert (Pörtner *et al.* (2007)). Auf Basis dieser Vorarbeiten sollte eine Maßstabsvergrößerung einer Stamm/ Substrat-Kombination zur Aromastoffproduktion durchgeführt werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte und Chemikalien

#### 4.1.1 Allgemeine Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Varioklav 75S	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Autoklav	5075 ELV	Systemec (Wettenberg)
Autoklav	V-150	Systemec (Wettenberg)
Gefriertrocknungsanlage	VaCo2	Zirbus technology GmbH (Bad Grund / Harz)
IEF-Flachbettssystem	Multiphor II Multidrive XL	Pharmacia LKB (Schweden)
Inkubator	Certomat	HK B. Braun (Melsungen)
Inkubator	BE 500	Memmert (Schwabach)
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph (Kelheim)
Magnetrührer	Variomag®	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Multistepper	Handystep®	Brand (Wertheim)
Microtiter-Platten-Lesegerät	Synergy 2	BioTek (Bad Friedrichshall)
Multipipette	Transferpipette®-8	Brand (Wertheim)
pH-Meter	UB-5 Denver	Instruments (Denver, USA)
pH-Meter	GPHR 1400	NeoLab (Heidelberg)
Photometer	Genesis 10S UV-Vis	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pipetten	Transferpipette	Brand (Wertheim)
Schüttler	Multitron	Infors (Einsbach)
SDS-PAGE	Minigel-Twin System	Biometra (Göttingen)
Sterile Werkbank	Safeflow 1.2	Nunc (Wiesbaden)
Sterile Werkbank	Clean Air CA RE 4	Clean Air (Hilden)
Thermoschüttler	-	Schuttron (Quedlinburg)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)

Thermoschüttler	MHR 13	HLC Biotech (Bovenden)
Ultraschallbad	RK 100 H	Bandelin electronic (Berlin)
Ultraturrax	TP-18/10 IKA	Labortechnik (Staufen)
Vortex	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waage	EMB 600-2	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Waage	SI-234	Denver Instruments (Denver, USA)
Wasseraufbereiter	GenPure UC-TOC/UF	TKA (Niederelbert)
Wasserbad	SW22	Julabo (Seelbach)
Zentrifuge	Sorval RT7-Plus	Kendro (Langenselbold)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge	Mikro R200 R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge	Rotina R380 R	Hettich (Tuttlingen)

#### 4.1.2 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Qualität</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese	Gel 40	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar		Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	> 98 %	Carl Roth (Karlsruhe)
L-Asparagin Monohydrat	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Azocasein		Sigma
Bromphenolblau	f. Elektrophorese	Carl Roth (Karlsruhe)
$\beta$ -Carotin	> 97 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blue G 250	pure	Serva (Heidelberg)
Dichlormethan		Merck
Dithiothreitol (DTT)		Carl Roth (Karlsruhe)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	> 99 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	absolut	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe)

Ferulasäure	puriss	Aldrich/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-(+)-Glucose Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
Glycin	> 98 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin		Carl Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	> 99,5 %	Merck (Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat	> 99 %	Merck (Darmstadt)
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	99 %	Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumsulfat Heptahydrat	rein	Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumacetat	> 99 %	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	p. a.	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	> 98 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	> 99 %	Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dinatriumtartrat Dihydrat	purum	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumthiosulfat Pentahydrat	p. a.	Merck (Darmstadt)
p-Nitrophenylbutanoat	98 %	Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Precision Plus Protein Standard (All Blue)		BioRad (München)
Salzsäure	32 %	Fisher (Schwerte)
Serin		Carl Roth (Karlsruhe)
Silbernitrat	p. a.	Carl Roth (Karlsruhe)
Tego Antischaum		Evonik Industries AG (Essen)
Tegosoft		Evonik Industries AG (Essen)
TEMED	f. d. Elektrophorese	Carl Roth (Karlsruhe)
Tenax TA		Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trichloressigsäure		Carl Roth (Karlsruhe)
Tris base	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)



Triton X-100		Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tween 80		Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Zink(II)sulfat Heptahydrat	> 99 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 4.1.3 Verbrauchsmaterial

Artikel	Typ	Hersteller
Halbmikroküvetten		Sarstedt (Nümbrecht)
Handschuhe	Rotiprotect Nitrilhandschuhe	Carl Roth (Karlsruhe)
Handschuhe	Rotiprotect-Latexhandschuhe	Carl Roth (Karlsruhe)
Inserts für Vial	250 µl-Glaseinsätze	Omnilab (Bremen)
Mikrotest-Platten	PS F-Profil	Carl Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten		Carl Roth (Karlsruhe)
Petrischalen	mit Nocken	LAT GmbH (Garbsen)
Pipettenspitzen	diverse	Omnilab, LAT, Sarstedt
Pumpen-Schlauch	Santoprene LEZ-SAN 65	Lézaud & Co GmbH (Marpingen)
Reaktionsgefäße	0,2/ 0,5/ 1,5/ 2 mL	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilfilter	Filtropur 0,2 Spritzenfilter PES	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilfilter	Millex <sup>®</sup> -PTFE-Filtereinheiten 0,22 µm	Carl Roth (Karlsruhe)
Zentrifugalkonzentratoren	10.000 MWCO PES, Vivaspin 500	Sartorius AG
Zentrifugenrohre	Schraubrohre 15/ 50 mL (Falcon)	Sarstedt (Nümbrecht)

## 4.2 Medien

### 4.2.1 Standardnährlösung (SNL)

Modifiziert nach Sprecher (1959):

D-(+)-Glucose Monohydrat	30,0 g
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g

MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Spurenelementlösung	1 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

Einstellung mit 1 M NaOH auf pH 6,0.

Spurenelementlösung:

FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,08 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,09 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,03 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,005 g
Titriplex III (EDTA)	0,4 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

#### 4.2.2 Minimalmedium

D-(+)-Glucose Monohydrat	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Spurenelementlösung (s. 4.2.1)	1 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

Einstellung mit 1 M NaOH auf pH 6,0.

#### 4.2.3 SNL-Agar

10-15 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar wurden SNL-Medium zugegeben und nach Sterilisation in Petrischalen gegossen.

#### 4.2.4 SNL mit Hanfextrakt

Hanfextrakt wurde durch Auskochen (20 min, 121 °C, 2 bar) von 20 g Hanffasern (Hock GmbH & Co. KG, Nördlingen) je Liter Wasser erstellt. Dieses Extrakt wurde anstelle von Wasser zur Herstellung von SNL gemäß 4.2.1 verwendet.

### 4.2.5 HAj-Medium

Um bei der Kultur von *Hirneola auricula-judae* (HAj) eine DyP-artige Peroxidase zu induzieren, wurde folgendes Medium eingesetzt (Schmidt (2012)):

D-(+)-Glucose Monohydrat	15,0 g
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Spurenelementlösung (s. 4.2.1)	1 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

Einstellung mit 1 M NaOH auf pH 6,0.

Nach dem Autoklavieren wurden 40 mL L<sup>-1</sup> Ethanol und 300 µM CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O steril zugegeben.

### 4.3 Puffer

#### **Natriumphosphat Puffer 100 mM**

Natriumdihydrogenphosphat 12 g

Der pH-Wert wurde mit konz. HCl bzw. NaOH auf 6,5 bis 8,0 eingestellt und ad 1 L mit Wasser aufgefüllt.

#### **Tartratpuffer 200 mM pH 4,5**

Dinatriumtartrat 46,016 g

VE Wasser ad 1 L auf

Der pH wurde auf 4,5 eingestellt; der Puffer ist max. 4 Wochen haltbar.

## 4.4 Kulturführung

### 4.4.1 Kultivierung auf SNL-Agar in Petrischalen

Zur eigenen Stammhaltung wurden die Organismen auf SNL-Agar Arbeitsplatten gehalten. Diese wurden regelmäßig aus der Stammsammlung neu angezogen. Dafür wurde Myzel aus der Stammsammlung oder ein 1 cm<sup>2</sup> Ausschnitt einer bewachsenen Platte auf eine neue Agarplatte inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C im Dunkeln. Nachdem das Myzel ca.  $\frac{3}{4}$  der Platte bedeckte, wurde diese ggf. bei 4 °C gelagert – dies wurde jedoch außerhalb des *screenings* vermieden.

### 4.4.2 SNL-Vorkultur

Schikane-freie Erlenmeyerkolben wurden zur Hälfte mit SNL gefüllt und autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Ein 1 cm<sup>2</sup> Ausschnitt einer bewachsenen Agarplatte wurde in den Kolben überführt und mit einem Ultra-Turrax Stab zerkleinert. Anschließend wurden die Kulturen bei 24 °C und 150 rpm inkubiert. Vorkulturen wurden i. d. R. 7 d geführt, bis ein ausreichender Bewuchs vorhanden war.

### 4.4.3 Hauptkultur

Schikane-freie Erlenmeyerkolben wurden zu 45 % des Nennvolumens mit Medium gefüllt und autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Inokuliert wurde mit 10% des Medienendvolumens, so dass das Gesamtvolumen der Kultur der Hälfte des Kolbenvolumens entsprach. Das Inokulum wurde der SNL-Vorkultur entnommen und ggf. mit einem Ultra-Turrax Stab zerkleinert.

### 4.4.4 Schüttelkultur mit Sauerstoffbestimmung

Der Sauerstoffverbrauch während einer Schüttelkultur wurde in drei unabhängigen Versuchen mit *F. velutipes* untersucht. Die Kulturen wurden analog zu 4.4.3 angesetzt. Als Kolben dienten Schikane-freie 500 mL Einweg-Erlenmeyerkolben mit integriertem O<sub>2</sub>-Sensor (PreSens, Regensburg). Kalibrierung erfolgte nach Herstellerangaben. Kultiviert wurde mit einem *Shake Flask Reader* (PreSens, Regensburg) auf einem CERTOMAT® Tischtischschüttler (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) bei Raumtemperatur. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Glucosebestimmung entnommen.

Kulturen zur Sauerstoffbestimmung in Schüttelkultur wurden von Herrn Jörg Schmidt-Hager am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

#### 4.4.5 Screening

Zur Durchführung des *screenings* wurden hauptsächlich essbare Basidiomyceten ausgewählt (siehe Tabelle 4-1), welche Biokonversions- und Biotransformationspotential besitzen oder als Aromastoff-Bildner bereits in der Literatur bekannt sind.

Als Substrat wurde Rapspresskuchen (Teutoburger Ölmühle GmbH & Co. KG, Ibbenbüren, Deutschland) verwendet. Der Nebenstrom wurde vorbereitend gesiebt und lyophilisiert.

Die ausgewählten Basidiomyceten wurden in Submerskultur (150 rpm, 24 °C) auf SNL vorkultiviert (siehe Abschnitt 4.4.2). Aus dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur in Minimalmedium (siehe Abschnitt 4.2.2) unter Supplementierung (2 %) mit gefriergetrocknetem Nebenstrom angesetzt. Es wurden eine biologische (Organismus in Minimalmedium) und eine chemische Kontrolle (Nebenstrom in Minimalmedium) mitgeführt, die *de novo* vom Pilz gebildete oder genuin im Nebenstrom vorhandene Aromastoffe anzeigten.

Die Aromaproduktion wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet; Probenahme und olfaktorische Evaluierung aus dem Kulturüberstand erfolgte am vierten, zehnten (je 7 mL) und vierzehnten (50 mL) Tag der Kultivierung. Weiterhin wurden ausgewählte Kulturen bei einer Versuchswiederholung zum Zeitpunkt des maximal wahrgenommenen Geruchs, der anhand des vorangegangenen Experimentes abgeschätzt wurde, komplett geerntet. Die geruchsaktiven Substanzen wurden entsprechend für die GC-Analytik extrahiert und aufgearbeitet (siehe Abschnitt 4.5).

#### 4.4.6 Bioreaktor-Kultivierung

##### 4.4.6.1 Vorbereitung und Animpfen

Bei parallelem Betrieb mehrerer Systeme wurde das Medium aller Bioreaktoren in einem Ansatz hergestellt und anschließend aufgeteilt. Die Bioreaktoren wurden mit 4,5 L Medium gefüllt, 0,1 mL Antischaummittel je Liter Endvolumen zugegeben und autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar). Anschließend kühlten die Bioreaktoren über Nacht ab, um Kontaminationen beim Aufbau auszuschließen. Ggf. erfolgte die Zugabe temperatursensitiver Medienbestandteile über Sterilfilter.

Vorkulturen (10% des Endvolumens, siehe Abschnitt 4.4.2) wurden bei paralleler Kulturführung vermischt, homogenisiert und auf Animpf-Flaschen verteilt. In diesen wurde ggf. Medium vorgelegt, um das Überführen viskoser Kulturen in den Bioreaktor zu erleichtern. Das Inokulieren erfolgte über Luer-Lock Schlauchverbinder.

*Flammulina velutipes* wurde zur Peptidase-Induktion in SNL mit Hanfextrakt (siehe Abschnitt 4.2.4) kultiviert, *Hirneola auricula-judae* in einem induzierenden Medium (siehe Abschnitt 4.2.5). Die Produktion von Aromen erfolgte analog zum *screening* (siehe Abschnitt 4.4.5). Alle anderen Kulturen wurden in SNL durchgeführt.

#### 4.4.6.2 Betrieb

Beide Geräte arbeiteten bei 24 °C mit 0,5 – 5,0 L Luft min<sup>-1</sup>. Aus praktischen Gründen wurde, soweit nicht anders angegeben, eine Belüftungsrate von 2,5 L Luft min<sup>-1</sup> gewählt. Der Rührkessel-Bioreaktor wurde mit 120 U min<sup>-1</sup> betrieben. Beim Festbett-Bioreaktor wurde die Pumpleistung je nach Versuch variiert (0,5 – 2 L min<sup>-1</sup>). Standard war 1 L min<sup>-1</sup>. In regelmäßigen Abständen wurden 10 – 25 mL Probe entnommen und aliquotiert.

Bei den Abluft-Probenahmen wurden die flüchtigen Komponenten der Abluft auf einem Adsorbens gebunden. Hierfür wurden 30 NL Abluft mittels eines Gasprobennehmers (Desaga GS 312) über ein Tenaxrohr (Gerstel) gepumpt, welches sich bei ähnlichen Anwendungen bewährt hat (Täffner *et al.* (2011)). Das Tenaxrohr diente der Analytik mittels Thermodesorption-Gaschromatographie (TDS-GC/FID, siehe Abschnitt 4.5.2).

#### 4.4.6.3 Verwendete Bioreaktoren

Für vergleichende Experimente wurden folgende Bioreaktoren eingesetzt:

Rührkessel-Bioreaktor (RK): ISF-100 (Infors HT, Bottmingen, Schweiz)  
5 L Kulturvolumen, Propellerrührer, ohne Leitrohr

Festbett-Bioreaktor (FB): medorex e.K. (Nörten-Hardenberg, Deutschland)  
5 L Kulturvolumen, 1 L Festbett

Daneben fanden folgende Rührkessel-Bioreaktoren Verwendung:

medorex e.K. (Nörten-Hardenberg, Deutschland):

5 L Kulturvolumen, Propellerrührer, mit Leitrohr

medorex e.K. (Nörten-Hardenberg, Deutschland):

2,5 L Kulturvolumen, Propellerrührer, ohne Leitrohr

Abluft-Kühlung und Temperierung erfolgte mit folgenden Thermostat-Kombinationen von Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach):

Kältethermostat F10 mit Wärmethermostat VL

Kältethermostat F12 mit Wärmethermostat ED

#### 4.4.6.4 Sonden

Gerät	Typ	Hersteller
DO-Elektrode	OxyProbe	Broadley-James Corp. (Irvine, USA)
DO-Elektrode	TruDO	Finesse (San Jose, USA)
DO Sensor spot	OXY-4 mini	PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg)
pH-Elektrode	FermProbe	Broadley-James Corp. (Irvine, USA)
pH-Elektrode	TrupH EFP	Finesse (San Jose, USA)

#### 4.4.7 Verwendete Organismen

**Tabelle 4-1:** Verwendete Basidiomyceten-Arten im *screening* (vgl. 4.4.5). DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande; E: essbar; H: Heilpilz; U: ungenießbar; n.b.: nicht bekannt.

Organismus	Trivialname	Herkunft	Stamm-Nr.	Einteilung
<i>Agaricus arvensis</i>	Weißer Anis Champignon	DSMZ	8327	E
<i>Agrocybe aegerita</i>	Südlicher Ackerling	<sup>1)</sup>		E
<i>Armillaria mellea</i>	Hallimasch	CBS	100.12	E (nach Erhitzen)
<i>Auriporia aurea</i>		CBS	294.71	n.b.

<i>Bjerkandera adusta</i>	Angebrannter Rauchporling	DSMZ	3375	U, H
<i>Flammulina velutipes</i> <sup>2)</sup>	Samtfußröbling, Enokitake	DSMZ	1658	E
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Fichtenporling	DSMZ	4957	U (zäh)
<i>Fomitopsis rosea</i> <sup>2,3)</sup>	Rosenroter Baumschwamm	CBS	313.36	n.b.
<i>Gloeophyllum odoratum</i> <sup>2)</sup>	Fenchelporling	CBS	444.61	U
<i>Grifola frondosa</i> <sup>2)</sup>	Maitake, Klapperschwamm	CBS	480.63	E, H
<i>Hericiium erinaceus</i> <sup>2)</sup>	Igel-Stachelbart	CBS	260.74	E, H
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Schwarzgebänderter Harzporling	CBS	311.29	U (zäh)
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	Stockschwämmchen	DSMZ	1684	E
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Schwefelporling	DSMZ	11211	E
<i>Lentinula edodes</i>	Shiitake	CBS	225.51	E, H
<i>Marasmius cohortalis</i>		DSMZ	8257	n.b.
<i>Marasmius scorodonius</i>	Echter Knoblauch-Schwindling	CBS	850.87	E, Würzpilz
<i>Nidula niveo-tomentosa</i>		CBS	380.80	n.b.
<i>Paecilomyces farinosus</i> <sup>2)4)6)</sup>		CBS	481.73	n.b.
<i>Phlebia radiata</i>	Orangefarbener Kammpilz	DSMZ	5111	U
<i>Pleurotus eryngii</i>	Kräuterseitling	CBS	613.91	E
<i>Pleurotus floridanus</i> <sup>2)</sup>		1)		E
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Austernseitling	DSMZ	1020	E, H
<i>Pleurotus pulmonarius</i> <sup>2)</sup>		DSMZ	5331	E
<i>Pleurotus sapidus</i> <sup>2)</sup>		DSMZ	8266	E
<i>Polyporus betulinus</i> <sup>2)</sup>	Birkenporling	5)		E (bitter)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> <sup>2)</sup>	Zinnobertramete	CBS	353.63	n.b.
<i>Trametes suaveolens</i>	Anis- / Wohlriechende Tramete	DSMZ	5237	U (zäh)



<i>Tyromyces floriformis</i>	Rosetten-Saftporling	CBS	232.53	U
<i>Tyromyces sambuceus</i> <sup>2)</sup>	Weichporling	CBS	492.76	U
<i>Wolfiporia cocos</i> <sup>2)</sup>	Lu Fing, Indian bread	CBS	279.55	E, H
<i>Xerula radicata</i>	Grubiger Wurzelrübling	DSMZ	4830	E

1) Abteilung für Molekulare Holzbiotechnologie und technische Mykologie, Georg-August-Universität Göttingen

2) Art mittels ITS-Sequenzierung bestätigt

3) Vormalis *Nigroporus durus*

4) Vormalis *Phanerochaete chrysosporium*

5) Eigenisolat aus Niedersachsen

6) Ascomycet

**Tabelle 4-2:** Im Bioreaktor eingesetzte Arten. DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande; E: essbar; H: Heilpilz; n.b.: nicht bekannt.

Organismus	Trivialname	Herkunft	Stamm-Nr.	Einteilung
<i>Flammulina velutipes</i> <sup>1)</sup>	Samtfußrübling, Enokitake	DSMZ	1658	E
<i>Fomitopsis rosea</i> <sup>1) 2)</sup>	Rosenroter Baumschwamm	CBS	313.36	n.b.
<i>Ganoderma applanatum</i> <sup>1)</sup>	Flacher Lackporling	CBS	250.61	H
<i>Hirneola auricula-judae</i> <sup>1)</sup>	Judasohr, Mu-Err	DSMZ	11326	E
<i>Pleurotus pulmonarius</i> <sup>1)</sup>		DSMZ	5331	E

1) Art mittels ITS-Sequenzierung bestätigt

2) Vormalis *Nigroporus durus*

## 4.5 Gaschromatographie

### 4.5.1 Probenvorbereitung

Durch Zentrifugieren der Probe wurden Pellets und Nebenstrom abgetrennt. Zur Aroma-Aufklärung wurde der Kulturüberstand 3 x mit einer entsprechenden Menge Pentan/Diethylether (1:1,12; v/v) im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Alternativ wurde kontinuierliche Flüssig/Flüssig-

Extraktion eingesetzt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und mittels *Vigreux*-Kolonne bei 40 °C auf ca. 1 mL eingengt. Als externer Standard wurde Cyclopentanol (615 mg L<sup>-1</sup>) zugegeben. Interner Standard zur Ermittlung der Wiederfindung war Cyclohexanol (63,5 mg L<sup>-1</sup>).

Die Beprobung der Bioreaktoransätze für die AEVA wurde wie folgt durchgeführt: täglich wurden 20 mL Medium (Zentrifugat) mit 1 mL Tegosoft TC (synthetisches C8/C10-Triglycerid; Evonik) extrahiert. Ein Aliquot des Extraktes wurde mittels Thermodesorption-Gaschromatographie (TDS-GC/FID, siehe Abschnitt 4.5.2) analysiert. Im Anschluss wurden die einzelnen Ölextrakte zusammengefügt und einer Hochvakuumdestillation unterzogen (siehe Abschnitt 4.5.3). Das Destillat wurde ebenfalls gaschromatographisch untersucht.

#### 4.5.2 Instrumentelle Methodik

##### GC-FID:

<b>Gerät:</b>	TRACE 2000
<b>Säule:</b>	Varian CP Wax 52 CB (30 m/ 0,23 mm/ 0,25 µm) HP-Innowax (30 m/ 0,23 mm/ 0,25 µm)
<b>Detektor:</b>	Flammenionisationsdetektor (FID), 230 °C
<b>Trägergas:</b>	Wasserstoff, 2 mL min <sup>-1</sup>
<b>Injektion:</b>	<i>on column</i>
<b>Temperaturprogramm:</b>	40 °C / 3 min // 3 °C / min // 230 °C / 10 min

##### GC-O:

<b>Gerät:</b>	Agilent 7890A
<b>Säule:</b>	Varian CP Wax 52 CB (30 m/ 0,23 mm/ 0,25 µm)
<b>Detektor:</b>	Gerstel ODP 3 / FID
<b>Trägergas:</b>	Wasserstoff, 2 mL min <sup>-1</sup>
<b>Injektion:</b>	<i>on column</i>
<b>Temperaturprogramm:</b>	40 °C / 3 min // 3 °C / min // 230 °C / 10 min

### GC-FID/FPD:

<b>Gerät:</b>	Agilent 7890A
<b>Säule:</b>	Varian CP Wax 52 CB (30 m/ 0,23 mm/ 0,25 µm)
<b>Detektor:</b>	FPD / FID
<b>Trägergas:</b>	Wasserstoff, 2 mL min <sup>-1</sup>
<b>Injektion:</b>	<i>on column</i>
<b>Temperaturprogramm:</b>	40 °C / 3 min // 3 °C / min // 230 °C / 10 min

### GC-MS:

<b>GC:</b>	Fisons GC 8000
<b>Säule:</b>	J&W scientific DB-Wax (30 m/ 0,32 mm/ 0,25 µm)
<b>MS-System:</b>	Fisons Md800
<b>Ionisation:</b>	EI, 70 eV
<b>Trägergas:</b>	Helium
<b>Injektion:</b>	<i>on column</i>
<b>Temperaturprogramm:</b>	40 °C / 3 min // 3 °C / min // 230 °C / 20 min

### TDS-GC-FID:

<b>GC:</b>	Agilent 6890
<b>Säule:</b>	J&W Scientific DB-Wax (30 m/ 0,32 mm/ 0,25 µm)
<b>Injektion:</b>	TDS-System 2, KAS 4 (Gerstel, Mühlheim)
	TDS: 20 °C // 60 °C min <sup>-1</sup> // 150 °C / 2 min
	KAS: -10 °C // 12 °C min <sup>-1</sup> // 230 °C / 2 min
	<i>splitless</i>
<b>Detektor:</b>	FID, 250°C

**Trägergas:** Wasserstoff, 2 mL min<sup>-1</sup>  
**Temperaturprogramm:** 40 °C / 3 min // 3 °C min<sup>-1</sup> // 230 °C / 10 min

#### TDS-GC-MS:

**GC:** Agilent 6890  
**Säule:** J&W Scientific DB-Wax (30m/ 0,32 mm/ 0,25 µm)  
**Injektion:** TDS-System 2, KAS 4 (Gerstel, Mühlheim)  
TDS: 20 °C // 60 °C min<sup>-1</sup> // 150 °C / 2 min  
KAS: -10 °C // 12 °C min<sup>-1</sup> // 230 °C / 2 min  
*splitless*  
**MS-System:** QuASAR, (AMD, Harpstedt)  
**Ionisation:** EI, 70 eV  
**Trägergas:** Helium, 1 mL min<sup>-1</sup>  
**Temperaturprogramm:** 40 °C / 3 min // 3 °C min<sup>-1</sup> // 230 °C / 10 min

#### 4.5.3 Thin Layer High Vacuum Distillation (TLHVD)

Zur Rückgewinnung von extrahierten Aromakomponenten aus dem synthetischen Triglycerid Tegosoft CT (siehe Abschnitt 4.5.1) wurde dieses einer TLHVD unterzogen (Krings *et al.* (2003)). Das erhaltene Destillat wurde mit Pentan/Diethylether quantitativ aus den Kühlfallen gewaschen, anschließend mittels einer *Vigreux*-Kolonnen eingengt und gaschromatographisch analysiert.

#### 4.5.4 Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Die AEVA wurde mit dem Destillat der TLHVD (siehe Abschnitt 4.5.3) durchgeführt. Die Probe wurde so lange 1+1 (v/v) mit Pentan/Diethylether (1:1,12; v/v) verdünnt, bis kein Geruch mehr am GC-O nachgewiesen werden konnte (*on column*). Der FD-Faktor (*flavour dilution*) wurde bestimmt und gegen den Kovats-Index aufgetragen.

Arbeiten für die AEVA, GC-MS-Untersuchungen sowie Teile der TDS-GC-Analytik erfolgten durch Frau Silke Schimanski.

## 4.6 Flüssigchromatographie

### 4.6.1 Gel-Permeations-Chromatographie

Für die Proteinseparation wurde ein *Biologic Duoflow* System verwendet. Als mobile Phase diente 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6) bei einem Fluss von  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Als Säule wurde eine *Superdex 75 10/300 GL* (GE Healthcare) eingesetzt. Fraktionen wurden gesammelt und auf Aktivität (siehe Abschnitt 4.10.4) getestet. Für eine Kalibrierung wurde das *LMW Gel Filtration Calibration Kit* von Amersham Biosciences verwendet.

### 4.6.2 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Gerät:	Hewlet Packard Ti-Series 1050
Detektor:	Hewlet Packard Ti-Series 1050 280 nm, 263 nm, 325 nm
Säule:	Chromolith Performance RP-18e; 100-4,6 mm (Merck)
Injektionsvolumen:	20 $\mu\text{L}$
Flussrate:	1,5 $\text{mL min}^{-1}$

Die Bestimmung von Ferulasäure und 4-Vinylguajacol erfolgte mit folgendem Gradienten-Programm:

Zeit [min]	Wasser [%] (0,15 % Ameisensäure)	Acetonitril [%]
0.00	90	10
6.00	42	58
7.00	0	100
10.00	0	100
13.00	90	10
14.00	90	10

## 4.7 Glucose

Eine Dreifachbestimmung erfolgte gemäß den Herstellervorgaben am Glucose und Lactat Analysator (YSI 2300 STAT Plus).

## 4.8 Biotrockenmasse-Bestimmung

Vorbereitend wurden 50 mL Falcon *tubes* gewogen. 50 mL Probe wurden im Falcon *tube* abzentrifugiert, ggf. ein Aliquot des Mediums entnommen und der Rest des Zentrifugats verworfen. Das Myzel wurde drei Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz lyophilisiert.

## 4.9 Aufarbeitung von *Paecilomyces farinosus*

Für die Aufarbeitung von *P. farinosus* wurden 3 g Myzel unter Zugabe von 2 mL 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6) in einer *Precellys* 24 (bertin technologies) homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der enzymhaltige Überstand wurde separiert, das Pellet nochmals mit 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6) gewaschen. Waschlösung und Überstand wurden vereinigt, gründlich abzentrifugiert, filtriert und mit Zentrifugalkonzentratoren konzentriert. Das Konzentrat wurde für weitere Arbeitsschritte aliquotiert und eingefroren.

## 4.10 Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 4.10.1 Laccase- und Peroxidaseaktivität

Die Laccase-Aktivitätsbestimmung wurde analog zu Eggert *et al.* (1996) aus dem Kulturüberstand durchgeführt, indem die Bildung des Radikal-Kations von 0,5 mM 2,2'-Azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulfonat) (ABTS) bei 420 nm für 10 min aufgezeichnet wurde. Die Summenaktivität von Laccase und Peroxidase wurde bestimmt, indem 266 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben wurden. Die Bestimmung wurde bei 30 °C in 0.1 M Natriumtartrat-Puffer (pH 4,5) im Microtiter-Platten-Lesegerät durchgeführt. Aktivitäten wurden in *international units* (1 U = 1 µmol min<sup>-1</sup>) angegeben.

### 4.10.2 Peptidase-Aktivität

#### 4.10.2.1 Azocasein-Assay

Der Azocasein-Assay ist eine photometrische Endpunkt-Methode (Iversen *et al.* (1995)). 25 µL Zentrifugat der Probe wurde mit 200 µL Azocaseinlösung (2,5 %, in 0,1 M Kalium-phosphat-Puffer, pH 6) und 275 µL Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M, pH 6) 20 min bei 43 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL Trichloressigsäure wurde das Gemisch 10 min auf Eis aufbewahrt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 366 nm vermessen. Eine Einheit (aU) entspricht der Enzymaktivität, die eine Extinktions-Zunahme von 0,01 katalysiert.

#### 4.10.2.2 AAPF-Assay

Für diesen Assay wurde das synthetische Peptid N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-Nitroanilid (AAPF) als Substrat für Subtilisinpeptidasen eingesetzt. Die Messungen erfolgten in 96-Well Mikrotiterplatten mit einem Synergy 2™ Mikrotiterplattenlesegerät und der Software Gen5 (Bio Tek, Winooski, Vermont, USA).

Bei diesem Assay wurden 20 µL Enzymlösung mit 7,5 µL Substrat (2 mM in DMSO) und 122,5 µL Puffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7) versetzt und für 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Während dessen wurde die Zunahme der Extinktion durch die Freisetzung von *p*-Nitroanilin bei 405 nm gemessen und daraus die Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$  [mAbs·min<sup>-1</sup>] berechnet.

Anhand der Messung wurde die Peptidaseaktivität wie folgt berechnet:

$$E_A = v_{\max} \cdot \frac{V_{ges}}{\varepsilon \cdot V_{Enzym}}$$

$V_{ges}$ : Gesamtvolumen im Well [µL]

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient von *p*-Nitroanilin (5392,7 µL·µmol<sup>-1</sup> bei 150 µL Gesamtvolumen)

$V_{Enzym}$ : Volumen der Enzymprobe [mL]

Daraus ergibt sich, dass eine Unit peptidolytischer Aktivität der Enzymmenge entspricht, die notwendig ist um 1 µmol *p*-Nitroanilid pro Minute umzusetzen.

Die Bestimmung der Aktivität von Subtilisinpeptidasen erfolgte durch Frau Laura Petersen.

#### 4.10.3 $\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität

Der Assay zur Bestimmung der  $\beta$ -Carotin-abbauenden Aktivität (Ben Aziz *et al.* (1971)) wurde gemäß Zorn *et al.* (2003b) modifiziert und der Verwendung von Mikrotiterplatten angepasst. Kulturüberstand in 0,1 M Natriumtartrat-Puffer (pH 4,5) wurde mit 10 µL  $\beta$ -Carotin-Emulsion (0,5 mg mL<sup>-1</sup>  $\beta$ -Carotin, 50 mg mL<sup>-1</sup> Tween 80 in H<sub>2</sub>O) vermischt. Die zeitliche Abnahme der Absorption wurde bei 450 nm und 30 °C über 30 min gemessen und abzüglich des Leerwertes ohne Enzym angegeben. Eine Einheit (aU) entspricht der Absorptions-Abnahme (-mOD min<sup>-1</sup>), die 1 mL Probe in einer Minute katalysiert.

## **$\beta$ -Carotin-Lösung**

- 10 mg  $\beta$ -Carotin + 1 g Tween 80 mit 20 mL Dichlormethan in Rundkolben füllen
- Lösen mittels Schütteln/ Ultraschall
- Mit Alufolie umwickeln
- Bis zur Trockene abrotieren (40°C, 800 mbar)
- In 30 mL Wasser aufnehmen, ggf. bei 200 mbar restliches Lösungsmittel entfernen
- Mit Wasser in Messkolben auf 50 mL auffüllen
- Durch 0,45  $\mu$ m Spritzenfilter (orange) in Kolben filtrieren
- Im Kühlschrank lagern, vor Licht schützen

### **4.10.4 Ferulasäuredecarboxylase**

Proben wurden mittels eines Schnelltests (Endpunktbestimmung) auf Ferulasäuredecarboxylase-Aktivität getestet. Hierfür diente folgender Ansatz:

99  $\mu$ L 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 6)

50  $\mu$ L Probe

1  $\mu$ L 250 mM Ferulasäure (in EtOH)

Es wurde max. 16 h bei 26°C und 500 U min<sup>-1</sup> im Thermomixer inkubiert. Aktivität konnte olfaktorisch oder mittels HPLC (siehe Abschnitt 4.6.2) bestimmt werden.

### **4.10.5 Esterase-Aktivität**

Die Bestimmung der Esterase-Aktivität erfolgte durch die Aufnahme der Kinetik des Abbaus von 1,25 mM Butansäure-p-nitrophenylester (pNPB) in 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7, enthält 0,1 % Triton X-100 und 50 mM NaCl) bei 37 °C und 410 nm über 20 min im Microtiter-Platten Reader. Aktivitäten wurden in international units (1 U = 1  $\mu$ mol min<sup>-1</sup>) angegeben.

## **4.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

### **Durchführung**

Genutzt wurden das Mini Twin System (Biometra) oder das Miniprotean TetraCell System (BioRad). Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Ladepuffer gemischt. Bei denaturierender SDS-



PAGE folgte für 10 min ein Erhitzungsschritt bei 95 °C und anschließendes Abkühlen auf 4 °C. Bei semi-nativer SDS-PAGE wurde Ladepuffer ohne DTT verwendet; es folgte dann kein Erhitzungsschritt. Durch das im Laufpuffer enthaltene SDS ist diese Elektrophorese dennoch nicht vollständig nativ und wird daher als semi-nativ bezeichnet.

Die Gele wurden im Kammersystem installiert und dieses mit 1x Laufpuffer blasenfrei gefüllt. Je nach Taschengröße und Konzentration der Probe wurden 10 – 20  $\mu$  L in eine Geltasche geladen. Vom Protein-Standard-Marker (Biorad) wurden 5  $\mu$  L verwendet.

Die Elektrophorese wurde bei 20 mA pro Gel durchgeführt. Bei semi-nativer Durchführung erfolgte die Elektrophorese bei 4 °C und mit 10 mA pro Gel. Nachdem das Bromphenolblau des Ladepuffers aus dem Gel eluierte, wurde die Elektrophorese beendet. Die Gele wurden von den Glasplatten gelöst und gefärbt.

#### **SDS-PAGE Laufpuffer 10x**

Tris base	30,2 g
Glycin	144,2 g
SDS	10,0 g
VE-Wasser	ad 1 L

Der Puffer wurde 1:10 verdünnt und eingesetzt.

#### **SDS-PAGE 2x Single Gel Puffer**

Tris Base (76 mM)	9,21 g
Serin (100 mM)	10,51 g
Glycin (100 mM)	7,51 g
Asparagin (100 mM)	15,01 g
VE-Wasser	ad 0,5 L

Der Puffer wurde auf pH 7,4 eingestellt und mit einem 0,22  $\mu$  m Filter sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Eventuell auftretende Kristallisation wurde vor Verwendung durch kurzzeitiges Erhitzen in der Mikrowelle beseitigt.

### **SDS-PAGE Ladepuffer**

1,5 M Tris/HCl-Puffer pH 6,8	2 mL
1 M DTT-Stocklösung	4 mL
40 % Glycerin/8 % SDS/ Bromphenolblau (50 mg L <sup>-1</sup> )	10 mL
VE-Wasser	ad 20 mL

Der Puffer wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Herstellung nativen Puffers erfolgte ohne Zugabe der DTT-Lösung.

### **APS-Lösung**

Ammoniumperoxodisulfat 400 mg mL<sup>-1</sup>

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **Single-Gele 12 %**

dest. H <sub>2</sub> O	1,4 mL
2 × Puffer	3,5 mL
AA/BAA 37,5 : 1	2,1 mL
APS-Lsg.	7,5 $\mu$ L
TEMED	3,5 $\mu$ L

#### **4.11.1 Coomassie-Färbung**

##### **Durchführung**

Vor der Färbung wurde das Gel dreimal mit je 20 mL VE-Wasser gewaschen, um störendes SDS zu entfernen. Dazu wurden das Gel samt Wasser jeweils 30 s in der Mikrowelle (600 W) erhitzt und anschließend 5 min leicht geschwenkt. Danach wurde das Gel mit CBB-Lösung (Coomassie-Brillant-Blau) bedeckt, für 10 s in der Mikrowelle erhitzt und zur Färbung mindestens 10 min

leicht geschwenkt. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel bei Bedarf mit warmem VE-Wasser gewaschen.

### **CBB-Lösung**

Coomassie Brilliant Blue G-250	60 – 80 mg
VE-Wasser	ad 1 L

2 – 3 h rühren bei Raumtemperatur mit anschließender Zugabe von ca. 3 mL HCl. Die Aufbewahrung der Färbelösung erfolgte im Dunkeln.

### **4.11.2 Zymographie**

Diese Methode diente zur Visualisierung peptidolytischer Aktivität in nativen Polyacrylamidgelen und erfolgte nach Rosenberg (2001) und Yim *et al.* (2002). In ein SDS-Gel wurden 0,33 g gelöste Gelatine je 1 mL Gel einpolymerisiert. Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese erfolgte wie in 4.11 beschrieben.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einer Renaturierungslösung (2,5 % Triton X-100) gewaschen, danach in Phosphatpuffer (0,1 M, pH6) für 1 bis 24 Stunden inkubiert und schließlich mit CBB (4.11.1) gefärbt. Banden heben sich als farblose Bereiche vom Hintergrund ab, da nur intakte Gelatine gefärbt wird. Dementsprechend werden durch diese Negativfärbung ausschließlich gelatineabbauende Peptidasen visualisiert.

### **4.12 Isoelektrische Fokussierung**

Die Trennung erfolgte mittels Gelen von Serva (Servalyt precotes 3-10 und 4-6) mit 2000 V, 6 mA und 12 W. Je 10 µl Probe wurden in Silikontaschen aufgetragen. Die Zuordnung der isoelektrischen Punkte basierte auf einer Standardproteinmischung von Serva (pI 3,5-10,7). Zur Identifizierung des Enzyms wurde das Gel in Streifen geschnitten und diese auf Aktivität getestet (siehe Abschnitt 4.10.4).

## 4.13 Entsorgungshinweise

### **Biologisches Material**

Pilzkulturen und Nährlösungen wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 40 min, 2 bar) sterilisiert. Das sterilisierte Nährmedium und feste Bestandteile wurden als Laborabfall entsorgt.

### **Lösungsmittel und Chemikalien**

Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

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

Trichloressigsäurehaltige und silberhaltige Abfälle wurden getrennt gesammelt. Die gesammelten Lösungsmittel wurden ebenso wie andere Sonderabfälle (schwermetallhaltig o. ä.) der Zentralen Betriebseinheit Entsorgung der Leibniz Universität Hannover zugeführt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Um eine Basis für spätere Anwendungen im Bioreaktor zu schaffen, wurden grundlegende Verfahren auf die Kultur von Basidiomyceten adaptiert und damit praktikablere Möglichkeiten zur Bestimmung von Zellwachstum und Gelöstsauerstoffkonzentration geschaffen. Dies ermöglichte ein besseres Verständnis der vergleichenden Kultur in einem Festbett- und einem Rührkessel-Bioreaktor. Hierbei wurde neben vier ausgewählten Enzymproduzenten eine aromabildende Art untersucht, die zuvor in einem *screening* selektiert wurde.

### 5.1 Grundlegende Versuche

Etablierte Standardverfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen lassen sich aufgrund der Morphologie von Basidiomyceten nur beschränkt übertragen (siehe Abschnitt 2.2). Während die Kultur in Schüttelkolben weitestgehend ohne Prozessanalytik auskommt, sind Einsatz und Vergleich von Bioreaktoren ohne Kenntnis grundlegender Parameter nicht zweckmäßig. Daher wurde mit der Bestimmung des Glucoseabbaus eine alternative Methode zur Bestimmung der Biomassebildung auf Basidiomyceten übertragen. Diese Methode wurde auch für die Untersuchung des Einflusses der Vorkultur auf die Reproduzierbarkeit von Kulturansätzen verwendet. Da die Bestimmung des Glucoseabbaus in Schüttelkolben und Bioreaktoren ein teilweise lineares Wachstum ergab, bestand die Möglichkeit einer Stoffwechsellimitierung. Um eine Mangelversorgung mit Sauerstoff zu demonstrieren, wurde mit der optischen Sensortechnologie ein neuartiges, widerstandsfähigeres Verfahren zur Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die Kultur von Basidiomyceten übertragen.

#### 5.1.1 Abschätzung der Biomasse einer Kultur

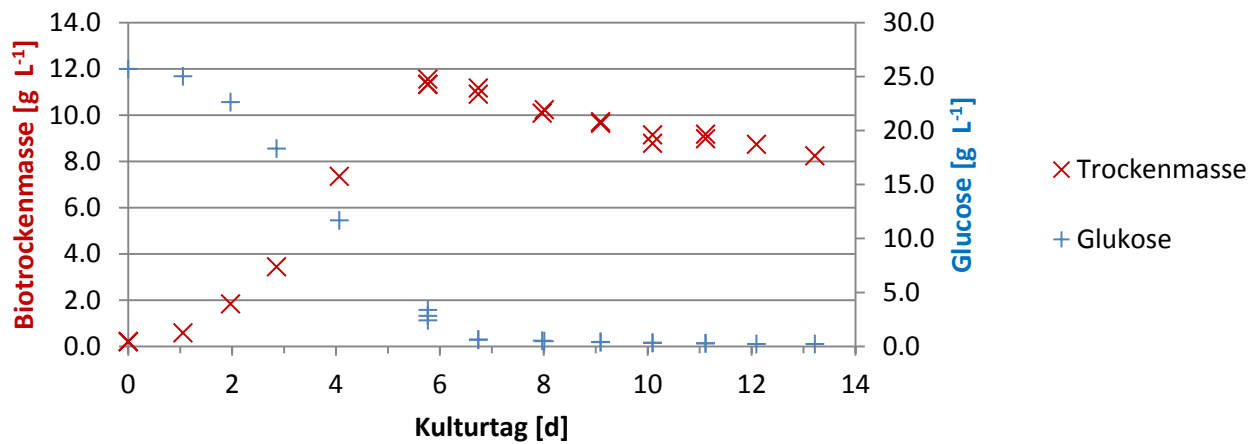
Die direkte Bestimmung der gebildeten Biomasse mittels optischer Dichte (OD), wie sie mit den meisten Mikroorganismen Standard ist, kann mit pelletbildenden Organismen aufgrund der inhomogenen Verteilung nicht durchgeführt werden. Gleiches gilt für den Einsatz gängiger Zählverfahren. Die Bestimmung des Nass- oder Trockengewichts der Zellen ist nur mit ausreichend großem Probenvolumen und bei homogener Probennahme möglich. Letzteres wird nicht nur durch das pelletöse Wachstum, sondern vor allem durch den häufigen Bewuchs von ohnehin eng ausgelegten Probeentnahme-Armaturen in einigen Bioreaktoren erschwert. Die Zellrückhaltung im Festbett-Bioreaktor schließt nicht nur die direkte Biomassebestimmung, sondern den Einsatz von *online*-Bestimmungsmethoden, wie Sonden zur Ermittlung des

kapazitiven Widerstands, aus. Die Ermittlung der Wachstumskinetik erfordert jedoch die Kenntnis der Biomassekonzentration. Bei Festphasen-Kulturen haben sich indirekte Methoden wie die Bestimmung von Glucosamin, Ergosterol, RNA, DNA oder Protein bewährt (Rodriguez-Leon *et al.* (2008)). Für das Quantifizieren von Zellkomponenten sind allerdings biomassehaltige Proben erforderlich – diese können dem Festbett-Bioreaktor nicht während des Betriebs entnommen werden.

Da der Verbrauch von Nährstoffen mit der Biomassebildung korreliert, kann die Konzentrationsabnahme von Substrat als Kenngröße für die Biomassezunahme verwendet werden. Glucose, die Hauptkohlenstoffquelle des SNL-Mediums, ist einfach enzymatisch bestimmbar und besonders für zeitnahe *ex situ*-Überwachung geeignet. Zahlreiche Arbeitsfelder bedienen sich der Glucosebestimmung als prozessbegleitende Methode. Um sicherzustellen, dass das Verfahren mit Basidiomyceten einsetzbar ist, wurde die Korrelation des Glucoseabbaus mit der Biotrockenmasse untersucht. Die Experimente wurden in Schüttelkolben durchgeführt. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurden innerhalb einer Versuchsreihe alle Kolben aus der gleichen homogenisierten Vorkultur angeimpft. Für jeden Messpunkt wurde mindestens eine eigene Kultur verwendet. Wie in Abbildung 5-1 erkennbar ist, steigt die Biotrockenmasse bis Kulturtag sechs an, um anschließend langsam abzunehmen. Letzteres kann als stationäre Phase gedeutet werden, bei der der Organismus von gespeicherten Nährstoffen lebt. Möglich ist auch, dass abgestorbene Zellen nicht vollständig lysieren und daher bei der Biotrockenmassebestimmung miterfasst werden. Mit Verbrauch der Glucose können makroskopische Veränderungen wie ein Zerfall der Pellets in der Kultur wahrgenommen werden. Erkennbar ist in Abbildung 5-1 auch, dass eine Glucosekonzentration am siebten Kulturtag ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) nicht für eine Biomassezunahme ausreicht. Tag sechs ( $2,9 \text{ g L}^{-1}$  Glucose) könnte ebenfalls außerhalb der exponentiellen Wachstumsphase liegen. Diese Vermutung müsste jedoch durch mehr Messpunkte validiert werden. Des Weiteren wird aus dem Versuchsverlauf deutlich, dass aus einer Vorkultur angesetzte Kulturen einem einheitlichen Kulturverlauf folgen und untereinander vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der betrachteten Parameter liefern.

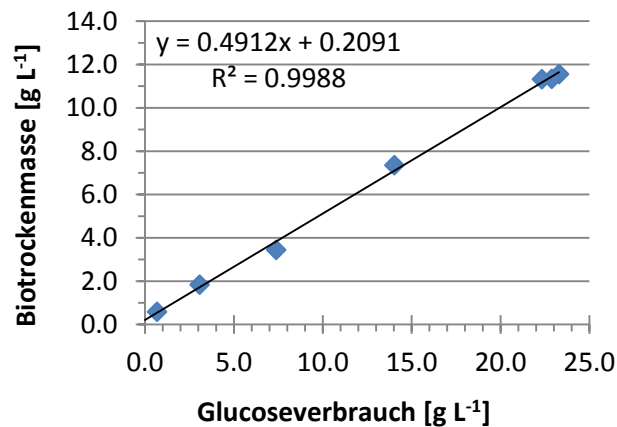
Die Wachstumsrate sank ab dem zweiten Kulturtag von  $0,05 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,01 \text{ h}^{-1}$  ab. Damit ist sie mit der Wachstumsgeschwindigkeit von humanen Melanoma-Zellen ( $0,03 \text{ h}^{-1}$ ) vergleichbar

(Sonnleitner *et al.* (2005)). Das Absinken der Wachstumsrate könnte auf eine Limitierung hindeuten (siehe Abschnitt 5.1.3).



**Abbildung 5-1:** Biotrockenmasse und Glucosekonzentration parallel geführter Schüttelkulturen (*F. velutipes* in 50 mL SNL)

Die Entwicklung von Glucoseverbrauch und Biotrockenmasse (Abbildung 5-2) ergab bei allen durchgeführten Versuchsreihen eine lineare Korrelation. Diese wird durch die abnehmende Wachstumsgeschwindigkeit bei niedriger Glucosekonzentration im Medium (Monod-Kinetik) nicht wesentlich beeinflusst. Die Steigung der Geraden entspricht dem Anteil an Glucose, der in Biotrockenmasse umgewandelt wird (Ausbeutekoeffizient).



**Abbildung 5-2:** Korrelation von Biotrockenmassezunahme und Glucoseverbrauch (*F. velutipes* in 50 mL SNL)

Die Korrelation zwischen Biomassebildung und Glucoseabbau wurde in drei unabhängigen Versuchen bestätigt. Die Ausbeutekoeffizienten (Tabelle 5-1) der beiden ersten Versuche, 0,49 bzw. 0,48, sind vergleichbar. Die Biomasse des Inokulums, die methodenbedingt variiert (siehe Abschnitt 2.2.4 und 4.4.3), hat darauf erwartungsgemäß keinen Einfluss. Literaturwerte für den Ausbeutekoeffizient von *Saccaromyces cerevisiae* betragen unter aeroben Bedingungen 0,56 – 0,8 (Hass *et al.* (2011)). Der Ausbeutekoeffizient des dritten Versuchs fällt mit 0,35 allerdings deutlich geringer aus (Tabelle 5-1) – er liegt 29 % unter dem höchsten gemessenen Wert. Dieser Versuch erfolgte zwar mit dem gleichen Stamm unter den gleichen Bedingungen, aber fast zwei Jahre vor den anderen. Mögliche zellbasierte Gründe solcher Varianzen finden sich in Abschnitt 2.2.2. Denkbar ist auch ein Einfluss des Nährmediums, da das verwendete Komplexmedium Hefeextrakt enthält. Chargenabhängige Qualitätsunterschiede sowie ein Herstellerwechsel können sich z. B. auf den Vitamingehalt auswirken und daher physiologische Folgen haben.

Eine Varianz des Ausbeutekoeffizienten bedeutet, dass bei unabhängigen Kulturen unterschiedliche Biomasseausbeuten erreicht werden. Die Streuung der Biomasse in den Inokula (Tabelle 5-1) kann eine unterschiedlich lange *lag*-Phase oder uneinheitliche Ausgangsbedingungen für das exponentielle Wachstum zur Folge haben. All dies kann trotz einheitlichen Kulturbedingungen die Produktausbeute beeinflussen.

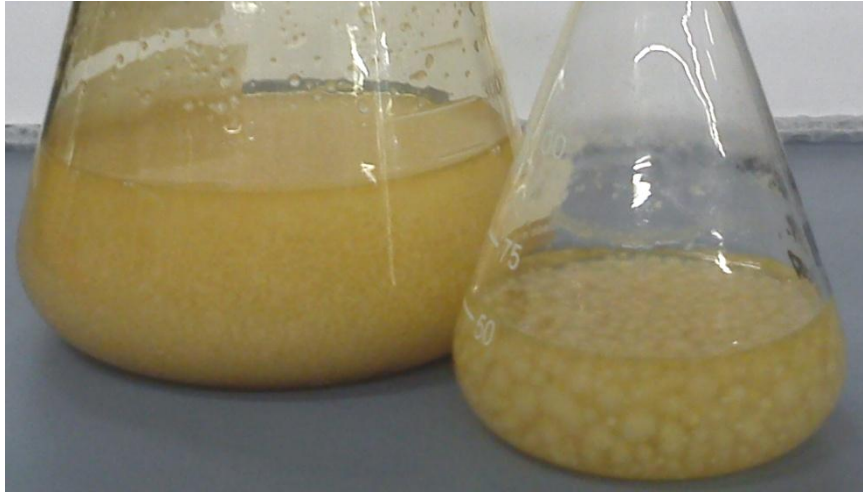
**Tabelle 5-1:** Ausbeutekoeffizient und Biomasse des Inokulums bei drei unabhängigen Versuchen mit *F. velutipes* in 50 mL SNL

Nr.	Ausbeutekoeffizient für Biotrockenmasse aus Glucose	Biotrockenmasse des Inokulums
1	0,49	210 mg L <sup>-1</sup>
2	0,48	518 mg L <sup>-1</sup>
3	0,35	790 mg L <sup>-1</sup>

Da die Korrelation von Glucoseverbrauch und Biomassebildung ohnehin stamm-, medien- und verfahrensspezifisch ist, können die gezeigten Daten nicht zur Berechnung der gebildeten Biomasse in Bioreaktoren verwendet werden. So führt beispielsweise der Einsatz verschiedener Schüttelradien zu unterschiedlichen Pelletgrößen und damit zu einer variierenden Morphologie (Abbildung 5-3). Ungeachtet dieser Einflüsse kann der Glucoseverbrauch als Marker für den Kulturverlauf verwendet werden. Da der Glucosegehalt der verwendeten Medien variiert und



aufgrund der Restglucose des Inokulums auch bei gleicher Kulturweise geringfügigen Schwankungen unterliegt, wird die Glucosekonzentration im Folgenden in Prozent der Startkonzentration angegeben.



**Abbildung 5-3:** Der Einsatz von unterschiedlichen Radien der Schüttler führt bei parallel geführten Kulturen von *F. velutipes* zu unterschiedlich großen Pellets (Auslenkung links 50 mm, rechts 25 mm).

### 5.1.2 Animpfen der Kulturen

Das Inokulum bildet den Ausgangspunkt für eine schnelle und reproduzierbare Zellkultur. Basidiomycetenkulturen werden meist von einer Agarplatte angeimpft (siehe Abschnitt 2.2.4). Das Verfahren birgt Schwierigkeiten für die quantitative Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, denen mit sorgfältiger Vereinheitlichung aller Arbeitsschritte begegnet wird. Diese Vorsichtsmaßnahme reicht allerdings nicht immer aus: Abbildung 5-4 zeigt zwei von derselben Agarplatte parallel angesetzte Vorkulturen mit unterschiedlicher Zelldichte. Diese ist bereits makroskopisch erkennbar. Es liegt daher auf der Hand, als Grundlage für vergleichbare Experimente zunächst den Einfluss der Vorkultur zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum unterschiedlich angeimpfter Kulturen verfolgt.

Als Marker für das Zellwachstum eignet sich die Abnahme der Glucosekonzentration, wie in Abschnitt 5.1.1 gezeigt wurde. Diese wurde für die folgenden Versuche anstelle einer Biomassebestimmung verwendet. Der Einsatz einer doppelten Menge an Inokulum hat erwartungsgemäß einen schnelleren Abbau der Glucose zur Folge. Während der linearen Wachstumsphase ist der durchschnittliche Glucoseverbrauch der doppelt inokulierten Kultur mit 3,9 g etwa 19% höher als der der nach herkömmlicher Methodik angeimpften Kultur (3,3 g). Da

am ersten Kulturtag die Glucosekonzentration der doppelt inokulierten Kultur bereits gesunken ist, die der Vergleichskultur jedoch nicht, könnte die höhere Zelldichte zusätzlich zu einer verkürzten *lag*-Phase geführt haben.

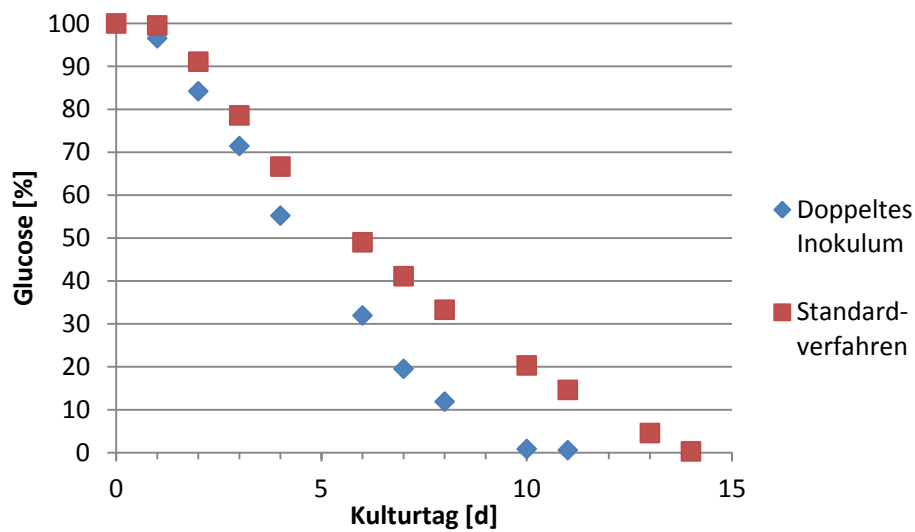


**Abbildung 5-4:** Unterschiedliche Biomassebildung in zwei identisch angesetzten Vorkulturen (*F. velutipes* in 250 mL SNL nach 5 Kulturtagen)

Die Glucose wurde in der doppelt inokulierten Kultur nach zehn Kulturtagen verbraucht, in der Vergleichskultur nach 14 Tagen (Abbildung 5-5). Damit hat die eingesetzte Menge an Inokulum beziehungsweise die Zahl der darin enthaltenen vitalen Zellen einen erheblichen Einfluss auf die Kulturdauer. Die gewählten Bedingungen dieses Vergleiches mögen extrem wirken. Zieht man jedoch in Betracht, dass eine Vorkultur, sofern sie, wie es standardmäßig durchgeführt wird, ausschließlich nach Kulturdauer geführt wird, extremen Schwankungen unterliegt (vgl. Abbildung 5-4), so ist der Vergleich durchaus realistisch. Das subjektive Einschätzen der Dichte einer Vorkultur, wie es manchmal praktiziert wird, kann die Auswirkung der variierenden Wachstumsgeschwindigkeit in Vorkulturen vermindern, nicht aber nivellieren.

Da die Bestimmung der OD keine Aussagekraft hat und die Biotrockenmassebestimmung diversere Nachteile aufweist (siehe Abschnitt 2.2.4), besteht Bedarf an einer alternativen Methode, mit der die Biomassebildung beziehungsweise der Biomassegehalt und das Kulturstadium von Vorkulturen detektierbar sind. Als solche kommt analog zur Hauptkultur die Bestimmung des Glucoseabbaus in Vorkulturen in Frage. Davon ausgehend, dass die Biomasse des Inokulums vernachlässigt werden kann, ist eine Korrelation zwischen der gebildeten Biomasse in der Vorkultur und dem Glucoseverbrauch anzunehmen (vergleiche Abschnitt 5.1.1). Beim Animpfen von Hauptkulturen aus Vorkulturen, die eine definierte Menge der Kohlenstoffquelle verbraucht haben, könnte daher eine annähernd reproduzierbare Zellmasse überführt werden.

Außerdem würde ein solches Verfahren sicherstellen, dass vor Erreichen der stationären Phase inokuliert wird. Dies ist mit der bisherigen Methodik nicht gewährleistet.

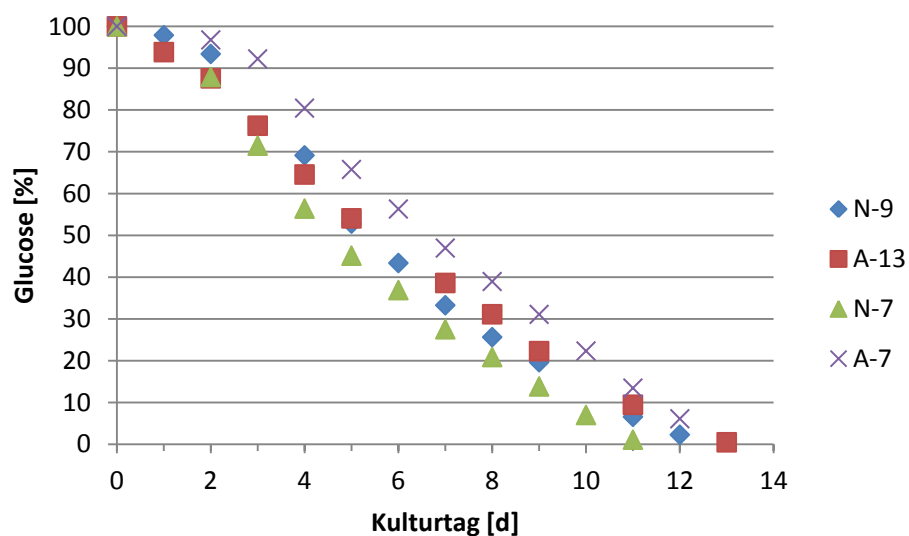


**Abbildung 5-5:** Vergleich des Glucosegehalts parallel geführter *F. velutipes* Kulturen in 100 mL SNL mit unterschiedlicher Menge an Vorkultur

Um diesen Ansatz auf seine Zweckmäßigkeit zu testen, wurden zwei Vorkulturen angesetzt. Für eine wurde eine frische Kulturplatte verwendet (N), für die andere eine ältere (A). Auf diese Weise entstand unterschiedliches Wachstum in beiden Vorkulturen. Aus beiden Vorkulturen wurden je zwei Hauptkulturen angeimpft: eine gemäß der herkömmlichen Methode nach sieben Vorkulturtagen und eine, nachdem  $\frac{2}{3}$  der Glucose abgebaut war. Der Glucoseabbau dieser vier Kulturen ist in Abbildung 5-6 dargestellt. Die am siebten Vorkulturtag angeimpfte Kultur auf Basis der frischen Kulturplatte (N-7) verbrauchte die Glucose deutlich schneller als die ebenfalls an Tag sieben angeimpfte Kultur auf Basis der älteren Kulturplatte (A-7). Die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit war visuell erkennbar. Die beiden Kulturen, für deren Inokulationszeitpunkt die Glucosekonzentration als Richtwert diente, zeigten einen vergleichbaren Glucoseabbau (N-9 und A-13). Die Methode könnte somit dazu geeignet sein, die Variation von unabhängigen Kulturen zu verringern.

Morphologische und physiologische Varianzen sowie der Einfluss des Homogenisierens werden mit diesem Verfahren vernachlässigt. Beides könnte die Pelletgröße und damit Wachstum und Produktbildung beeinflussen (siehe Abschnitt 2.2.4) und daher die vergleichsweise geringe

Abweichung des Glucoseabbaus von N-9 und A-13 begründen (Abbildung 5-6). Die Leistungsfähigkeit der Methode durch diese Vereinfachung begrenzt. Ergänzend kann die Morphologie durch automatische Bildanalyse untersucht werden (Rühl *et al.* (2009)). Da eine minutiöse Kulturplanung jedoch einfacher realisierbar ist, könnte diese intensiviert und mit dem vorgeschlagenen Verfahren verglichen bzw. kombiniert werden. Der Nutzen des beschriebenen Verfahrens müsste in größer angelegten Versuchen belegt werden. Sollte sich die Methode dabei bewähren, so würde sie einen Beitrag zum Erzielen von reproduzierbareren Ergebnissen mit bisher schwer handhabbaren Organismen leisten.



**Abbildung 5-6:** Glucoseverbrauch von zu unterschiedlichen Zeitpunkten angeimpften *F. velutipes* Kulturen in 100 mL SNL. N: Vorkultur aus frischer Kulturplatte, A: Vorkultur aus älterer Kulturplatte, Zahl: Alter der Vorkultur in Tagen.

### 5.1.3 Sauerstoffversorgung der Kulturen

Der Einfluss der Sauerstoffversorgung auf Basidiomycetenkulturen wurde bisher vernachlässigt (Fazenda *et al.* (2010)). Dies liegt zum einen an der schwer realisierbaren Bestimmung. Myzel kann sich an die Sonde heften (Abbildung 5-7) und dadurch Messwerte verfälschen. Zum anderen wurde angenommen, dass das verhältnismäßig langsame Wachstum dieser Organismen eine geringe zelluläre Sauerstoffaufnahme zur Folge hat. Sauerstoff ist in wässriger Lösung schlecht löslich: bei 24 °C wird in Wasser die Sättigung mit 8,3 mg L<sup>-1</sup>



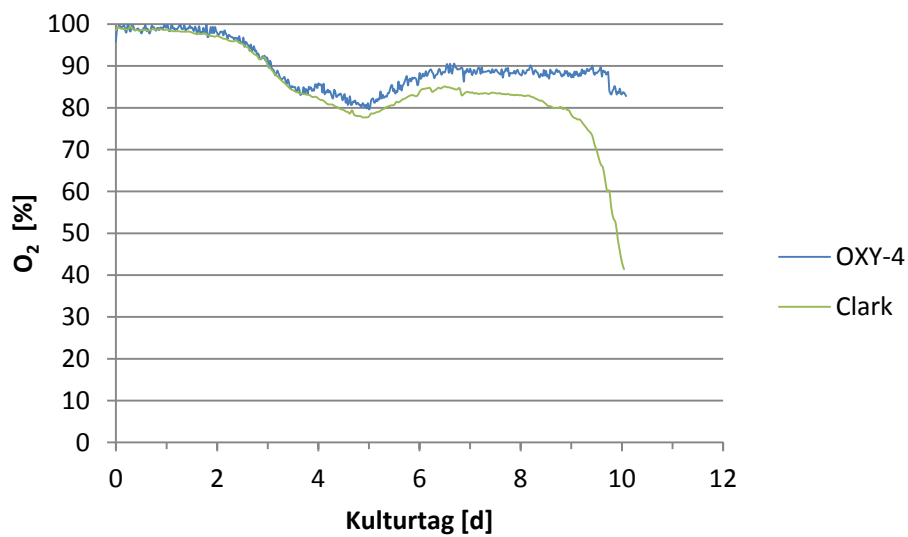
**Abbildung 5-7:** Mit Myzel bewachsene Sauerstoffelektrode

O<sub>2</sub> erreicht (nach Weiss (1970)). Dieser Wert wird durch gelöste Medienbestandteile verringert. Eine aktive Kultur verbraucht diese Menge binnen kurzer Zeit. Dieser Verbrauch muss durch eine ausreichend effektive Begasung ausgeglichen werden. Bei Kultursystemen, die auf scherkraftempfindliche Zellen angepasst wurden, sind der volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient ( $k_{La}$ -Wert) und die Sauerstofftransportrate (OTR) jedoch aus verfahrenstechnischen Gründen niedrig. Dass die Belüftung der Kultur von adhärenen Basidiomyceten über einen Ringbegaser anstelle der sonst üblichen Fritte erfolgen muss, verringert den Sauerstoffeintrag zusätzlich. Auch eine hohe Viskosität fortgeschrittener Kulturen, die auf einen hohen Anteil freier Hyphen sowie auf Exopolymere zurückzuführen ist, mindert den Wirkungsgrad der Begasung. Dem relativ geringen Sauerstoffverbrauch einer Basidiomycetenkultur steht demnach eine geringe OTR entgegen – eine Sauerstofflimitierung ist somit nicht auszuschließen.

Der mögliche Bewuchs von Clark-Sauerstoffelektroden (Abbildung 5-7) ist vom verwendeten Stamm und der Strömung des Mediums abhängig. Heften sich Zellen an die Membran, so breiten sich diese langsam aus und senken dadurch den gemessenen Sauerstoffgehalt proportional zur Membranbedeckung. Der gemessene Konzentrationsrückgang führt bei automatisierter Begasung zu einer Gegenregelung am Bioreaktor (Steigern der Begasungsrate und der Drehzahl), die die Wachstumsbedingungen vorzeitig ändert und dem Myzel schaden kann. Da der Bewuchs der Sonde durch das trübe Medium nicht sichtbar ist, wird der Ausfall der Sonde verspätet deutlich.

Optische Sensortechnologie erlaubt die Bestimmung der Gelöstsauerstoffkonzentration mittels einer planaren Sensorfolie, die auf die innere Oberfläche des Bioreaktors geklebt wird. Dadurch wird das Anheften von Zellen beschränkt. Das Messsignal wird durch die gläserne Reaktorwand mittels Lichtleitern ausgelesen. Ein möglicher Bewuchs der Sensorfolie kann auf diese Weise zeitnah erkannt werden. Im Vergleich mit einer herkömmlichen Clark-Elektrode wird deutlich, dass die Messwerte beider Sensoren während der drei anfänglichen Kulturstage vergleichbar sind (Abbildung 5-8). Die darauf folgende Abweichung ist ein Indiz für den beginnenden Bewuchs der Clark-Elektrode. Der Messwert der Elektrode nahm mit zunehmendem Bewuchs ab, wohingegen das optische System eine Sauerstoffkonzentration von fast 90 % ermittelte. Dieser Vergleich wurde im Festbett-Bioreaktor durchgeführt, da das zellfreie Medium gute

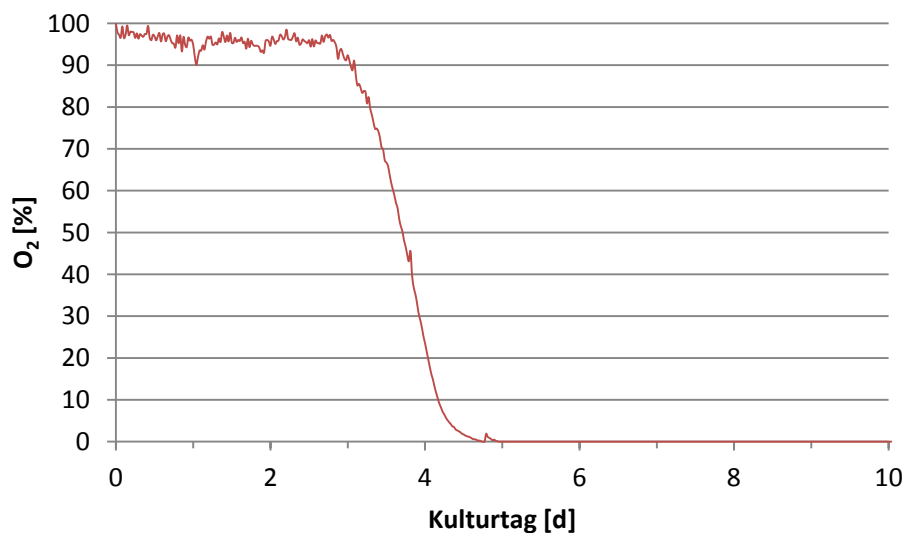
Sichtbedingungen auf die Sonden erlaubt und die geringe Strömung das Anheften von Zellen an Sonden begünstigt.



**Abbildung 5-8:** Vergleich der Bestimmung des Sauerstoffgehaltes mit einer Clark-Elektrode und einem optischen Sensor (Oxy-4, PreSens - Precision Sensing GmbH, Regensburg) in einer Kultur von *G. applanatum* im Festbett-Bioreaktor (SNL; Pumpgeschwindigkeit: 1 L min<sup>-1</sup>; Begasung: 0,5 vvm)

Im Festbett-Bioreaktor, bei dem Medium aus dem Konditionierungsgefäß durch den Zellträger gepumpt wird (siehe Abschnitt 2.3.3), hat ein Sauerstoffgehalt von fast 90 % im Konditionierungsbereich nicht zwangsläufig eine ausreichende Versorgung des Organismus zur Folge. Hierfür müsste der Sauerstoffgehalt des Mediums bestimmt werden, welches den Träger durchströmt hat, denn nur bei hinreichender Flussrate besteht eine gute Sauerstoffversorgung. Da eine direkte Bestimmung des Sauerstoffverbrauches in einem radial durchströmten Festbett nicht möglich ist, wurde in Vorversuchen mit *Flammulina velutipes* die Durchflussrate während einer Kultivierung erhöht. Bei einer Sauerstofflimitierung wäre durch die bessere Versorgung ein schnelleres Wachstum und damit ein schnellerer Glucoseabbau zu erwarten. Da der Glucoseabbau durch eine erhöhte Pumpleistung allerdings nicht gesteigert wurde, bestand unter den gewählten Kulturbedingungen eine hinreichend gute Sauerstoffversorgung im Festbett. Diese Methode trägt jedoch dem Sauerstoffbedarf mit zunehmender Zellzahl keine Rechnung. Auch der Effekt eines hohen Anteils an diffusiver Versorgung bleibt unberücksichtigt.

Im Rührkessel-Bioreaktor wurde die optische Sensortechnologie zur Sauerstoffmessung ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Im Gegensatz zu Clark-Sonden, die bei vorangegangenen Arbeiten regelmäßig ausfielen, waren die Sensorfolien auch über lange Kulturzeiträume einsetzbar. Versuche mit *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum* und *Hirneola auricula-judae* (Abbildung 5-9) ergaben ein starkes Absinken des Sauerstoffgehalts nach dem Einsetzen der Wachstumsphase. Die Erhöhung der Begasungsrate (in Abbildung 5-9: an Tag vier und fünf) ließ den Sauerstoffgehalt nur kurzzeitig ansteigen. Auch eine Begasungsrate von 1 vvm reichte nicht aus, um den Sauerstoffgehalt des Mediums zu erhöhen. Demzufolge lag eine Sauerstofflimitierung vor.



**Abbildung 5-9:** Sauerstoffgehalt des Mediums im Rührkessel-Bioreaktor (*G. applanatum*; SNL; 120 U min<sup>-1</sup>; Begasung: 0,1 vvm bis Tag vier; 0,5 vvm bis Tag fünf; danach 1 vvm)

Der  $k_{La}$ -Wert von 16 h<sup>-1</sup> verdeutlicht den geringen Sauerstoffeintrag des verwendeten Rührkessel-Bioreaktors. Er liegt damit im Bereich von Bioreaktoren für Säugerzellkulturen ( $k_{La}$ -Wert: 2-20 h<sup>-1</sup>) und deutlich unter dem von Bioreaktoren für bakterielle Kulturen ( $k_{La}$ -Werte bis 1600 h<sup>-1</sup>; Marjanovic (2007)). Die Verwendung eines Ringbegasers und die niedrige Drehzahl des Rührwerks führen zu großen Gasblasen mit geringer Verweilzeit, der Sauerstoffeintrag ist entsprechend gering. Da eine Erhöhung der Begasungsrate zu sichtbar größeren Luftblasen führte, ist der Effekt dieser Maßnahme gering. Eine hohe Begasungsrate bei geringer Rührerdrehzahl kann sogar einen Rückgang des Sauerstoffeintrags zur Folge haben

(Doran (1995); Hass *et al.* (2011)). Bei der Produktion flüchtiger Produkte ist außerdem eine niedrige Begasungsrate wünschenswert. Eine Erhöhung der Rührerdrehzahl war aufgrund der höheren mechanischen Belastung der Zellen nicht möglich. Prinzipiell würden ein höherer Innendruck des Bioreaktors, eine effizientere Art der Durchmischung (Dispersion, Rückvermischung), eine Belüftung mit feinerer Blasenbildung oder die Zufuhr von O<sub>2</sub> zu einer besseren Sauerstoffversorgung führen. Der vorhandene Bioreaktor ließ jedoch keine dieser Maßnahmen zu.

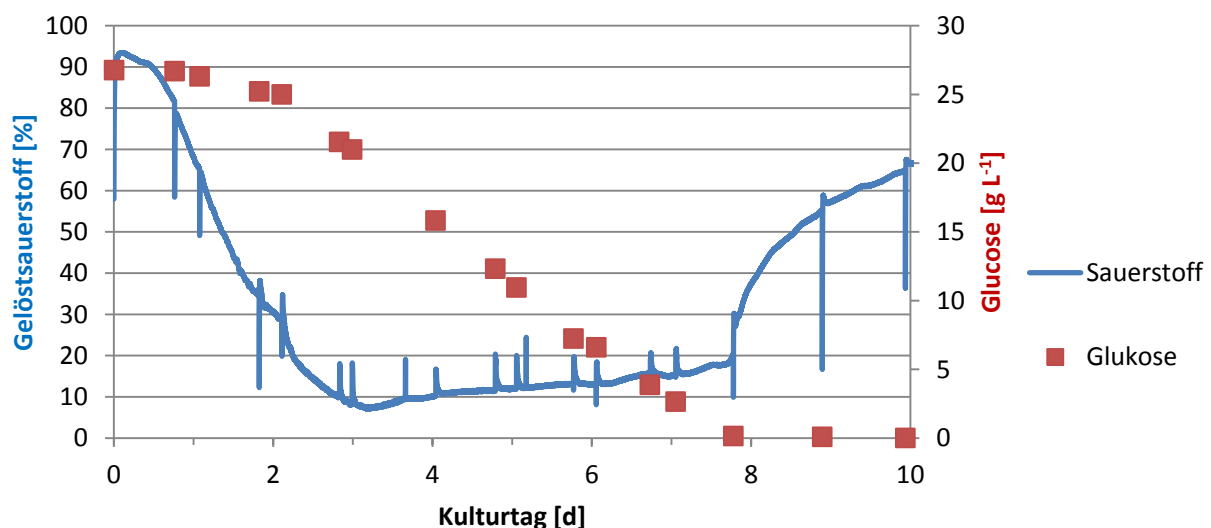
Untersuchungen von Henzler *et al.* (1991) ergaben für Schüttelkolben ohne Schikane in Abhängigkeit von Füllvolumen und Schüttelgeschwindigkeit einen  $k_{La}$ -Wert von mindestens 50 h<sup>-1</sup> (Auslenkung des Schüttlers: 5 cm) bzw. 35 h<sup>-1</sup> (Auslenkung: 2,5 cm). Das Verhältnis des Füllvolumens zum Kolbenvolumen betrug dabei nicht mehr als 0,4; bei der vorliegenden Arbeit jedoch 0,5. Bedenkt man außerdem, dass die hohe Viskosität vieler Basidiomycetenkulturen die Durchmischung verschlechtert und damit den Sauerstoffeintrag verringert, so scheint eine Sauerstofflimitierung auch in Schüttelkulturen mit Basidiomyceten möglich.

Drei unabhängig durchgeführte Kultivierungen von *F. velutipes* in Schüttelkultur mit optischer Sensortechnologie ergaben ein Absinken des Sauerstoffgehalts nach drei Kulturtagen auf 8-10 % (Abbildung 5-10). Diese Konzentration blieb über einige Tage stationär beziehungsweise stieg leicht an. Da in dieser Zeit die Glucose linear abgebaut wurde und Wachstum makroskopisch erkennbar war, ist für diese Phase lineares Wachstum anzunehmen. Weil keine Sauerstofflimitierung vorlag, könnte eine weitere Limitierung durch einen anderen Nährstoff wie beispielsweise Thiamin (siehe Abschnitt 2.2.3) bestanden haben. Zeitgleich mit dem Verbrauch der Glucose im Medium stieg die O<sub>2</sub>-Konzentration an Kulturtag acht stark an. Für eine regelmäßige Probenahme, die der Glucosebestimmung diente, wurde die Kultivierung kurzzeitig unterbrochen. Dies wirkte sich auf die gelöstsauerstoffkonzentration durch temporäre Schwankungen aus, wie in Abbildung 5-10 ersichtlich ist.

Eine Sauerstoffkonzentration von 10 % im Medium limitiert das Wachstum normalerweise nicht. Da andere Basidiomyceten schneller als *F. velutipes* wachsen und möglicherweise keiner anderweitigen Limitierung unterliegen, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in Schüttelkulturen eine Sauerstofflimitierung auftritt. Diese würde die Leistungsfähigkeit der



Schüttelkultur und die Maßstabsübertragung auf Bioreaktoren beeinträchtigen. Auch bei einer Medienoptimierung sollte dieser Aspekt berücksichtigt werden. Durch Variation des Füllvolumens der Kulturkolben könnte der Einfluss der Belüftung im Einzelfall untersucht werden. Ein besserer Sauerstoffeintrag wäre außerdem durch die Wahl eines Kolbens mit weitem Hals und gut gasdurchlässiger Stopfen sowie durch Steigerung von Drehzahl und Auslenkung des Schüttlers erreichbar. Schikanekolben bieten zwar einen wesentlich besseren Sauerstoffeintrag, schädigen durch die erhöhte Scherbelastung jedoch die Hyphen. Möglicherweise stellen hochfrequente Formen des Energieeintrags, wie sie z. B. der *Resonance Acoustic Mixer* (Applikon Biotechnology B. V., Schiedam, Niederlande) bietet, eine Alternative zu herkömmlichen Orbitalschüttlern dar. Der Hersteller beschreibt vor allem in viskosen Medien einen erhöhten Sauerstoffeintrag, auf den Scherkräfteintrag geht er jedoch nicht ein.



**Abbildung 5-10:** Gelöstsauerstoff und Glucosekonzentration im Medium einer Schüttelkultur mit *F. velutipes* in 250 mL SNL

Die Wahl einer zweckdienlichen Sauerstoffversorgung hängt nicht nur von Stamm und Produkt ab, sondern auch vom Kultursystem. Autoren, die mit Basidiomyceten in Bioreaktoren arbeiten, gehen unterschiedlich mit der offenbar problematischen Sauerstoffversorgung um. Einige arbeiten ohne Sauerstoffsonde oder nehmen einen Sauerstoffgehalt nahe 0 % in Kauf (z. B. Cui *et al.* (2006)). Andere halten eine untere Grenze von z. B. 10 % ein (Papaspyridi *et al.* (2011)). Anhand von Kulturen mit *Ganoderma lucidum* konnte gezeigt werden, dass ein geregelter Sauerstoffeintrag zu einer doppelten Biomasseausbeute führte (Fazenda *et al.* (2010)). Eine

ungeregelte Begasung und damit eine längere Phase der Sauerstofflimitierung führten hingegen zu einer zweifach erhöhten Exopolymerproduktion. Einen vergleichbaren Zusammenhang zeigten Rau *et al.* (1992) mit *Schizophyllum commune* und *Sclerotium glucanicum*. Exopolymer kann ein begehrtes Produkt darstellen, aber auch das *downstream processing* anderer Produkte stören. Fazenda *et al.* (2010) dokumentierten zudem einen Einfluss des Sauerstoffeintrags auf die Zellmorphologie und damit auf die rheologischen Eigenschaften der Kulturbrühe. Neben verfahrenstechnischen Ansätzen kann eine Fütterungsstrategie für die Regelung des Sauerstoffgehaltes im Medium geeignet sein (Bodizs *et al.* (2007)).

Maßnahmen zur Optimierung des Sauerstoffeintrags eines Kultursystems beeinflussen auch dessen CO<sub>2</sub>-Konzentration. Der CO<sub>2</sub>-Austrag kann daher neben dem O<sub>2</sub>-Eintrag die Produktivität und eine Maßstabsvergrößerung beeinflussen. CO<sub>2</sub> reguliert die Expression verschiedener Gene in Pilzen (Stretton *et al.* (1998)). Eine geringfügige Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes in Kulturhäusern kann das vegetative Wachstum einiger Pilzarten steigern und beeinflusst die Fruchtkörperbildung (Miles *et al.* (1997)). CO<sub>2</sub> stimuliert das Wachstum von *Gigaspora margarita* (BeCARD *et al.* (1989)). Die Substanz beeinflusst den Abbau von Lignocellulose durch *Phanerochaete chrysosporium* (Puniya *et al.* (1994)) und *Pleurotus sajor-caju* (Zadrazil *et al.* (1994)).

## 5.2 Vergleichende Kultivierung ausgewählter Enzym-Produzenten mittels

### Rührkessel- und Festbett-Bioreaktor

Als Alternative zu konventionellen Rührkessel-Bioreaktoren, die für die Kultur scherkraftempfindlicher Basidiomyceten nur begrenzt geeignet sind, wurde ein Festbett-Bioreaktor (siehe Abschnitt 2.3.3) getestet. Für einen Vergleich wurden ein 5 L Festbett-Bioreaktor und ein auf scherkraftminimiertes Arbeiten angepasster 5 L Rührkessel-Bioreaktor parallel angesetzt. Die Verwendung einer Vorkultur für beide Bioreaktoren stellte sicher, dass unterschiedliche Ergebnisse nicht auf die Vorkultur zurückzuführen sind (siehe Abschnitt 5.1.1). Für den Vergleich wurden mehrere Enzymproduzenten ausgewählt, die teils in früheren Arbeiten aufgrund ihrer scherkraftsensitiven Physiologie auffielen.

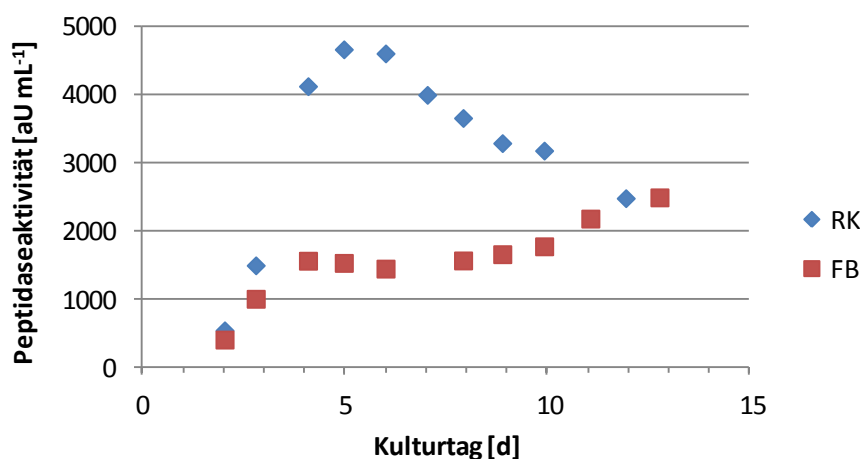
## 5.2.1 Produktion von Peptidasen mit *Flammulina velutipes*

### 5.2.1.1 Vergleichende Kultivierung in Rührkessel- und Festbett-Bioreaktor

Als Modellorganismus für den Vergleich der Bioreaktoren wurde zunächst der Speisepilz *F. velutipes* (Samtfußrübling, Enokitake) ausgewählt. Dieser Organismus zeigte bei früheren Arbeiten auf festen Substraten, wie z. B. Gluten, eine hohe Peptidaseaktivität (Grimrath *et al.* (2011)). Bei diesen Versuchen wurden in der Festphasenkultur deutlich höhere Aktivitäten erreicht als in supplementierten Schüttelkulturen. Daher könnte der Festbett-Bioreaktor, bei dem der Organismus gebunden auf einem Träger wächst, eine großvolumige Alternative zur Enzymproduktion bieten.

Weil Gluten Versuche in Bioreaktoren sowie das *downstream processing* erschwert, wurde in Vorversuchen ein alternativer Enzyminduktor gesucht. Da die Kultur auf Hanffasern ebenfalls zu hohen Peptidaseaktivitäten führte (Grimrath *et al.* (2011)), wurde wässriger Hanfextrakt als zweckdienliche Alternative gewählt. Dieser wurde daher als Grundlage für das SNL-Medium der Bioreaktorversuche eingesetzt.

Die Peptidaseaktivität wurde mit dem Azocasein-Assay bestimmt. Diese Methode ermöglicht die gleichzeitige Detektion aller Enzyme, welche Azocasein abbauen können. Peptidasen, die dieses Substrat nicht hydrolysieren, wurden nicht erfasst.



**Abbildung 5-11:** Peptidaseaktivität in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) mit *F. velutipes*. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in Hanf-SNL.

Bei allen Versuchen wurde im Rührkessel-Bioreaktor schneller das Aktivitätsmaximum erreicht (Tabelle 5-2). Ungefähr zwei Tage nach dem Maximum ließ die Peptidaseaktivität nach (Abbildung 5-11). Dass der Zeitpunkt des Aktivitätsrückgangs im Rührkessel mit dem Zeitpunkt des Verbrauchs der Glucose ungefähr zusammenfiel (Tabelle 5-3), spricht für einen Zusammenhang von Wachstum (Tropophase) und Enzyymbildung.

Im Gegensatz dazu stieg die Peptidaseaktivität im Festbett-Bioreaktor langsamer und erreichte im untersuchten Zeitraum kein Maximum, lag aber immer unter der Aktivität im Rührkessel. Im Festbett-Bioreaktor nahm die azocaseinabbauende Aktivität auch nach dem Abbau der Glucose weiter zu bzw. blieb konstant – ein Aktivitätsrückgang blieb aus. Es wäre daher möglich, dass die Zellyse, die im Rührkessel nach dem Glucoseverbrauch gut sichtbar einsetzte, mit der Abnahme der Enzymaktivität zusammenhing. Möglicherweise trug das Rührwerk zu einer Zerstörung von Zellen bei, wodurch diese nicht mehr produzierten oder proteolytische Enzyme freisetzen. Diese intrazellulären Peptidasen könnten zu einer beschleunigten Degradation des Produktes beitragen. Im Festbett-Bioreaktor waren hingegen weder Lyse noch Aktivitätsabnahme erkennbar. Diese Tatsache unterstreicht die scherkraftarmen Bedingungen im Festbett und physiologische Unterschiede, die aus den beiden Kultursystemen resultieren.

**Tabelle 5-2:** Maximale Peptidaseaktivitäten (Max. Akt.) der Bioreaktorvergleiche mit *F. velutipes* sowie der Tag der maximalen Aktivität und das Verhältnis der Aktivitäten in beiden Systemen zueinander

	Rührkessel-Bioreaktor		Festbett-Bioreaktor		Verhältnis der max. Aktivität im Festbett zu der im Rührkessel [%]
	Max. Akt. [aU mL <sup>-1</sup> ]	Kulturzeit [d]	Max. Akt. [aU mL <sup>-1</sup> ]	Kulturzeit [d]	
<b>1. Vergleich</b>	7085	6	4000	(am Ende der Kultur)	56,5
<b>2. Vergleich</b>	9240	4	5796	5, danach konstant	62,7
<b>3. Vergleich</b>	4670	5	2492	(am Ende der Kultur)	53,4

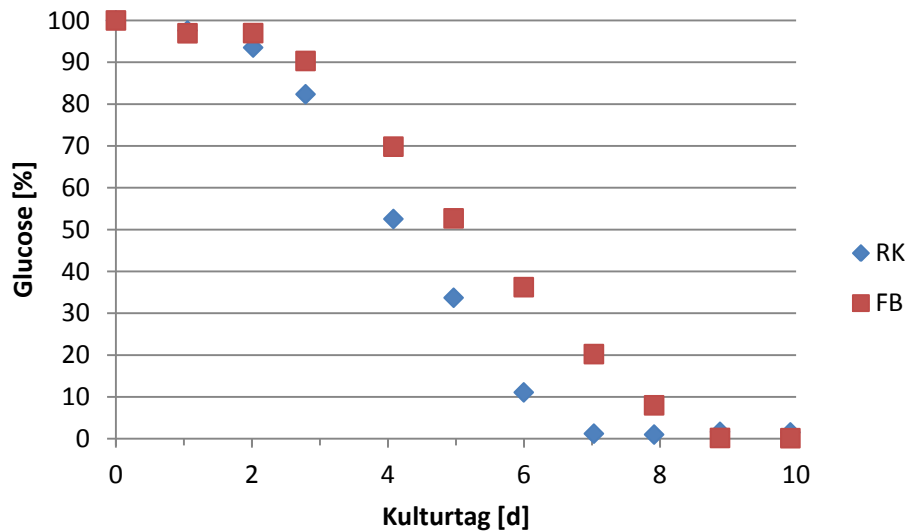
Die Varianz der Maximalwerte (Tabelle 5-2) der einzelnen Vergleiche zueinander könnte an unterschiedlichen Chargen der Hanffasern liegen, deren Extrakte zur Enzyminduktion eingesetzt

wurden. Als Naturprodukt unterliegen diese starken Schwankungen. Auch Vorkultur und Animpfen könnten eine Rolle spielen (siehe Abschnitte 2.2.3 und 5.1.2). Ungeachtet dieser Schwankungen war das Verhältnis zwischen der Enzymaktivität in beiden Kultursystemen bei allen Versuchen ähnlich (Tabelle 5-2). Die maximalen Aktivitäten waren im Rührkessel-Bioreaktor deutlich höher als im Festbett-Bioreaktor. Dies könnte mit dem Wachstumsverhalten in den unterschiedlichen Bioreaktortypen zusammenhängen. Die Hauptkohlenstoffquelle Glucose war im Rührkessel-Bioreaktor bei allen Versuchen nach sieben Tagen aufgebraucht (Tabelle 5-3). Da der Ausbeutekoeffizienten (Glucose/ Biomasse) variieren kann (siehe Abschnitt 5.1.1), könnte die unterschiedlichen Produktausbeute mit unterschiedlichen Zelldichten begründet werden.

**Tabelle 5-3:** Tag des vollständigen Glucoseverbrauchs

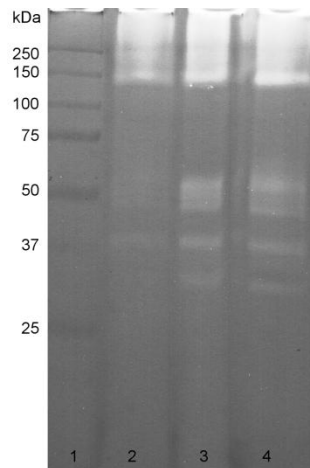
	<b>Festbett-Bioreaktor [d]</b>	<b>Rührkessel-Bioreaktor</b>
<b>1. Vergleich</b>	10	7
<b>2. Vergleich</b>	9	7
<b>3. Vergleich</b>	9	7

Im Rührkessel-Bioreaktor wurde im Vergleich zum Festbett-Bioreaktor in allen Versuchen die Glucose zwei bis drei Tage früher verstoffwechselt. Da der Glucoseabbau mit der Biomassebildung korrelierte (siehe Abschnitt 5.1.1), ist dies ein Indiz dafür, dass Biomasse im Festbett-Bioreaktor langsamer generiert wurde. Dies könnte auch mit einer längeren *lag*-Phase zusammenhängen, zumal der Glucoseabbau im Festbett-Bioreaktor später einsetzte (Abbildung 5-12). Da die Bioreaktoren aus Schüttelkulturen angeimpft wurden, könnte die Adaption des Organismus auf die Bedingungen im Festbett länger dauern als im Rührkessel-Bioreaktor.



**Abbildung 5-12:** Glucoseabbau in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) beim 3. Bioreaktorvergleich mit *F. velutipes*. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in Hanf-SNL.

Die geringere Steigung während des linearen Glucoseabbaus im Festbett-Bioreaktor ist ein Indiz für geringere Stoffwechselaktivität und langsames Wachstum. Da eine Änderung der Flussgeschwindigkeit des Mediums im Festbett nicht zu einem schnelleren Glucoseabbau führte (siehe Abschnitt 5.1.3), kann angenommen werden, dass das langsamere Wachstum nicht durch diesen Betriebsparameter zu begründen ist. Möglicherweise führt das räumlich begrenzte Wachstum oder ein höherer Anteil diffusiv versorgter Zellen zu diesem Ergebnis. Andere Detektionsmethoden stehen in einem radial durchströmten Festbett-Bioreaktor nicht zur Verfügung (siehe Abschnitt 2.3.3). Der lineare Glucoseabbau in beiden Kultursystemen spricht für eine Limitierung des Wachstums, die durch Sauerstoff- oder Vitaminmangel begründet sein könnte. Der Sauerstoffeintrag im Rührkessel-Bioreaktor ist für die Kultivierung von Basidiomyceten nicht immer ausreichend, kann jedoch aufgrund der Scherkräftsensitivität unter den gegebenen Bedingungen nicht verbessert werden (siehe Abschnitt 5.1.3).



**Abbildung 5-13:** Gelatinezymographie von *F. velutipes*-Überständen. Peptidasen sind als weiße Banden sichtbar. 1: Marker; 2: Festbett-Bioreaktor, Tag 5; 3: Festbett-Bioreaktor, Tag 12 (maximale Aktivität); 3: Rührkessel-Bioreaktor, verdünnt 1:2, Tag 5 (maximale Aktivität)

Da *F. velutipes* mehrere Peptidasen bildet (Shin *et al.* (1998); Park *et al.* (2007); Grimrath *et al.* (2011)), die zur azocaseinabbauenden Aktivität beitragen könnten, wurde mittels Gelatinezymographie untersucht, ob in beiden Kultursystemen die gleichen Peptidasen exprimiert wurden. Der Vergleich von Proben der Tage mit maximaler Enzymaktivität ergab dieselbe Anzahl an Enzymbanden (Abbildung 5-13). Auch die Intensität der Banden einzelner Enzyme war zwischen beiden Kultursystemen vergleichbar. Demnach wurde das Expressionsmuster der Peptidasen nicht durch die verwendeten Bioreaktoren beeinflusst.

Die maximale Peptidaseaktivität von  $9.240 \text{ aU mL}^{-1}$  wurde im Rührkessel-Bioreaktor erreicht und war im Vergleich zur Aktivität einer Festphasen-Kultur auf Gluten von über  $160.000 \text{ aU mL}^{-1}$  gering (Grimrath *et al.* (2011)). Die Festphasen-Kultur ist jedoch langwierig und ergibt nur wenige mL Produkt pro Ansatz, die aufgrund der Verunreinigung mit Glutenhydrolysat nur mit großem Verlust aufzureinigen sind. Wegen des hohen Ansatzvolumens stellt die Produktion im Rührkessel-Bioreaktor eine Alternative dar, um für Anwendungen im Labormaßstab ausreichende Peptidasmengen zu produzieren.

#### 5.2.1.2 Ansätze zur Ausbeuteerhöhung

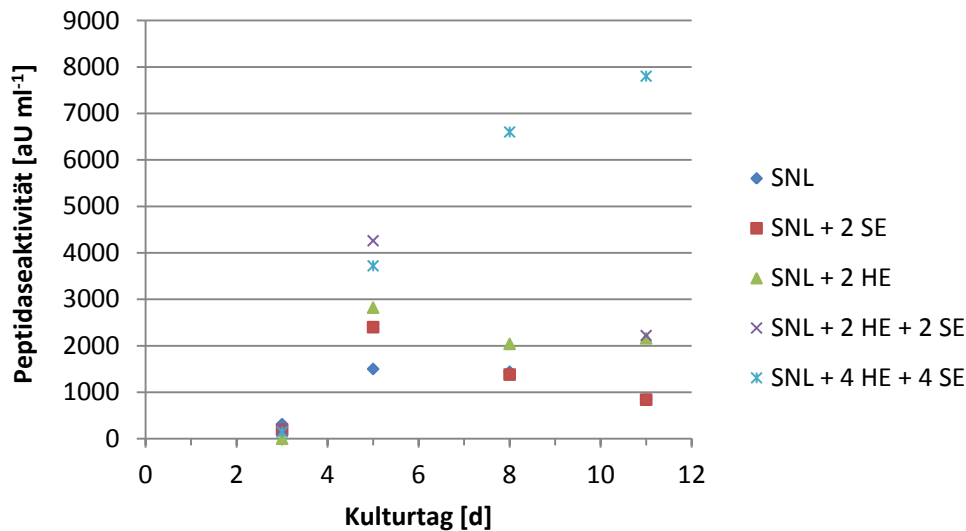
Um die Ausbeute der Rührkesselkultivierung zu steigern, wurde nach wirkungsvolleren Induktoren gesucht, die das *downstream processing* nicht erschweren. Getestet wurden in erster Linie Proteinquellen, da Gluten bisher am effizientesten war. Als Vergleich dienten

unterschiedliche Konzentrationen an Gluten sowie Hanfextrakt. Gelatine, Pepton, Caseinhydrolysat, BSA, gemahlene Hanffasern und Holzextrakt führten nicht zu ausreichend hoher azocaseinabbauender Aktivität. Milchpulver und eine erhöhte Konzentration des Medienbestandteils Hefeextrakt hingegen steigerten die Peptidasebildung im Vergleich zu Hanfextrakt und Gluten erheblich. Eine mögliche Expression unterschiedlicher Peptidasmuster konnte mittels Gelatine-Zymographie für keinen der Zusätze nachgewiesen werden.

Da Hefeextrakt ohnehin Bestandteil des SNL-Mediums ist ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) und folglich keine Bedenken hinsichtlich des *downstream processings* bestanden, wurde dieses für weitere Untersuchungen ausgewählt. In diesem Zusammenhang wurden zusätzlich weitere Bestandteile des SNL-Mediums auf eine mögliche aktivitätssteigernde Wirkung getestet. Asparagin zeigte keine Wirkung, hingegen erhöhte eine Dosierung der Spurenelementlösung die Peptidaseaktivität. Daher wurde die Spurenelementlösung in weitere Versuche mit einbezogen. Abbildung 5-14 zeigt, dass die Aktivitätssteigerung durch eine vermehrte Zugabe von Hefeextrakt höher ist als durch eine erhöhte Spurenelementkonzentration. Zusammen eingesetzt führen beide Additive zu einer weiteren Aktivitätssteigerung, die durch eine Konzentrationserhöhung maximiert werden kann. Zwischen der Zugabe der vierfachen Menge zum SNL und einer neunfachen Zugabe war allerdings nur noch ein minimaler Unterschied erkennbar (nicht abgebildet). Das eingesetzte Hefeextrakt von Merck war wirksamer als das von Invitrogen. Da Hefeextrakt ein komplexer Medienbestandteil ist und Herstellerangaben sehr weit gefasst sind, sind neben herstellerspezifischen Unterschieden auch chargenabhängige Schwankungen zu erwarten.

Weil die azocaseinabbauende Aktivität durch eine vermehrte Gabe von Hefeextrakt konzentrationsabhängig gesteigert werden konnte, könnte es sich anstelle einer Induktion der Enzyymbildung um eine Wachstumssteigerung des Organismus handeln. Eine höhere Wachstumsrate hätte eine vermehrte Zellzahl zur Folge, die in der Tropophase zu einer erhöhten Produktion primärer Metabolite führen würde. Dass mit den Daten eines Rührkesselversuchs ein Modell erstellt werden konnte, welches unter Berücksichtigung einer Sauerstofflimitierung einen Zusammenhang zwischen Wachstumsphase und Produktbildung nahelegte (nicht abgebildet), stützt diese Annahme. Die Untersuchung könnte mittels weiteren Experimenten im Bioreaktor, die auf die Erstellung eines Modells ausgelegt sind, vertieft werden.



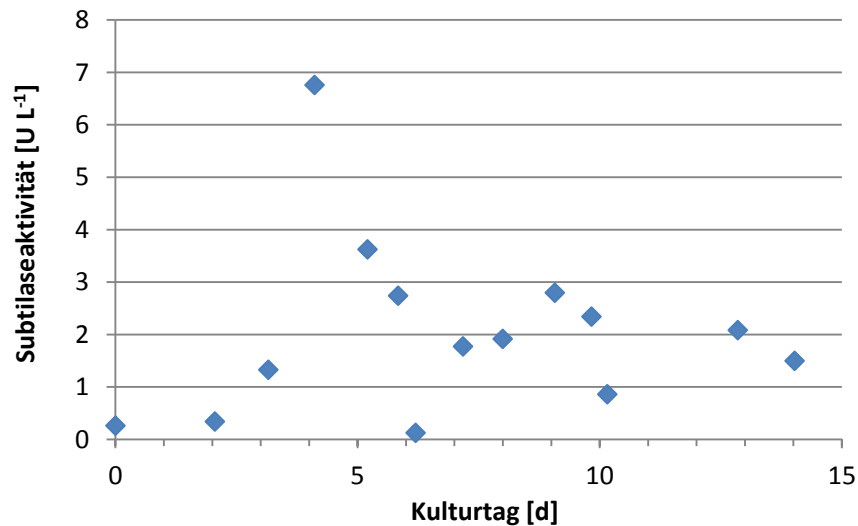


**Abbildung 5-14:** Vergleich der azocaseinabbauenden Aktivität von *F. velutipes* in SNL mit verschiedenen Zusätzen. Zugewetzt wurde die zwei- oder vierfache Menge an Hefeextrakt (HE) oder Spurenelementlösung (SE) der ursprünglichen Konzentration von SNL.

Eine Steigerung des Zellwachstums durch Hefeextrakt könnte beispielsweise durch den Gehalt an Vitaminen im Medienbestandteil erklärt werden. So wurde das ursprüngliche SNL-Medium nicht mit Hefeextrakt, sondern dem hitzelablen Vitamin Thiamin ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) hergestellt (Sprecher (1959)). Thiamin limitiert das Wachstum vieler Basidiomyceten (siehe S. 9) und ist Bestandteil von optimierten Medien für *F. velutipes* (Song *et al.* (1995); Du *et al.* (1997)). Der Einsatz von Hefeextrakt mit unbekannter Vitaminkonzentration sowie das Autoklavieren des vollständigen Mediums (inkl. Glucose) haben möglicherweise eine Vitaminlimitierung von *F. velutipes* zur Folge. Die Peptidaseproduktion könnte daher durch eine weitere Medienoptimierung, nach Möglichkeit mittels statistischer Versuchsplanung, gesteigert werden. Auch bereits veröffentlichte, auf Wachstum optimierte Medien könnten getestet werden.

Auf Basis des mit Hefeextrakt versetzten SNL-Mediums wurden weitere Bioreaktorversuche durchgeführt. Hierbei wurde getestet, ob durch die Ernte von 90% einer Kultur und dem Einsatz der verbliebenen 10% im Bioreaktor als Vorkultur für die Folgekultur eine Effizienzsteigerung erreichbar ist. Neben dem Zeitersparnis, das aus dem dauerhaften Betrieb des Kultursystems resultiert, wäre eine Anpassung des Organismus an die Kulturbedingungen möglich. Die Enzymaktivität wurde mit dem AAPF-Assay bestimmt und ist daher nicht mit den bisherigen Angaben in dieser Arbeit vergleichbar, die mittels Azocasein-Assay bestimmt wurden.

Bei dem Versuch wurde die Medienzusammensetzung aus praktischen Gründen geringfügig variiert (Petersen (2011)). Für die folgende Auslegung wird diese Modifikation als vernachlässigbar betrachtet.



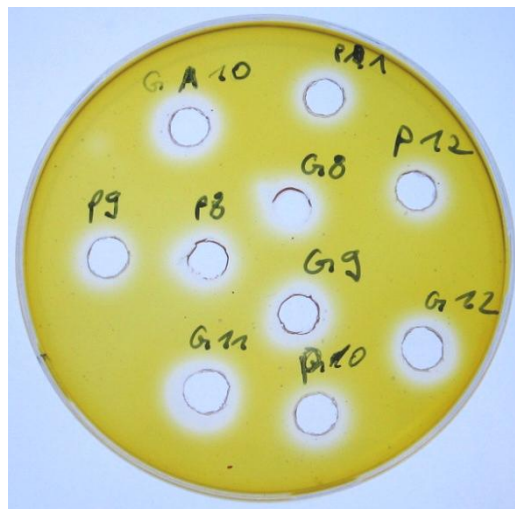
**Abbildung 5-15:** Kultur von *F. velutipes* unter Standardbedingungen im Rührkessel-Bioreaktor mit modifiziertem SNL (siehe S. 75). An Kulturtag 6 und 10 wurden 90 % des Mediums geerntet und der Bioreaktor mit frischem Medium gefüllt.

Die Subtilisinpeptidaseaktivität des ersten Kulturansatzes war an Tag vier mit  $6,7 \text{ U L}^{-1}$  maximal (Abbildung 5-15). Die Ernte von 90 % und erneute Befüllung des Bioreaktors mit Medium an den Kulturtagen sechs und zehn führte zwar zu einer erneuten Enzymproduktion. Die maximale Aktivität der zwei folgenden Ansätze betrug jedoch weniger als die Hälfte der ersten Kultur. Somit hat die gewählte Vorgehensweise einen Verlust an Produktivität zur Folge, der durch den Zeitgewinn nicht ausgeglichen werden kann. Möglicherweise führte die Verwendung von Myzel aus Bioreaktorkulturen zum Animpfen zu einer Adaption zu Ungunsten der Subtilisinpeptidasen.

### 5.2.2 Produktion eines $\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyms mit *Pleurotus pulmonarius*

Aufgrund ihrer  $\beta$ -Carotin-abbauenden Aktivität werden einige Basidiomyceten erforscht. Die oxidative Degradation von Carotinoiden kann neben der Entfärbung (Zorn *et al.* (2006)) auch der Produktion wirtschaftlich relevanten Aromen wie den  $\text{C}_{13}$ -Norisoprenoiden  $\beta$ -Damascenon und  $\beta$ -Ionon dienen (Winterhalter *et al.* (2002)). Der Lungenseitling (*P. pulmonarius*), ein Verwandter des als Speisepilz beliebten Austernseitlings, fiel im Rahmen eines *screenings* aufgrund

seiner Fähigkeit auf,  $\beta$ -Carotin ohne Zugabe von  $H_2O_2$  abzubauen (Karrasch (2009)). Da seine  $\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität nicht mit seiner Laccase-Aktivität korrelierte, konnte dieser Assay nicht zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden. Ein einzelnes Produkt, welches sich für einen Aktivitätsassay eignen könnte, wurde nicht identifiziert. Auch für Peroxidasen des echten Knoblauchschwindlings (*Marasmius scorodoni*) wurde beschrieben, dass sie ein breites Produktspektrum bilden (Zelena *et al.* (2009)). Sie stehen damit im Gegensatz zu hochselektiven, pflanzlichen Peroxidasen. Da ein quantitativer Nachweis des Edukts oder eines Produkts problematisch ist, wird für die Abschätzung der Enzymaktivität bei hohem Probenaufkommen gewöhnlich ein semiquantitativer Assay eingesetzt. Dieser basiert auf einem Agarboden, der mit  $\beta$ -Carotin-Emulsion versetzt wird. In diesen Agar werden Löcher gestochen und diese mit Proben gefüllt (Abbildung 5-16). Eine Abschätzung des Ausmaßes der Entfärbung nach 24 Stunden ermöglicht eine vergleichende Einordnung von Aktivitäten. Dieses Verfahren ermöglicht nur einen sehr groben Aktivitätsvergleich. Außerdem ist der pH-Wert, der sich auf die Enzymaktivität auswirkt, kaum kontrollierbar. Daher sollte für die vergleichende Bestimmung der  $\beta$ -Carotin-abbauenden Aktivität aus unterschiedlichen Kultursystemen eine alternative Methode entwickelt werden.



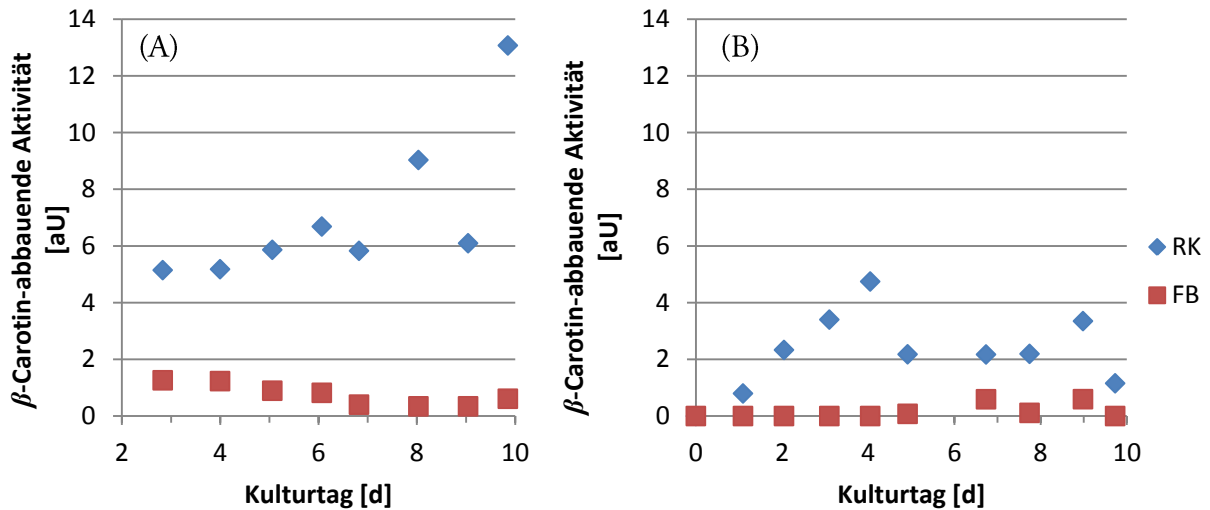
**Abbildung 5-16:** Beispiel einer  $\beta$ -Carotin-Agarplatte zur Bestimmung der  $\beta$ -Carotin-abbauenden Aktivität

Der zur quantitativen Bestimmung der  $\beta$ -Carotin-abbauenden Aktivität etablierte Assay basiert auf der Umsetzung einer  $\beta$ -Carotin-Emulsion als Substrat in Küvetten (Scheibner *et al.* (2008)). Der Durchsatz dieses Verfahrens ist durch die lange Aufnahmezeit der Abbaukinetik und die

Verwendung von Küvetten begrenzt. Erschwerend kommen ein enger linearer Bereich und die Verwendung der  $\beta$ -Carotin-Emulsion hinzu, deren Herstellung schlecht reproduzierbar ist. Da für die vorliegende Arbeit nur ein direkter Vergleich von Proben notwendig war, konnten diese Einschränkungen jedoch vernachlässigt werden.

Aus den oben genannten Gründen wurde zur Aktivitätsbestimmung eine  $\beta$ -Carotin-Emulsion als Substrat verwendet und der hierfür etablierte Assay auf Mikrotiterplatten übertragen. Das Verfahren ermöglichte im Vergleich zur Methode in Küvetten eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Proben einzelner Kulturtage, sofern diese gleichzeitig analysiert wurden. Nachteil dieses Assays ist die schlechte Reproduzierbarkeit durch die Streuung in der  $\beta$ -Carotin-Emulsion. Außerdem verhält sich die Methode wie ihr Pendant in Küvettenmaßstab in weiten Bereichen nichtlinear zur Enzymaktivität. Diese Einschränkung könnte durch Verdünnung bis zum Erhalt einer definierten Standardaktivität (innerhalb eines engen, linearen Bereiches) ausgeglichen werden, war aber für den im Rahmen dieser Arbeit erwünschten direkten Vergleich nicht erforderlich. Verglichen mit dem Assay auf  $\beta$ -Carotin-Agarplatten wurde ein wesentlich höherer Probendurchsatz und eine bessere Vergleichbarkeit erzielt. Die Verwendung von geeigneten Puffersystemen ermöglichte zudem die Bestimmung von Enzymaktivitäten aus Proben, welche bisher nicht detektierbar waren.

Die  $\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität im Festbett-Bioreaktor lag bei zwei unabhängigen Bioreaktor-Vergleichen deutlich unter der Enzymaktivität im Rührkessel (Abbildung 5-17, A und B). Beide Versuche unterschieden sich bezüglich der maximal erreichten Enzymaktivität und der Aktivitätsverläufe. So stieg in Versuch A die Aktivität im Rührkessel bis zum Kulturrende, wohingegen Versuch B zu Beginn ein Maximum erreichte. Die unterschiedlichen Aktivitätsverläufe der beiden Versuche könnten neben den genannten Einflüssen des Assays auch durch die Varianz der Vorkultur begründet werden (siehe Abschnitt 2.2.4). Aktivitätsschwankungen zwischen den Kulturtagen wurden durch vergleichende Messungen bestätigt.

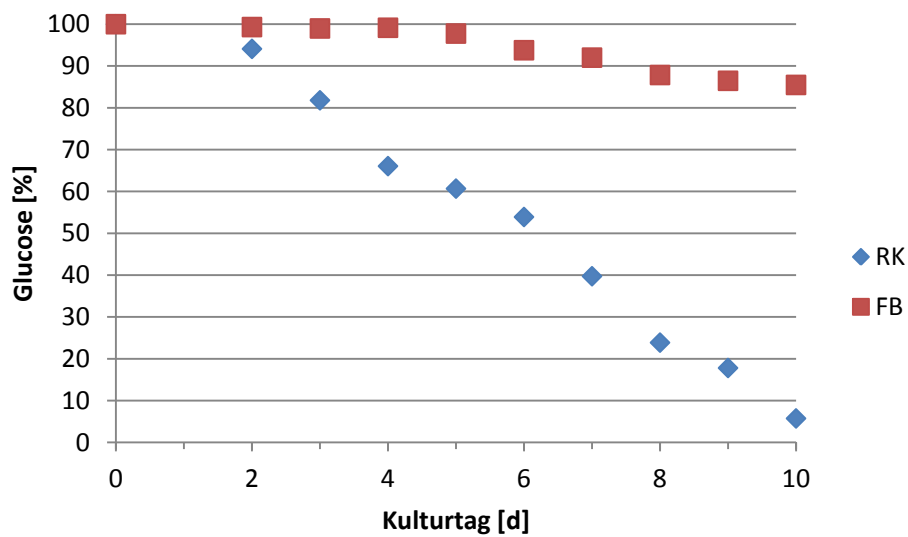


**Abbildung 5-17:**  $\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität von *P. pulmonarius* in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) zweier unabhängiger Bioreaktorvergleiche. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in SNL.

Der Glucoseabbau, der als Marker für die Biomassebildung dient (siehe Abschnitt 5.1.1), verlief in den verglichenen Kultursystemen unterschiedlich (Abbildung 5-18). Im Rührkessel-Bioreaktor nahm die Konzentration ab Kulturtag zwei linear ab und war an Tag zehn nahezu verbraucht. Damit ähnelt der Kulturverlauf im Rührkessel dem von *F. velutipes*, wenngleich die geringere Abbaurrate ein langsames Wachstum von *P. pulmonarius* indiziert. Im Festbett-Bioreaktor war dagegen erst ab Tag sechs eine Abnahme der Glucosekonzentration erkennbar. Die Abbaurrate lag mit max.  $1,2 \text{ g d}^{-1}$  deutlich unter der im Rührkessel-Bioreaktor (max.  $4,8 \text{ g d}^{-1}$ ).

Da der Abbau von Glucose im Festbett möglicherweise durch eine unzureichende Medienversorgung vermindert wurde, könnte die vergleichsweise geringe Abbaurrate an einer falsch eingestellten Schlauchpumpe oder einem verstopften Festbett gelegen haben. Beides wurde beim zweiten Ansatz ausgeschlossen. Trotzdem ist die Abnahme der Glucosekonzentration des zweiten Bioreaktorvergleichs mit *P. pulmonarius* mit den dargestellten Ergebnissen vergleichbar. Des Weiteren könnten durch unregelmäßigen Bewuchs des Trägermaterials im Festbett Kanäle entstanden sein, die die Strömung des Mediums um den Organismus herumführten. Die Folge wäre eine Mangelversorgung weiter Bereiche des Festbetts gewesen. Da mit *F. velutipes* keine vergleichbaren Beobachtungen gemacht wurden, könnte eine Kanalbildung durch eine andere

Morphologie des Myzels von *P. pulmonarius* begründbar sein. Mit dem vorhandenen Kultursystem ist die Verteilung bei der Besiedelung des Trägermaterials nicht messbar.



**Abbildung 5-18:** Glucoseabbau in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) beim ersten Bioreaktorvergleich mit *P. pulmonarius*. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in SNL.

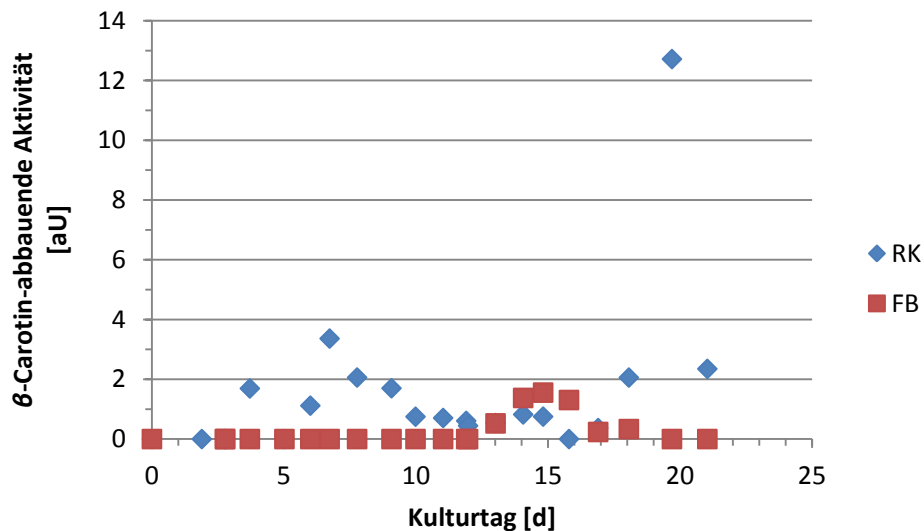
Die Kulturbedingungen des Festbett-Bioreaktors waren für die Kultur von *P. pulmonarius* im Vergleich zum Rührkessel-Bioreaktor weniger gut geeignet. Um den Betrieb und das Trägermaterial des Festbett-Bioreaktors auf den vorliegenden Organismus anzupassen, wären grundlegende Versuche in parallel geführten Kultursystemen notwendig. Hierfür wäre der Einsatz linearer Festbettsysteme empfehlenswert, da diese mehr analytische Möglichkeiten bieten und miniaturisierbar sind.

Die geringe Glucoseaufnahme und das daraus gefolgte langsamere Wachstum im Festbett-Bioreaktor könnten die geringere Enzymaktivität in diesem Kultursystem begründen. Darüber hinaus war kein Zusammenhang zwischen dem Glucoseverbrauch und der Produktbildung erkennbar.

### 5.2.3 $\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität und Esterasen aus *Ganoderma applanatum*

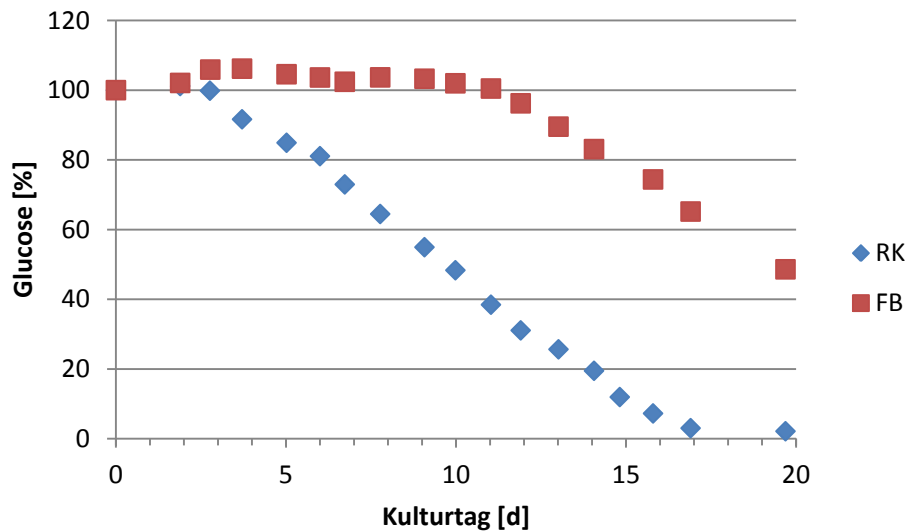
*Ganoderma applanatum* (Flacher Lackporling) ist wie *P. pulmonarius* (vgl. Abschnitt 5.2.2) aufgrund seiner Fähigkeit,  $\beta$ -Carotin ohne Zugabe von  $H_2O_2$  abzubauen, interessant. Analog zu Arbeiten mit *P. pulmonarius* wurde daher die Produktion solcher Enzyme im Rührkessel- und Festbett-Bioreaktor untersucht.

An den ersten zwölf Kulturtagen wurde im Rührkessel-Bioreaktor eine höhere  $\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität als im Festbett-Bioreaktor nachgewiesen (Abbildung 5-19). Ab Tag 13 stieg die Enzymaktivität des Festbett-Systems und übertraf bis Tag 16 die des Rührkessels. An Tag 20 wurde im Rührkessel-Bioreaktor mit 12,7 aU die höchste Aktivität gemessen. Ein Messfehler wurde ausgeschlossen.



**Abbildung 5-19:**  $\beta$ -Carotin-abbauende Aktivität von *G. applanatum* in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB). Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in SNL.

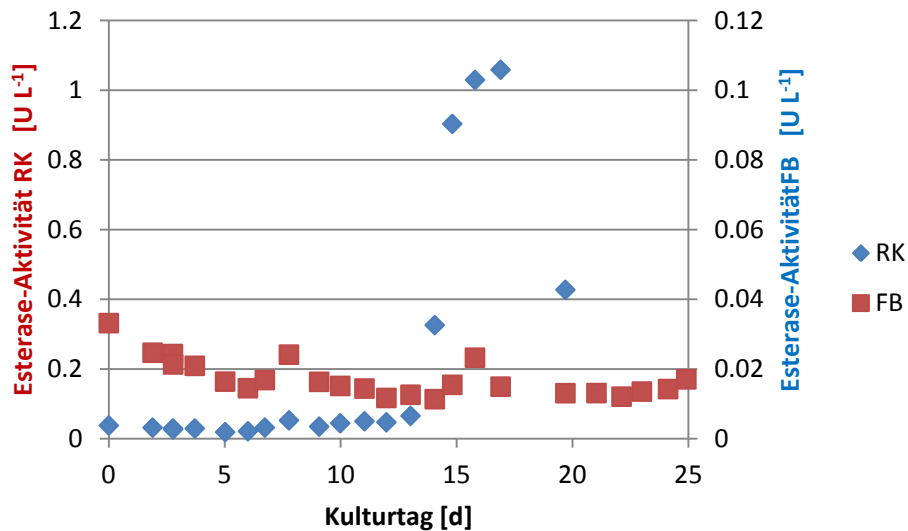
Da die Glucose bereits am 17. Kulturtag nahezu verbraucht war (Abbildung 5-20), bestand zwischen dem Abbau der Kohlenstoffquelle und dem Aktivitätsmaximum im Rührkessel-Bioreaktor kein direkter Zusammenhang. Es könnte sich jedoch um eine Folge des Nährstoffmangels gehandelt haben. In beiden Bioreaktoren fiel die Zunahme der  $\beta$ -Carotin-abbauenden Aktivität mit dem Beginn des linearen Glucoseabbaus – und damit dem Beginn der Wachstumsphase – zusammen. Diese begann im Festbett acht Kulturtage später als im Rührkessel-Bioreaktor. Auch bei diesem Versuch wurde die Glucose im Rührkessel-Bioreaktor deutlich schneller abgebaut als im Festbett-Bioreaktor. Es kann daher auf bessere Wachstumsbedingungen im Rührkessel-Bioreaktor geschlossen werden.



**Abbildung 5-20:** Glucoseabbau in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) beim Bioreaktorvergleich mit *G. applanatum*. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in SNL.

Neben  $\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen bildet *G. applanatum* Carboxylesterasen, die durch Hydrolyse zum Abbau von natürlichen Substraten beitragen und Präkursoren für die Aromabiosynthese freisetzen könnten. Für die Bestimmung der Esteraseaktivität wurde die Hydrolyse von Butansäure-p-nitrophenylester (PNPB) photometrisch aufgenommen. PNPB wird von nahezu allen Esterasen und Lipasen hydrolysiert (Doolittle *et al.* (1998)). Wie aus Abbildung 5-21 ersichtlich wird, stieg die Esterase-Aktivität im Rührkessel ab Tag 14 und erreichte an Tag 17 mit  $1,06 \text{ U L}^{-1}$  ihr Maximum. An diesem Kulturtag war die Kohlenstoffquelle Glucose aufgebraucht. Im Festbett-Bioreaktor wurde hingegen die eingetragene Aktivität der Vorkultur von  $0,03 \text{ U L}^{-1}$  in 26 Kulturtagen nicht überschritten. Die höhere Aktivität im Rührkessel-Bioreaktor wäre neben den unterschiedlichen Kulturbedingungen der Bioreaktor-Systeme beispielsweise durch das Freisetzen intrazellulärer Enzyme erklärbar, welche durch das Rührwerk gefördert werden könnte.





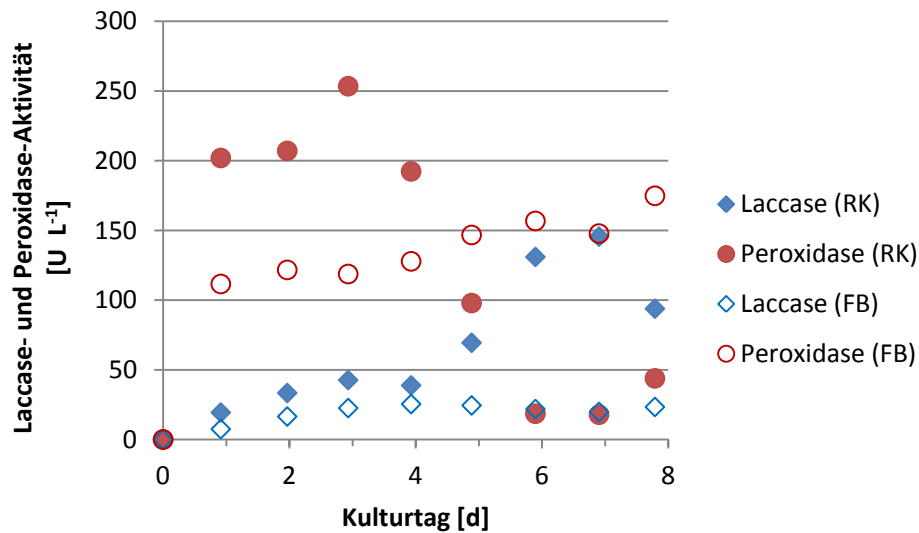
**Abbildung 5-21:** Carboxylesterase-Aktivität von *G. applanatum* in Rührkessel- (RK, linke y-Achse) und Festbett-Bioreaktor (FB, rechte y-Achse). Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in SNL.

#### 5.2.4 Produktion einer *dye decolorizing* Peroxidase mit *Hirneola auricula-judae*

Das Judasohr (*Hirneola auricula-judae*), welches unter dem Namen *Mu-Err* in China als Speisepilz geschätzt wird, ist für biotechnologische Anwendungen wegen der Produktion einer Laccase und einer *dye decolorizing* Peroxidase (DyP) interessant (Liers *et al.* (2010); Schmidt (2012)). Vor allem die DyP könnte zum Entfärben sowie zum Quervernetzen phenolischer Substrate eingesetzt werden. Da *H. auricula-judae* in Schüttelkultur stressinduzierten Morphologieänderungen durch Scherkraftbelastung zeigte, bot sich eine Kultivierung im Festbett-Bioreaktor an. Zur Enzyminduktion wurde ein Ethanol- und Cu<sup>2+</sup>-haltiges Medium eingesetzt (Schmidt (2012)).

Vergleichbar mit Versuchen in Schüttelkultur (Schmidt (2012)) stieg die Peroxidaseaktivität im Rührkessel-Bioreaktor zu Beginn schnell an und erreichte an Kulturtag drei das Aktivitätsmaximum (Abbildung 5-22). Zu diesem Zeitpunkt war die Konzentration des Induktors Ethanol auf ein Minimum gesunken (Abbildung 5-23) und blieb anschließend konstant (Abbildung 5-23). Möglicherweise reichte die Restkonzentration von 1,5 g L<sup>-1</sup> Ethanol nicht für eine weitere Induktion der Peroxidasebildung aus.

Um eine mögliche Degradation der Peroxidasen durch eine Bildung von Peptidasen zu demonstrieren, wurde eine Peptidase-Zymographie durchgeführt. Es konnte jedoch keine Veränderung des Peptidasmusters detektiert werden. Peptidasen sind daher nicht an der Aktivitätsabnahme nach dem vierten Kulturtag beteiligt.



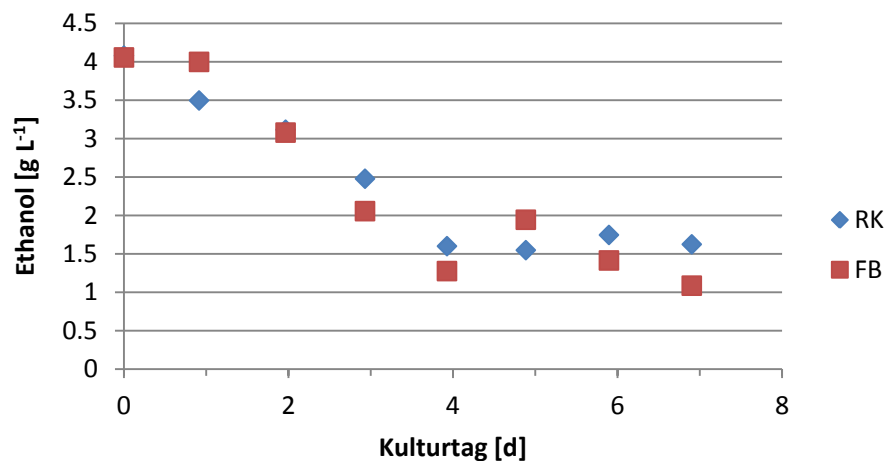
**Abbildung 5-22:** Laccase- und Peroxidase-Aktivität von *H. auricula-judae* in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB). Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in Haj-Medium.

Im Festbett-Bioreaktor stieg die Peroxidaseaktivität weniger, blieb aber über einen längeren Zeitraum erhalten und stieg auch nach Kulturtag vier langsam an, obwohl die Ethanolkonzentration analog zum Rührkessel-Bioreaktor zurückging. Auch die Aktivität des Nebenprodukts Laccase war bei allen Versuchen im Rührkessel höher als im Festbett-Bioreaktor.

**Tabelle 5-4:** Maximale Peroxidase-Aktivität von *H. auricula-judae* in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB)

	Maximale Peroxidase-Aktivität [U L <sup>-1</sup> ]	
	RK	FB
<b>1. Vergleich</b>	155	101
<b>2. Vergleich</b>	253	188
<b>3. Vergleich</b>	550	180

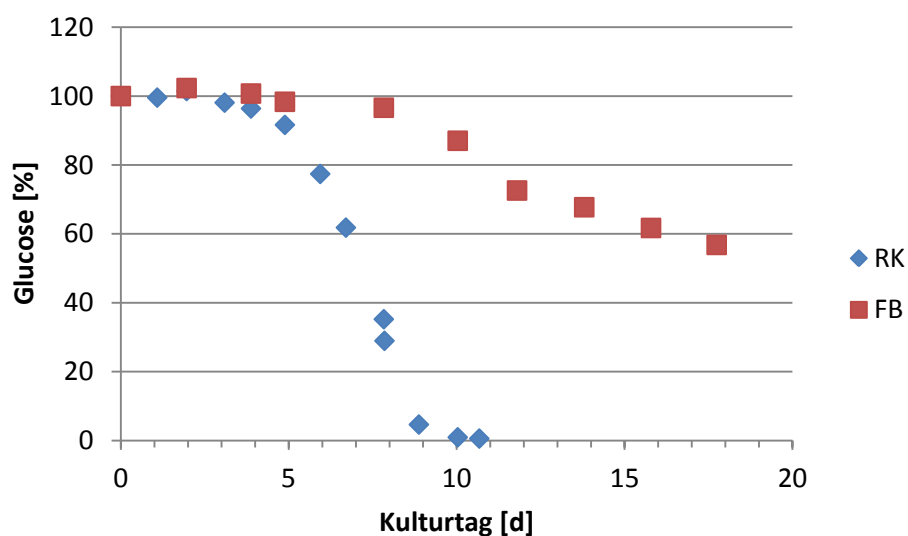
Bei drei vergleichenden Versuchen wurde im Rührkessel eine höhere DyP-Aktivität als im Festbett-Bioreaktor erzielt (Tabelle 5-4). Die maximale Aktivität unterlag einer starken Varianz. Bei Versuchen von Schmidt (2012) im Rührkessel-Bioreaktor wurde eine Aktivität von  $2600 \text{ U L}^{-1}$  erreicht. Der Organismus stellte jedoch im Rahmen dieser Studie mehrfach die Enzymexpression vollständig ein und musste erneut aus der Stammsammlung angezogen werden. So kam es trotz vorheriger Positivkontrolle im Schüttelkolben vor, dass bei einem Bioreaktorvergleich keine Peroxidase gebildet wurde.



**Abbildung 5-23:** Konzentration des Induktors Ethanol in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) beim dritten Bioreaktorvergleich mit *H. auricula-judae*. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in Haj-Medium.

Der Glucoseabbau, der als Wachstumsindikator dienen kann (siehe Abschnitt 5.1.1), fand in beiden Bioreaktoren während der ersten vier Tage kaum statt (Abbildung 5-24). Der Induktor Ethanol könnte zu einer Wachstumshemmung führen. Denkbar wäre auch ein Abbau von Ethanol, der die Aussage der Glucosekonzentration beeinflussen würde. Möglicherweise korreliert die Glucosekonzentration daher nicht mit dem Wachstum von *H. auricula-judae*. Da die Ethanolkonzentration am vierten Kulturtag auf ein Minimum von  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  gesunken ist und ab dann etwa konstant blieb (Abbildung 5-23), und da der Verlust an Ethanol vermutlich hauptsächlich durch Austragen mit der Belüftung und nicht durch Metabolisierung zu erklären ist, sollte der Verbrauch der Hauptkohlenstoffquelle trotzdem mit dem Wachstum zusammenhängen.

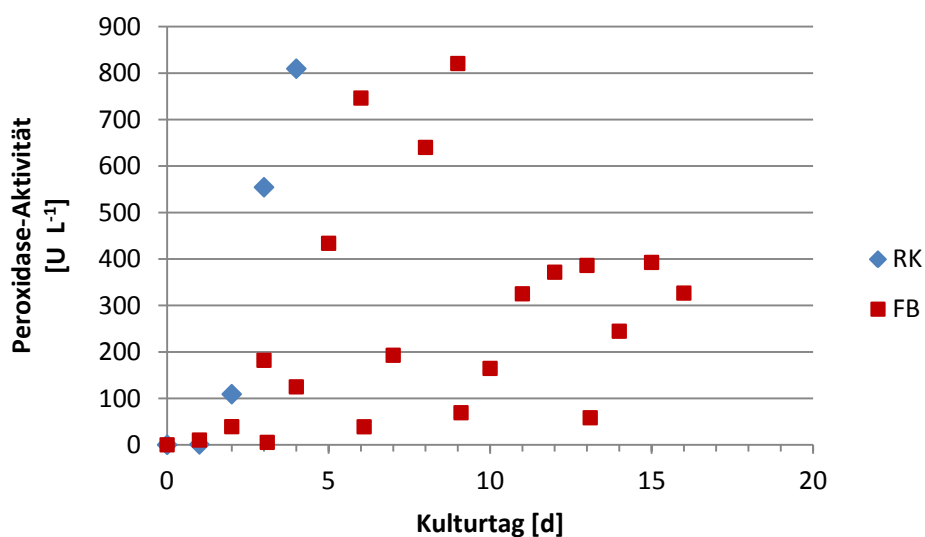
Zeitgleich mit dem Beginn des Glucoseabbaus nahm im Rührkessel die Laccaseaktivität zu. Die Abbaurrate der Kohlenstoffquelle lag mit max.  $3,8 \text{ g L}^{-1}$  in der Größenordnung anderer Basidiomyceten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Im Festbett-Bioreaktor begann der lineare Glucoseabbau deutlich später, und die Glucoseabbaurrate war mit max.  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  wesentlich geringer als im Rührkessel-Bioreaktor. *H. auricula-judae* wuchs daher im Festbett-Bioreaktor deutlich langsamer als im Rührkessel. Da die Enzymaktivität bereits zu Beginn der Kultur induziert wurde und eine längere Kulturdauer keinen Peroxidase-Gewinn brachte, ist das Wachstum für das vorliegende Experiment jedoch nicht von Bedeutung.



**Abbildung 5-24:** Glucoseabbau in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) beim ersten Bioreaktorvergleich mit *H. auricula-judae*. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen in Haj-Medium.

Da die Produktion von Peroxidasen mit *H. auricula-judae* induzierbar ist und die maximale Enzymaktivität nach vergleichsweise kurzer Kulturdauer erreicht wurde, sollte mit diesem Organismus das Potential einer semikontinuierlichen Enzymproduktion in den Bioreaktor-Systemen untersucht werden. Dass die Peroxidaseaktivität im Festbett nicht nachließ, könnte für ein stabiles Produktionssystem ebenfalls vorteilhaft sein (Abbildung 5-22). Das Medium des Festbett-Bioreaktors wurde vier Mal geerntet und durch frisches ersetzt, um mit der immobilisierten Biomasse einen neuen Produktionsansatz durchzuführen. Auf diese Weise wurden fünf Ernten gewonnen. Der Induktor Ethanol wurde täglich nachdosiert, da sich dieses Vorgehen bei Vorversuchen in Schüttelkulturversuchen als förderlich erwies.

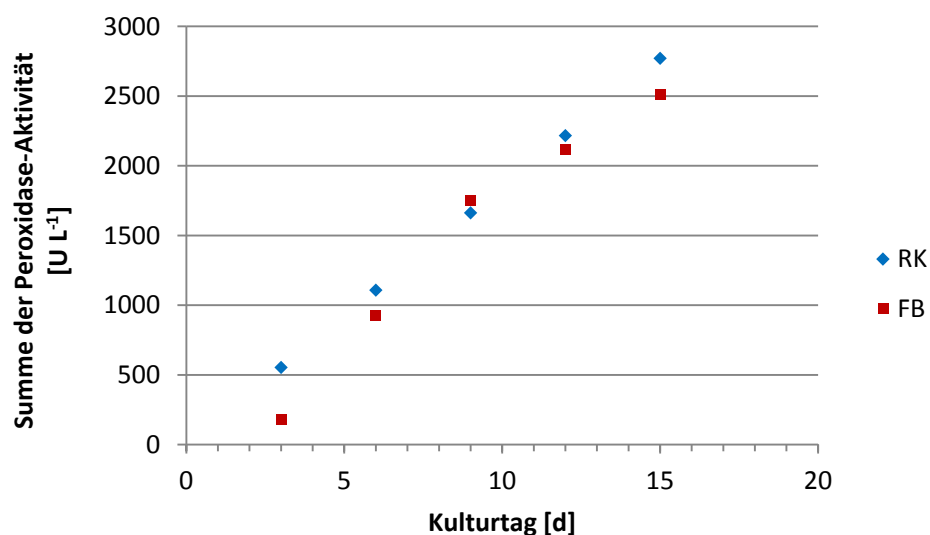
Am dritten Kulturtag, dem Zeitpunkt der ersten Ernte, erreichte der anfangs parallel geführte Rührkessel-Bioreaktor eine deutlich höhere Aktivität (Abbildung 5-25). Die Enzymaktivität der folgenden zwei Ansätze im Festbett-Bioreaktor ergaben Aktivitäten in derselben Größenordnung wie im Rührkessel-Bioreaktor an Kulturtag vier. Die Ernte erfolgte im Festbett-Bioreaktor jedoch am dritten Kulturtag, da das Verhältnis von Produktbildung und Kulturdauer auf diese Weise günstiger ausfiel. Der dritte Ansatz (Tag 6-9) erreichte die höchste Aktivität. Gleichzeitig war zu beobachten, dass am äußeren Bereich des Festbetts Myzel wuchs. Vermutlich war das Bett zu dieser Zeit vollständig bewachsen. Eine Zunahme der Biomasse würde die Tatsache erklären, dass der zweite und dritte Ansatz eine höhere Aktivität ergaben als der erste Ansatz. In Schüttelkultur wurde gezeigt, dass durch den Einsatz eines größeren Inokulums eine höhere Ausbeute erzielt werden kann. Dies sollte auch auf die Bioreaktoren übertragbar sein. Die sinkende Aktivität des vierten und fünften Ansatzes könnte damit begründet werden, dass das Bett voll bewachsen war und zur Enzymproduktion möglicherweise Wachstum erforderlich ist. Auch eine limitierte Nährstoffversorgung könnte mit zunehmender Biomasse im Festbett auftreten.



**Abbildung 5-25:** Kultur von *H. auricula-judae* im Festbett-Bioreaktor (FB) sowie eine vergleichende Kultur im Rührkessel-Bioreaktor (RK) unter Standardbedingungen. Im Festbett-Bioreaktor wurde an den Kulturtagen 3, 6, 9 und 13 das Haj-Medium gewechselt.

Um die Leistungsfähigkeit beider Kultursysteme zu vergleichen, wurde die Enzymaktivität aller fünf Ernten des Festbett-Bioreaktors summiert. Diese Summe wurde mit der Aktivität des parallel

geführten Rührkessel-Bioreaktors verglichen. Um die Produktivität einer möglichen Wiederholung der Rührkessel-Kultur darzustellen, wurde diese für jede Ernte mit sich selbst addiert (Abbildung 5-26). Da die maximale Aktivität der Kultur von *H. auricula-judae* nicht reproduzierbar ist (Tabelle 5-4), wurde mit dieser hypothetischen Wiederholung die Vergleichbarkeit zur Festbett-Kultur gewahrt. Die effizientere Produktion im Rührkessel-Bioreaktor wird aus der beschriebenen Summierung deutlich (Abbildung 5-25). Da im Vergleich zu vorangegangenen Versuchen im Rührkessel-Bioreaktor (Abbildung 5-22) bei diesem Experiment die Aktivität erst gegen Ende stieg (Abbildung 5-25), kann im Rührkessel prinzipiell eine noch schnellere Peroxidaseproduktion erreicht werden. Eine höhere Produktivität könnte auch durch den Einsatz eines größeren Inokulums erzielt werden.



**Abbildung 5-26:** Vergleich der Summierung der Peroxidase-Aktivitäten einer semikontinuierlichen Kultur mit *H. auricula-judae* im Festbett-Bioreaktor (FB) mit der entsprechenden Summe einer Rührkesselkultur (RK)

### 5.2.5 Resultat des Bioreaktorvergleichs mit ausgewählten Enzym-Produzenten

Der Vergleich von vier verschiedenen Enzymproduzenten in Festbett- und Rührkessel-Bioreaktor ergab durchgehend eine höhere Produktbildung im Rührkessel. Lediglich im Falle des einzigen induzierten Produktionsansatzes, der Bildung einer *dye decolorizing* Peroxidase mit *H. auricula-judae*, ist die Produktivität des Festbett-Bioreaktors annähernd mit der des Rührkessel-Bioreaktors vergleichbar. Die *lag*-Phase, die anhand der Konzentrationsabnahme der

Kohlenstoffquelle Glucose abgeschätzt wurde, war im Festbett-Bioreaktor mit allen untersuchten Organismen länger als im Rührkessel-Bioreaktor. Die Glucoseabbaurate war ebenfalls in allen Fällen im Rührkessel-Bioreaktor höher. Hieraus kann auf eine höhere Stoffwechselaktivität und eine vermehrte Biomassebildung geschlossen werden (siehe Abschnitt 5.1.1). Demzufolge sind die Wachstumsbedingungen im Rührkessel-Bioreaktor für die untersuchten Organismen bei den gewählten Kulturbedingungen besser.

Weil die ausgewählten Stämme in Schüttelkultur gut kultivierbar sind, kann eine gewisse Scherkräfttoleranz angenommen werden. Die Vorkulturen, die als Inokulum für beide Kultursysteme dienten, wurden als Schüttelkultur generiert. Da die Unterschiede der Kulturbedingungen der Vorkultur und des Rührkessels weniger ausgeprägt sein dürften, als die Differenzen zwischen Schüttelkultur und Festbett-Bioreaktor, könnte die unterschiedlich lange *lag*-Phase durch die Vorkultur bedingt sein. Weil Schüttelkulturen die gängige Arbeitsweise darstellen und andere Kulturformen bezüglich Reproduzierbarkeit, Biomassebildung und der Animpfmethode gravierende Nachteile aufweisen, wurde dieses Verfahren beibehalten.

Das langsamere Wachstum im Festbett-Bioreaktor könnte durch einen Mangel an aktiver Oberfläche begründbar sein. Während Hyphen sich im Rührkessel radial zu Pellets vergrößern können und diese durch Zerteilung regelmäßig an zusätzlicher Oberfläche gewinnen, ist der Raum für einzelne Wachstumszonen im Festbett durch das Trägermaterial und benachbarte Zellen schnell begrenzt. Da sich das Volumen des Festbetts mit einem Liter deutlich unter dem des Rührkessels von fünf Litern befindet, ist eine höhere Zelldichte naheliegend. Ab einer gewissen Zelldichte ist aufgrund räumlicher Begrenzung eine reduzierte Teilungsrate zu erwarten.

Ein Vergleich des Festbettvolumens (1 L) mit dem Volumen des Rührkessels (5 L) würde in Bezug auf die produzierte Enzymaktivität pro Reaktionsvolumen im Falle von *F. velutipes* (Peptidasen) und *H. auricula-judae* (*dye decolorizing* Peroxidase) zugunsten des Festbett-Bioreaktors ausgelegt. Diese Form der Gegenüberstellung lässt jedoch außer Acht, dass für eine wirtschaftliche Einordnung einzig die Dimension einer Anlage gewichtet wird. Außerdem stehen dem Organismus im Festbett Nährstoffe von 5 L Medium zur Verfügung. Selbiges gilt für die Verdünnung möglicher Edukte und Produkte. Die Folge dieser Verdünnung könnte eine verlangsamte Umsetzung und damit eine erhöhte Produktstabilität sein. Prinzipiell könnte die

Leistungsfähigkeit des Festbett-Bioreaktors gesteigert werden, indem das Festbett im Verhältnis zum Reaktionsgefäß möglichst groß konstruiert wird.

Wenn das Medium das bewachsene Trägermaterial des Festbetts gleichmäßig durchströmt, so wären – im Gegensatz zu Pellets einer bewegten Kultur – alle Bereiche gleichmäßig versorgt. Damit würde im Durchschnitt eine verbesserte Versorgung und folglich ein höherer Ertrag vor allem von nicht-wachstumskorrelierenden Produkten erzielt. Ungleichmäßige Bewuchsdichten könnten jedoch dazu führen, dass das Nährmedium den Zellträger kanalisiert durchströmt. Folge wäre eine diffusive Nährstoffversorgung weiter Bereiche und damit eine verminderte Stoffwechselaktivität. Das Pumpen von Wasser durch das bewachsene Festbett nach Abschluss von Kultivierungen führte zum Austreten der Hauptflüssigkeitsmengen an einigen Punkten, nicht zu einem gleichmäßigen Ausströmen. Dies ist ein Hinweis für die beschriebene Kanalbildung.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen darf nicht auf eine generell bessere Eignung des Rührkessel-Bioreaktors geschlossen werden. Für andere Anwendungen, wie der Kultur besonders empfindlicher Organismen, könnte der Festbett-Bioreaktor vorteilhaft sein. Solche Organismen wurden jedoch durch die Selektion mittels *screenings* in Schüttelkulturen ausgeschlossen. Auch die Vorteile einer Zellimmobilisierung sind vor allem für kontinuierliche Arbeiten vielversprechend.

Prinzipiell ist der eingesetzte Festbett-Bioreaktor nicht für den Betrieb mit den verwendeten Organismen entwickelt worden. Konstruktion und Betriebsweise sind auf die Kultur von Säugerkulturen ausgelegt. Diese werden meist auf porösem Trägermaterial kultiviert, welches im Festbett von Medium umströmt wird. Da Säugerkulturen nur dünne Filme bilden und sich nicht auf beliebige Oberflächen ausbreiten, sind die Ansprüche an das Kultursystem nicht mit denen von Pilzen vergleichbar. Daher sollten als Basis für weitere Arbeiten mit Basidiomyceten im Festbett-Bioreaktor zunächst Grundlagen wie Dimensionierung, Trägermaterial und Betriebsparameter untersucht und optimiert werden. Aufgrund der Einschränkungen bezüglich reproduzierbarer Ansätze bedarf es hierfür mehrerer, parallel geführter Festbett-Systeme. Analog zu Ansätzen der Säugerkultursysteme würden sich hierfür gut parallelisierbare, lineare Festbett-



Bioreaktoren anbieten. Diese bieten zudem strömungsmechanische Vorteile und würden die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs im Festbett erlauben.

### 5.3 Biotechnologische Erzeugung von hochwertigen Aromastoffen aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie

Mit dem Ziel, neue Organismen für die Produktion natürlicher Aromastoff-Gemische zu identifizieren, wurden 32 Pilzstämmen mit Rapspresskuchen kultiviert. Zwei Stämme wurden zur näheren Untersuchung selektiert und deren Produkte identifiziert. Mit *F. rosea* wurde eine Maßstabsvergrößerung in Festbett- und Rührkessel-Bioreaktor durchgeführt.

#### 5.3.1 Selektion von aromagenerierenden Basidiomyceten

In einem *screening* wurden Schüttelkulturen von 32 Pilzstämmen (Tabelle 4-1) mit Rapspresskuchen, einem Nebenstrom der Rapsölgewinnung, in Minimalmedium durchgeführt. Innerhalb von 2 Wochen wurden dreimal eine Probe entnommen und olfaktorisch charakterisiert. In Tabelle 5-5 werden die zehn interessantesten Geruchseindrücke zusammengefasst.

Ausgewählte Proben wurden einer genaueren Charakterisierung mittels Gaschromatographie (GC-FID, GC-O und GC-MS) unterzogen. So konnten besonders interessante Aromaproduzenten identifiziert werden. Der Vergleich mit parallel geführten Kulturen ohne Zugabe des Nebenstroms zum Nährmedium erlaubte eine Differenzierung von genuin gebildeten Aromen. Da Kulturen mit Nebenstrom mehr Substrat zur Verfügung stand als den Kontrollansätzen, wurden in ersteren teils höhere Konzentrationen an gebildeten Verbindungen detektiert. Daraus resultierte nicht nur ein intensiveres, sondern unter Umständen auch ein verändertes Duftbild. Auch dieser Effekt konnte ggf. mittels gaschromatographischen Methoden nachgewiesen werden.

So bildete *Tyromyces sambuceus* auf Rapspresskuchen einen Geruch von Kokosnuss und Pfirsich (Tabelle 5-5, Nr. 10). Dieser war in der Kontrolle nur schwach wahrnehmbar. Der Geruch ist auf  $\gamma$ -Decalacton zurückzuführen, welches durch *T. sambuceus* gebildet wird (Berger *et al.* (1986b); Kapfer *et al.* (1989)). Durch Supplementierung mit Ricinolsäure, die in großen Mengen aus Rizinusöl gewonnen werden kann, wurden hohe Lacton-Konzentrationen erreicht. Dieses

Verfahren ist jedoch mit Hefen wie *Yarrowia lipolytica* ergiebiger (Pagot *et al.* (1998); Rabenhorst *et al.* (2000); Gomes *et al.* (2012)).

Auch von *Auriporia aurea* (Tabelle 5-5, Nr. 1; früher als *Poria aurea* bezeichnet) wurde die Bildung von Lactonen beschrieben. Berger *et al.* (1986b) beschreiben ein Maximum nach 35 Kulturtagen.

**Tabelle 5-5:** Ausgewählte Geruchseindrücke der Kombination verschiedener Basidiomyceten mit Rapspresskuchen in Minimalmedium.

Nr.	Spezies	Kulturtag der Probenahme [d]		
		4	10	14
1	<i>Auriporia aurea</i>	süßlich, frisch, fermentiert	Melone, fruchtig, unangenehm rauchig	fruchtig
2	<i>Fomitopsis pinicola</i>	Pilz	marzipanartig, Zitrone	süßlich, muffig
3	<i>Gloeophyllum odoratum</i>	süß, Birne	süß, Birne	strohig, pflanzlich
4	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	marzipanartig (intensiv)	marzipanartig (intensiv)	marzipanartig (wenig)
5	<i>Fomitopsis rosea</i>	fruchtig, grün, süßlich	"Aromacocktail", Karamell, fruchtig, süßlich	"Aromacocktail", Karamell, fruchtig, süßlich
6	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Nelke, Rauch, blumig	Stroh, weniger blumig	blumig
7	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	süßlich, Anis	etwas süßlich	Pilz, muffig
8	<i>Polyporus betulinus</i>	fermentierte Frucht (wenig), süßlich, Holz	fermentierte Frucht, aromatisch, süßlich	süßlich, fermentiert
9	<i>Tyromyces floriformis</i>	süßlich, frisch	-	grün, Melone, Gurke
10	<i>Tyromyces sambuceus</i>	Kokosnuss, Pfirsich	Kokosnuss (intensiv), Pfirsich	alte Frucht

Flüchtige Verbindungen aus *Gloeophyllum odoratum*, dessen aromagenerierendes Potential bereits im Namen deutlich wird, wurden etwa von Hanssen *et al.* (1987) und Rösecke *et al.* (2000a) charakterisiert. Auf Rapspresskuchen wurden jedoch nur schwach wahrnehmbare Aromen gebildet (Tabelle 5-5, Nr. 3). Bedenkt man, dass Hanssen *et al.* (1987) 42 Tage kultivierten, so reichten 14 Tage möglicherweise nicht für eine ausreichende Bildung der beschriebenen Terpene und Phenylpropanoide aus. Da die Wirtschaftlichkeit industrieller Anwendungen von der Dauer der Bioreaktion abhängt, waren lange Kulturzeiten im Rahmen des durchgeführten Projektes zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde auch *Tyromyces floriformis* (Tabelle 5-5, Nr. 9) nicht vertiefend untersucht. Der Geruchseindruck auf Rapspresskuchen war außerdem weder intensiv noch auffällig. Abraham *et al.* (1994) bestimmten flüchtige Verbindungen aus *T. floriformis* ebenfalls erst nach 20 Kulturtagen.

Aus Fruchtkörpern von *Fomitopsis pinicola* identifizierten Rösecke *et al.* (2000b) 30 Terpene. Darunter befand sich Limonen, welches den Zitrusduft der Kultur auf Rapspresskuchen erklären könnte (Tabelle 5-5, Nr. 2). Die Autoren identifizierten außerdem Benzaldehyd, welches bei zahlreichen Pilzen einen marzipanartigen Geruch verursacht. So schlagen Krings *et al.* (1996) für *Ischnoderma benzoinum* (Tabelle 5-5, Nr. 4) eine von Phenylalanin ausgehende Synthese für Benzaldehyd vor.

*Pleurotus pulmonarius* roch auf Rapspresskuchen süßlich und nach Anis (Tabelle 5-5, Nr. 7). Gutierrez *et al.* (1994) beschrieben die Synthese von Anisaldehyd durch *P. pulmonarius*. Da die Verbindung auch ohne Zugabe von Pflanzenmaterial gebildet wurde, gehen die Autoren von einer Eigensynthese aus. Das pilzige Aroma, welches nach 14 Tagen dominierte, spricht für die Bildung von pilztypischen C<sub>8</sub>-Verbindungen wie 1-Octen-3-ol. Die Biosynthese dieser Verbindungen durch *P. pulmonarius* wurde bereits untersucht (Belinky *et al.* (1994); Assaf *et al.* (1995)). Die Fruchtkörperproduktion von *P. pulmonarius* wurde von Silva *et al.* (2002) auf verschiedenen Restströmen untersucht.

Der Birkenporling *Polyporus betulinus* (Tabelle 5-5, Nr. 8), der auch als *Piptoporus betulinus* bezeichnet wird, ist vor allem als Heilpilz untersucht worden. Beschriebene Gerüche umfassen fruchtige Noten, Apfel, Cerealien, Kaffee, einen stechenden Geruch (Jong *et al.* (1993)) sowie einen Duft nach Ananas, der von Medium und Kulturform abhängt (Gallois *et al.* (1990)).

Identifiziert wurden neben pilztypischen C<sub>8</sub>-Verbindungen blumig duftende Anissäure- und Benzoessäureesterderivate (Gallois *et al.* (1990)) und Terpene wie Linalool (Rösecke *et al.* (2000b)).

*Paecilomyces farinosus* (Tabelle 5-5, Nr. 6) wurde bisher nicht auf sein Aromabildungspotential untersucht. Er erzeugte auf dem Nebenstrom bereits nach vier Kulturtagen einen intensiv rauchigen und blumigen Duft. Auch der "Aromacocktail", den *Fomitopsis rosea* nach zehn Tagen bildete (Tabelle 5-5, Nr. 5), war intensiv und vielversprechend. Wegen der verhältnismäßig kurzen Kulturzeit und den besonderen Geruchseindrücken wurden diese beiden Stämme für weiterführende Arbeiten ausgewählt.

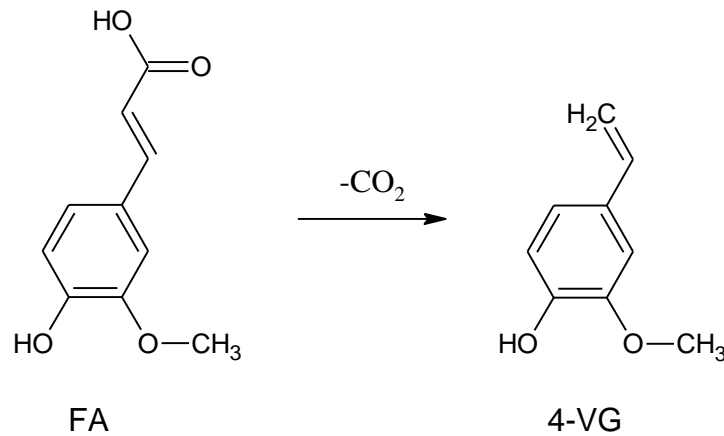
### 5.3.2 Aromabildung mit *Paecilomyces farinosus*

*P. farinosus* wird auch als *Isaria farinosa* bezeichnet und ist die anamorphe Form des Ascomyceten *Cordyceps memorabilis* (Pacioni *et al.* (1978)). Es handelt sich um ein weltweit verbreitetes, opportunistisches Entomopathogen, welches als biologisches Pflanzenschutzmittel getestet wurde (Zimmermann (2008)). Untersucht wurden auch Hydrolasen (Harney (1989); Tribak *et al.* (2002)) und Oxidasen, die zur Entgiftung von Böden und Abfällen eingesetzt werden können (Sampedro *et al.* (2009); Romero *et al.* (2010)).

Auf Rapspresskuchen fiel *P. farinosus* nach vier Kulturtagen durch ein rauchiges, nelkenblütenartiges Aroma auf. Mittels GC- FID/O und GC-MS konnte dieser Geruch 4-Vinylguajacol (4-Ethenyl-2-methoxyphenol, 4-VG) zugeordnet werden. Diese Verbindung wird als Aroma mit Noten von Nelke und Rauch verwendet. Außerdem kann 4-VG zu biologisch abbaubaren Polymeren verarbeitet werden (Hatakeyama *et al.* (1977)). Von Natur aus kommt 4-VG unter anderem in Kaffee, Bier und gekochtem Apfel vor (Belitz *et al.* (2001)). Es entsteht bei der Pyrolyse von Lignin (Brebü *et al.* (2010)) und ist daher Bestandteil von Raucharomen.

Enzymatisch entsteht 4-VG meist durch Decarboxylierung von Ferulasäure (Abbildung 5-27). Diese Reaktion wird von Hefen (z. B. Huang *et al.* (1993); Donaghy *et al.* (1999)) und Bakterien (z. B. Zago *et al.* (1995); Adamu *et al.* (2012)) beschrieben. Auch Ascomyceten wie *Aspergillus niger* (Baqueiro-Pena *et al.* (2010)), *Fusarium solani* (Nazareth *et al.* (1986)) oder *P. variotii* (Rahouti *et al.* (1989)) bilden diese Substanz. Beim Abbau von Ferulasäure durch Basidiomyceten wie *Pycnoporous cinnabarinus* konnte ebenfalls 4-VG nachgewiesen werden (Krings *et al.* (2001)).

Viele Autoren gehen jedoch davon aus, dass Basidiomyceten Ferulasäure analog zur  $\beta$ -Oxidation abbauen. Da mikrobiell erzeugtes 4-VG meist weiter degradiert wird, eignen sich manche Organismen nicht für synthetische Anwendungen.



**Abbildung 5-27:** Decarboxylierung von Ferulasäure (FA) zu 4-Vinylguajacol (4-VG)

Durch Kultivierung von *P. farinosus* unter Zugabe von Ferulasäure konnte nachgewiesen werden, dass diese als Präkursor für 4-VG dient. *P. farinosus* bildet demzufolge eine Ferulasäure-decarboxylase. Aus Rapspresskuchen kann Ferulasäure beispielsweise durch den Abbau von Lignin (Theander *et al.* (1977)) freigesetzt werden. Auch eine Esterhydrolyse ist möglich. Letzteres könnte durch das Enzym Ferulasäureesterase erfolgen (Vuorela *et al.* (2003)). Ferulasäureesterasen wurden unter anderem aus *A. niger* (Faulds *et al.* (1994)) und *Penicillium pinophilum* (Castanares *et al.* (1992)) isoliert. Beide Organismen zählen, wie *P. farinosus*, zur Familie der *Trichocomaceae*.

Um die Ferulasäuredecarboxylase aus *P. farinosus* zu charakterisieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Aktivitätsassay entwickelt. Als geeigneter Puffer erwies sich Kaliumphosphat-Puffer mit pH 6 – in diesem Puffer war das Enzym außerdem gefrierstabil. Enzymatische Aktivität wurde olfaktorisch oder mittels HPLC detektiert. Durch Aktivitätsvergleich von Kulturüberstand und Zellhomogenat wurde nachgewiesen, dass das Enzym zellbasiert vorliegt. Es konnte durch Waschen des Homogenats gewonnen werden. Ultrafiltration diente zum Konzentrieren des Proteins und Abtrennen kleiner Moleküle. Da das Enzym vor und nach diesem Schritt über vergleichbare Aktivität verfügte, war für die Umsetzung kein Cofaktor erforderlich. Das Konzentrat diente für weitere Reinigungsschritte.

Mittels Gel-Permeations-Chromatographie (Größenausschlusschromatographie, SEC) und anschließendem Aktivitätsassay mit den gesammelten Fraktionen konnte eine ungefähre molekulare Größe von 29 kDa bestimmt werden. Die Reinheit des Proteins nach der SEC reichte jedoch nicht für eine Sequenzierung aus. Dafür müssten der SEC Vorreinigungen mit höherer Kapazität vorausgehen.

Da kein selektiver Enzymassay für gelbasierte Methoden zu Verfügung stand, wurde bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) das Gel in Streifen geschnitten und nach Einstellen des pH-Wertes für den oben genannten Aktivitätsassay eingesetzt. Dies ergab einen pI von etwa 5,2. Dieser kann als Ausgangswert für eine Ionenaustauschchromatographie (IEX) mit pH-Gradient dienen. Bei einer NaCl-Konzentration von 33 mM nahm die Aktivität der Ferulasäure-decarboxylase deutlich ab, höhere Konzentrationen haben die Reaktion vollständig inaktiviert. Durch Entsalzung konnte das Enzym reaktiviert werden. Als weitere Proteinreinigungsschritte kommen daher hydrophobe Interaktionschromatographie und IEX mit NaCl-Gradient in Frage. Außerdem könnte präparative IEF zur Aufreinigung des Enzyms beitragen.

Neben anderen Phenolsäuredecarboxylasen wurden in der Literatur Ferulasäuredecarboxylasen aus folgenden Bakterien heterolog exprimiert:

- *Bacillus subtilis* (Cavin *et al.* (1998))
- *Bacillus pumilus* (Zago *et al.* (1995))
- *Lactobacillus brevis* (Landete *et al.* (2010))
- *Lactobacillus plantarum* (Cavin *et al.* (1997); Rodriguez *et al.* (2008))
- *Pediococcus pentosaceus* (Barthelmebs *et al.* (2000)).

In Pilzen wurde noch keine Sequenz einer Ferulasäuredecarboxylase zugeordnet. Aufgrund der fernen Verwandtschaft von Pilzen und Bakterien könnte die Ferulasäuredecarboxylase aus *P. farinosus* über andere Eigenschaften als bisher bekannte Enzyme verfügen. Der direkte Einsatz von *P. farinosus* zum Umsatz von Ferulasäure zur Aromaproduktion erscheint dagegen wenig interessant, da Milchsäurebakterien und *A. niger* bei der Nahrungsmittelverarbeitung etabliert sind.

Da das Produkt 4-Vinylguajacol 25–30 Mal mehr Wert ist als das Edukt Ferulasäure, ist die beschriebene Biokonversion von wirtschaftlichem Interesse (Mathew *et al.* (2006)). Bedenkt man

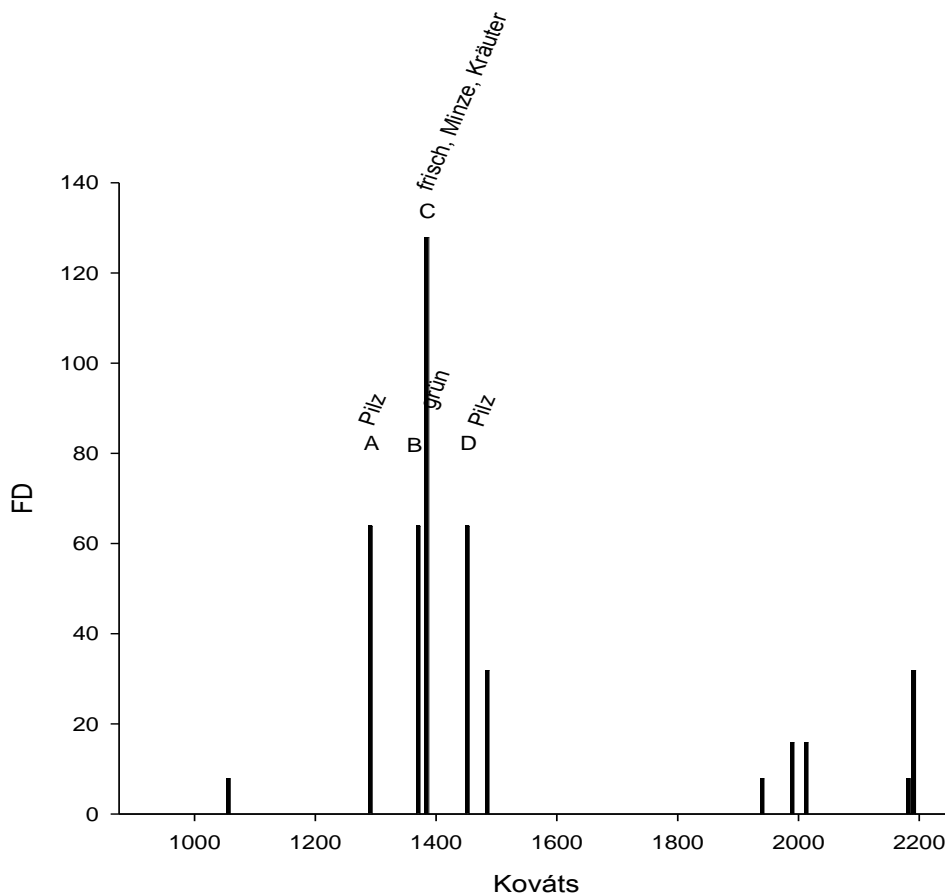
außerdem, dass mikrobiell erzeugtes 4-VG als natürliches Aroma gekennzeichnet werden darf (siehe S. 9), so kann von einer höheren Wertschöpfung ausgegangen werden. Das Produkt könnte als kalt erzeugtes Raucharoma Verwendung finden, welches herstellungsbedingt im Gegensatz zu konventionellem Raucharoma frei von kanzerogenen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) ist.

### 5.3.3 Aromabildung mit *Fomitopsis rosea*

Mit Rapspresskuchen kultiviert bildete *F. rosea* einen angenehm fruchtig blumigen Geruch. Um charakteristische Aromen zu identifizieren, wurde Kulturüberstand zur weiteren Analyse extrahiert und konzentriert. Hierfür erwies sich die klassische Extraktion mit Pentan/Diethylether als ungeeignet, da die im Nebenstrom enthaltenen Lipide nachfolgende Arbeitsschritte behinderten. Daher wurde das Medium mit dem synthetischen Öl Tegosoft ausgeschüttelt. Dieses kann mittels Thermodesorption direkt für die gaschromatographische Analyse eingesetzt werden (Schimanski *et al.* (2012)). Für die Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA), die der Identifikation von Schlüsselverbindungen des Gesamtaromas dient, wurden die Extrakte aller Kulturtage vereinigt. Dadurch wurde die Berücksichtigung aller Aromastoffe des gesamten Kulturzeitraumes ermöglicht (Abraham *et al.* (1993)). Das kombinierte Extrakt wurde mittels Dünnschicht-Hochvakuumdestillation (TLHVD) konzentriert (Krings *et al.* (2003)). Bei der AEVA wurde die Probe gaschromatographisch getrennt und abgerochen. Durch schrittweise Verdünnung mit Lösungsmittel und anschließende Untersuchung waren die Geruchsintensitäten einzelner Komponenten vergleichbar. Dieses Verfahren wurde wiederholt, bis kein Aromastoff mehr wahrnehmbar war. Aus der Anzahl der Verdünnungsschritte ergab sich der Verdünnungsfaktor (*flavour dilution (FD) factor*) für jede Verbindung. Der FD-Faktor gibt an, mit welchem Anteil Lösungsmittel das Extrakt maximal verdünnt werden konnte, so dass das Aroma bei der Analyse noch wahrnehmbar blieb (Belitz *et al.* (2001)).

Laut AEVA prägten vier Substanzen den Geruchseindruck der Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen (Abbildung 5-28). Diese wurden mittels Kováts-Retentionsindex, Geruchseindruck und GC-MS identifiziert (Tabelle 5-6). 1-Hexanol (B) wird neben seiner grünen Note als stechend, etherisch, alkoholisch, fruchtig und süßlich beschrieben (Mosciano (1993)). Die Verbindung wurde bereits von Berger *et al.* (1986a) und Abraham *et al.* (1994) in Medium des

selben Stammes<sup>1</sup> nachgewiesen. Da 1-Hexanol auch von Raps gebildet wird (Blight *et al.* (1995)), ist eine zusätzliche Freisetzung aus dem Substrat denkbar.



**Abbildung 5-28:** Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse des TLHVD-Konzentrats einer Rührkessel-Bioreaktorkultur mit *F. rosea* und Rapspresskuchen. Darstellung der Aromaverdünnungs-Faktoren (FD) einzelner Aromen mit Geruchseindruck und der Kováts-Retentionsindizes (DB-WAX).

A-D: siehe Tabelle 5-6.

Abraham *et al.* (1994) wiesen in Schüttelkulturen mit *F. rosea* 1-Octen-3-ol (D) nach und beschrieben dieses als süßlich pilzig. 1-Octen-3-on (A) riecht erdig, pilzig und metallisch (Mosciano (2001)). Die Hauptkomponente Octansäuremethylester (C) wird mit fruchtig, grün, zitrusartig, fettig und wachsartig beschrieben (Mosciano (1994)). Beide Substanzen wurden bisher nicht für *F. rosea* beschrieben.

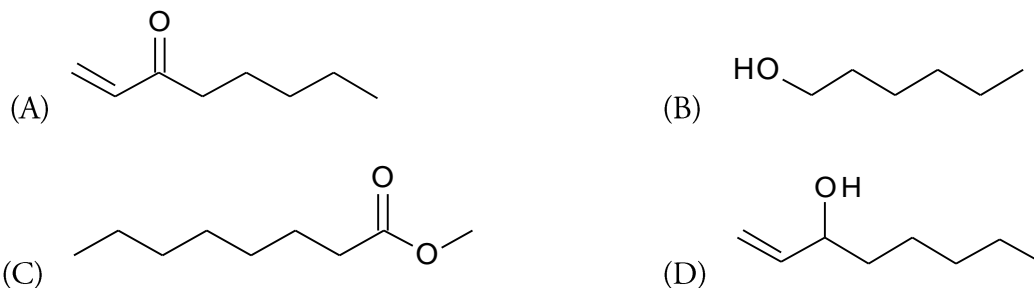
<sup>1</sup> Der Stamm CBS 313.36 wurde früher als *Polyporus durus*, dann als *Nigroporus durus* bezeichnet. Die Zuordnung als *Fomitopsis rosea* erfolgte mittels ITS-Sequenzierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit.



Octansäuremethylester findet sich unter anderem in Ananas, Erdbeere und schwarzem Tee und dient der Formulierung solcher Aromen. 1-Hexanol kommt in zahlreichen Früchten wie Guave, Pflaume, Sternfrucht oder Bitterorange sowie in verschiedenen alkoholischen Getränken vor und wird als Bestandteil von 51 Aromen und Düften genannt (TheGoodScentsCompany (2012)).

**Tabelle 5-6:** Retentionsindizes, FD-Faktoren, Geruchseindrücke sowie Strukturformeln der Hauptaromakomponenten des TLHVD-Konzentrats einer Rührkessel-Bioreaktorkultur mit *F. rosea* und Rapspresskuchen. (a) Cullere *et al.* (2004), (b) Varming *et al.* (2004), (c) Valim *et al.* (2003)

Struktur	Kováts RI (DB-WAX)		FD-Faktor	Geruchseindruck (GC-O)
	GC/FID	Literaturwert		
1-Octen-3-on (A)	1290	1305 (a)	64	pilzig
1-Hexanol (B)	1369	1350 (a)	64	grün
Octansäuremethylester (C)	1384	1389 (b)	128	frisch, Minze, Kräuter
1-Octen-3-ol (D)	1451	1438 (c)	64	pilzig



Als Bildungsweg von 1-Octen-3-ol in Pilzen schlugen Tressl *et al.* (1982) sowie Würzenberger *et al.* (1984) eine enzymatische Oxidation von Linolsäure (Lipoxygenase) zum 13- bzw. 10-Hydroperoxid vor. Durch anschließende Spaltung des 13-Hydroperoxids (Hydroperoxid-Lyase) würde 1-Octen-3-on gebildet, welches zum Alkohol reduziert werden kann. Die Spaltung des 10-Hydroperoxids würde direkt zu 1-Octen-3-ol führen. Bisher wurde weder untersucht, ob Linolsäure für die Oxidation frei oder verestert vorliegen muss, noch wurde eine 10-Hydroperoxid-spezifische Lyase in Pilzen identifiziert (Combet *et al.* (2006)).

Untersuchungen an *Pleurotus pulmonarius* legten nahe, dass zwei unterschiedliche Lipoxygenasen zum 13- bzw. 10- Hydroperoxid führen (Assaf *et al.* (1995); Assaf *et al.* (1997)). Die Autoren

gehen davon aus, dass 1-Octen-3-ol gemäß der Hypothese von Wurzenberger *et al.* (1984) vor allem aus dem nicht-konjugierten 10-Hydroperoxid der Linolsäure gebildet wird. 1-Octen-3-on entsteht möglicherweise durch Oxidation von 1-Octen-3-ol (Belitz *et al.* (2001)). Das Substrat Linolsäure ist eine der meistvorkommenden Fettsäuren in Pilzen (Prostenik *et al.* (1978)).

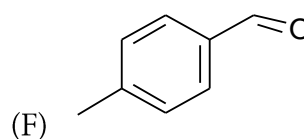
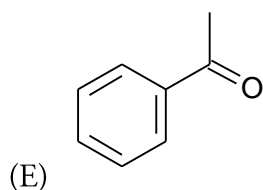
Die Supplementierung mit Rapspresskuchen, welcher Reste des linolsäurereichen Rapsöls enthält, könnte die Bildung von 1-Octen-3-ol und 1-Octen-3-on zusätzlich fördern. Beide Verbindungen riechen pilztypisch und haben niedrige Geruchsschwellwerte (1-Octen-3-ol: 10 ppb, 1-Octen-3-on: 4 ppb; Manning (1986)).

Die Geruchseindrücke der GC-O-Analytik der vier Hauptaromakomponenten waren im Vergleich zum Geruch des Aromaextrakts weniger angenehm. Eine pilzige Note, die bei der AEVA mit 1-Octen-3-ol und 1-Octen-3-on hervortrat, war in Medium und Gesamtextrakt nicht wahrnehmbar. Auch der grüne Duft von 1-Hexanol war dem Gesamtextrakt nicht zu entnehmen. Lediglich die geruchsintensivste Komponente, Octansäuremethylester, roch ansprechend und ist als Teil des Gesamteindrucks des Aromaextrakts vorstellbar. Diese Verbindung roch jedoch nur entfernt wie das Aromaextrakt, welches als fruchtig blumig beschrieben werden kann. Es ist denkbar, dass durch das Vereinigen der Fraktionen aller Kulturtage eine Verdünnung temporär gebildeter Aromen zugunsten von omnipräsenten Metaboliten stattfand und die AEVA daher in ihrer Gewichtung verschoben wurde. Außerdem könnten sich die flüchtigen Komponenten des Kopfraums der Proben von der Zusammensetzung des Extraktes unterscheiden und dadurch aromaaktive Verbindungen diskriminiert werden. Der Verlust labiler Substanzen ist ebenfalls möglich. Auch synergistische oder antagonistische Wirkungen der Aromastoffe könnten zu einer Minderung des pilzigen Geruches geführt haben.

Zusätzlich wurde das Gesamtaroma neben den vier Hauptkomponenten von zahlreichen anderen Verbindungen beeinflusst, die jede für sich zwar wenig intensiv rochen, in ihrer Gesamtheit aber das Aromaprofil verändern könnten. Der Einfluss niedrig dosierter Aromen wurde durch die AEVA methodenbedingt nicht berücksichtigt.

**Tabelle 5-7:** Auswahl an Riechstoffen einer *F. rosea* Kultur mit Rapspresskuchen, die mittels GC-FID/O und GC-MS charakterisiert wurden

Kováts RI (DB-WAX)	Geruchseindruck	Intensität	Substanz
1003	süßlich	2	unbekannt
1061	süßlich, fruchtig	3	2-Ethylhexenal
1105	dumpf	1	Ethylbenzen
1185	Gemüse	2	Methylhexanoat
1250	grün, Gemüse	2	3-Octanon
1292	pilzig	3	1-Octen-3-on
1325	Plastik	1	4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanon
1372	Geranie	4	1-Hexanol
1384	frisch, Minze	3	Methyloctanoat
1453	pilzig	3	1-Octen-3-ol
1484	muffig, pilzig	2	2-Octenal
1558	frisch, Zitrus, Minze	2	1-Octanol
1601	Wintergrün, fruchtig	3	Acetophenon (E)
			4-Methylbenzaldehyd (F)
			2-Octen-1-ol



Mittels GC-O wurden je nach Kulturtag bis zu 104 Geruchsstoffe detektiert, von denen viele nur in Spuren enthalten waren. Tabelle 5-7 gibt eine Auswahl dieser Riechstoffe wieder. Auffällig war vor allem ein Peak bei RI 1601. Dieser kam mit seinem Geruchseindruck dem Extrakt besonders nahe. Die Auswertung des GC-MS ergab, dass der Peak sich aus drei Verbindungen zusammensetzte: Acetophenon (E), 4-Methylbenzaldehyd (F) und 2-Octen-1-ol. Der Vergleich der RI mit Literaturwerten bestätigte diese Zuordnung (Acetophenon: 1650, Fukami *et al.* (2002); 4-Methylbenzaldehyd: 1642, Alasalvar *et al.* (2003)). Acetophenon wird als süßlich, mandel-, weißdorn- und akazienartig beschrieben; 4-Methylbenzaldehyd als phenolisch, fruchtig und kirschähnlich (TheGoodScentsCompany (2012)).

Obwohl Abraham *et al.* (1994) bei einer Kultur von *F. rosea* auf Komplexmedium nach 20 Tagen zwölf geruchsaktive Lactone identifizierten, von denen drei eine Konzentration von über 1 mg L<sup>-1</sup> erreichten, wurden mit dem lipidreichen Rapspresskuchen keine Lactone produziert.

Möglicherweise reichte die Kulturdauer von 14 Tagen nicht aus, oder das Substrat war für die Lactonbildung ungeeignet. Auch Berger *et al.* (1986a) beschrieben Lactonbildung bei Supplementierung von *F. rosea*-Schüttelkulturen mit dem kurzkettigen Triglycerid Miglyol, konnten diese mit anderen Lipiden jedoch nicht erzielen.

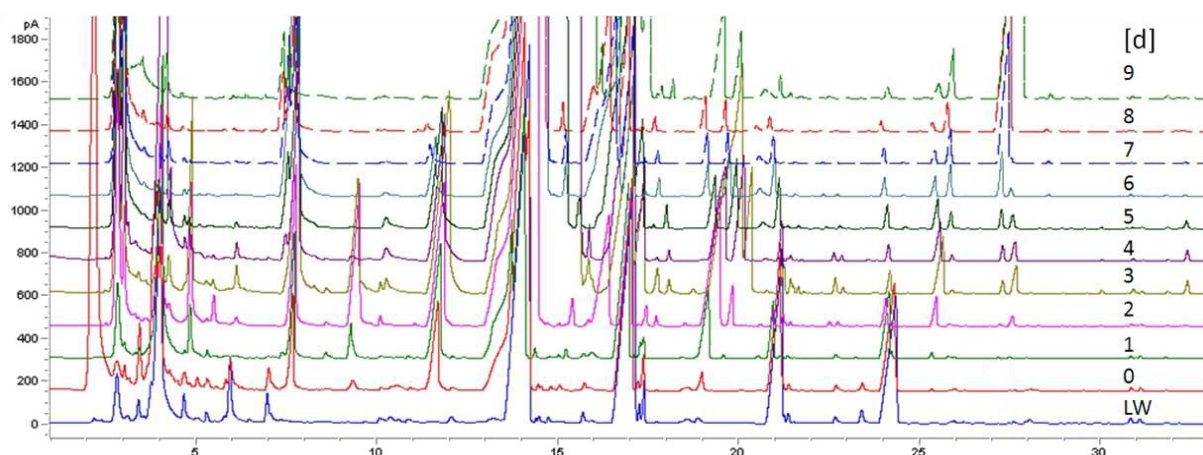
#### 5.3.4 Maßstabsvergrößerung mit *Fomitopsis rosea*

Um das biotechnologische Potenzial für weiterführende Anwendungen abzuschätzen, wurde eine vergleichende Maßstabsvergrößerung des vielversprechendsten Organismus des Aroma-*screenings*, *F. rosea*, im Rührkessel- und Festbett-Bioreaktor durchgeführt. Als Medium wurde analog zum *screening* Minimalmedium (siehe Abschnitt 4.2.2) mit 2 % Rapspresskuchen verwendet.

Der Geruchseindruck aus den Versuchen in Schüttelkulturen blieb bei der Maßstabsvergrößerung auf 5 L Bioreaktoren erhalten. Die höchste Komplexität und Intensität der Aromen konnte in der Abluft des Rührkessel-Bioreaktors vom vierten bis sechsten Kulturtag verzeichnet werden, beim Festbett-Bioreaktor trat das olfaktorische Maximum einen Tag verzögert auf. Weiterhin war zu erkennen, dass sich ab dem dritten Kulturtag, an dem die Glucose im Medium abgebaut war (Abbildung 5-35), das Aromaspektrum veränderte.

Da die aktive Belüftung die flüchtigen Komponenten aus dem Medium austrieb, roch das Medium erwartungsgemäß weniger intensiv als bei Schüttelkulturen. Dem wurde durch tägliche *on-line* Probenahme aus der Abluft mittels Tenax® TA, porösem Poly(2,6-diphenyl-p-phenylenoxid), begegnet. Die adsorbierten Verbindungen wurden durch Thermodesorption (TDS) desorbiert und gaschromatographisch analysiert (TDS-GC-O/FID).

Die Chromatogramme der Proben einzelner Kulturtage (Abbildung 5-29) lassen erkennen, dass Medienbestandteile abgebaut wurden (z. B. Peak nach 24 Minuten), einzelne Verbindungen ein temporäres Bildungsmaximum hatten (z. B. Peak nach neun Minuten) und andere gegen Ende der Kulturführung, zu welchem eine sichtbare Zellyse einsetzte, vermehrt gebildet wurden (z. B. Peak nach 26,5 Minuten). Die meisten großen Peaks stammen von nicht geruchsaktiven Verbindungen.



**Abbildung 5-29:** TDS-GC-FID-Chromatogramme einzelner Kulturstage [d] von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium unter Standardbedingungen im Rührkessel-Bioreaktor. LW: vor dem Animpfen der Kultur.

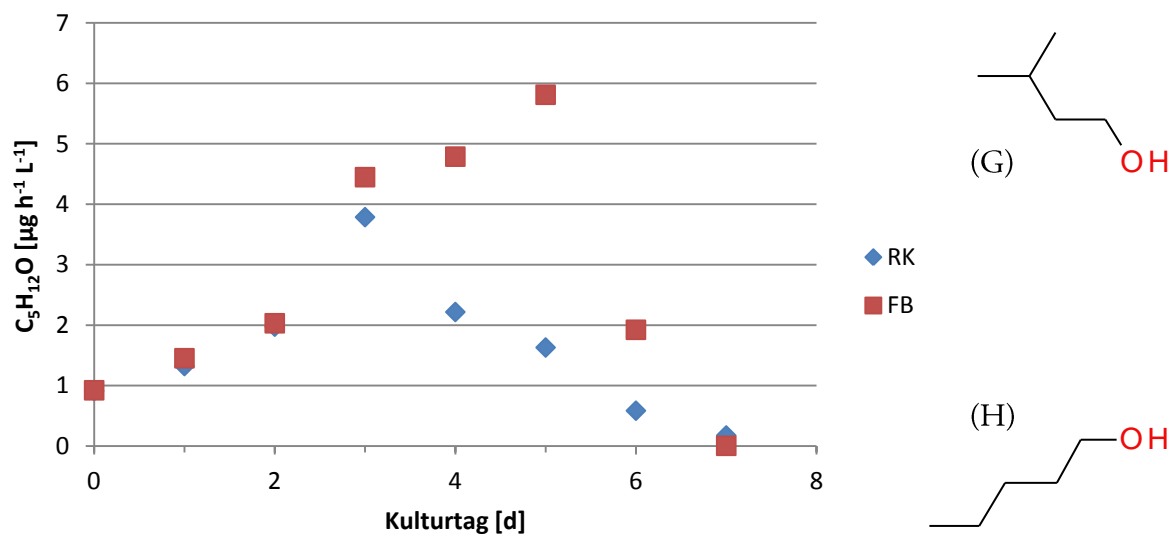
Eine Bildungskinetik in beiden Kultursystemen konnte für vier aromaaktive Substanzen erstellt werden (Tabelle 5-8). Die Zuordnung der Peaks erfolgte mittels Geruchseindruck, RI und TDS-GC-MS. Aufgrund von Überschneidung der Peaks zahlreicher Verbindungen und der Unschärfe, die sich aus dem Vergleich von Chromatogrammen verschiedener Geräte mit unterschiedlichen Detektoren ergibt, konnten nur wenige Verbindungen der täglich gemessenen TDS-GC-FID-Chromatogramme mit ausreichender Sicherheit identifiziert werden. Wegen der nicht-selektiven Detektion des FIDs konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die identifizierten Peaks im Laufe der Kultur mit anderen Verbindungen coeluierten.

**Tabelle 5-8:** Identifizierte Verbindungen für die Erstellung einer Bildungskinetik

Struktur	Geruchseindruck	Kováts RI	Kováts RI (Literatur)	
Methyl-3-methylbutanoat	fruchtig, Apfel, etherisch	1024	1015	Sanz <i>et al.</i> (2001)
3-Methylbutan-1-ol <i>oder</i> 1-Pentanol	süßlich	1227	1230 1244	Ferreira <i>et al.</i> (2001) Umano <i>et al.</i> (2002)
3-Butenylisothiocyanat	frisch, zitrus	1454	-	
Methylbenzoat	Mandel, Wintergrün	1615	1635	Ferreira <i>et al.</i> (2001)

Ein Pentylalkohol, 3-Methylbutan-1-ol oder 1-Pentanol, konnte mittel MS, RI und Geruchseindruck nicht eindeutig identifiziert werden. Beide Substanzen sind Bestandteil von

preiswerten Fuselölen (van der Schaft (2007)) und wurden von Abraham *et al.* (1994) in Schüttelkulturen mit *F. rosea* nachgewiesen. Da die Substanz nicht im Blindwert enthalten war, wurde sie mit der Vorkultur die Bioreaktoren eingebracht (Tag 0, Abbildung 5-30). Bis zum dritten Kulturtag, an dem die Glucose verbraucht war (Abbildung 5-35), nahm die Konzentration in beiden Kultursystemen vergleichbar schnell zu. Danach sank die Bildung im Rührkessel, wogegen sie im Festbett-Bioreaktor stieg. Möglicherweise war die Bildungsrate im Rührkessel-Bioreaktor geringer, oder es erfolgte eine weitere Metabolisierung.

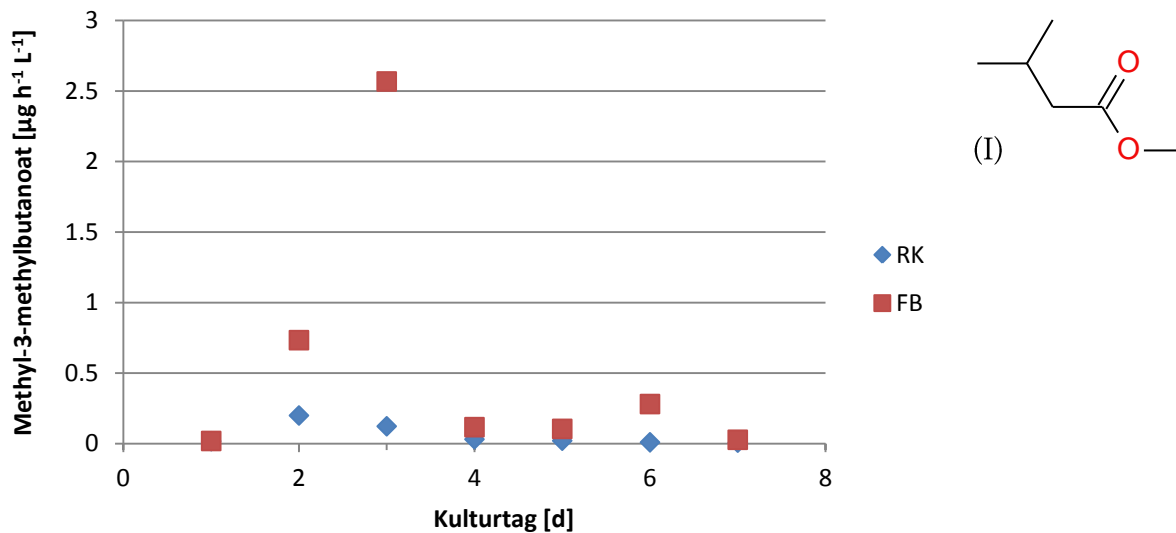


**Abbildung 5-30:**  $C_5H_{12}O$  (3-Methylbutan-1-ol (G) oder 1-Pentanol (H)) in der Abluft von Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB). Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium unter Standardbedingungen.

Methyl-3-methylbutanoat wurde im Rührkessel-Bioreaktor vergleichsweise wenig gebildet (Abbildung 5-31). Dies könnte aus unterschiedlichen Physiologien in den Bioreaktor-Systemen resultieren. Im Festbett-Bioreaktor wurde am dritten Kulturtag (Glucose aufgebraucht, Abbildung 5-35) ein erstes Bildungsmaximum erreicht. Die Stoffwechsellage könnte eine verringerte Produktion an Tag vier verursacht haben, der nach zwei Kulturtagen ein zweites, niedrigeres Maximum folgte. Die Verbindung wurde noch nicht in Kulturen mit *F. rosea* nachgewiesen.

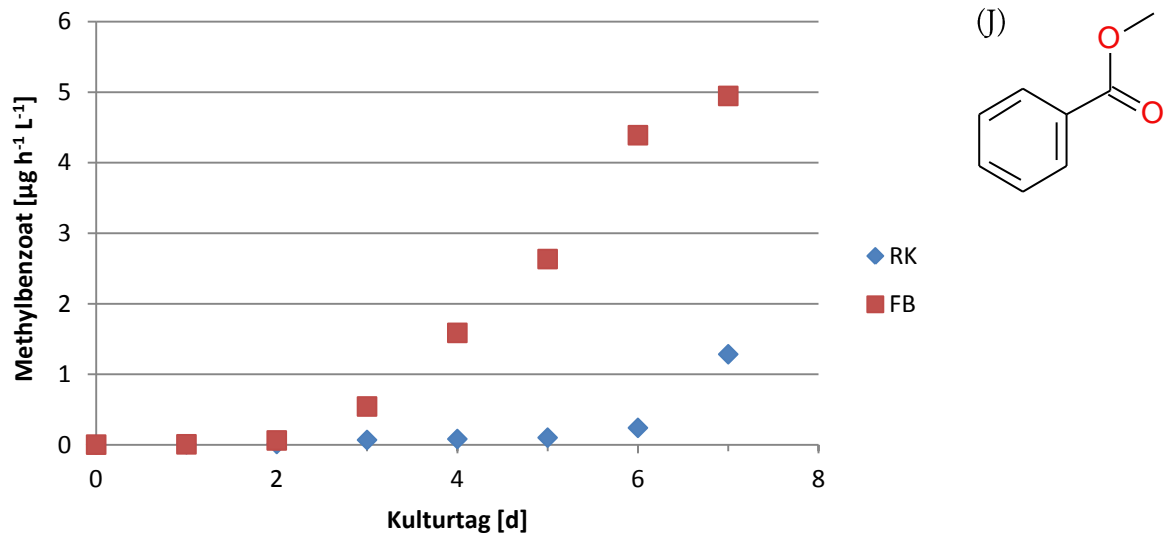
Methylbenzoat (Niobeöl) wurde ebenfalls hauptsächlich im Festbett-Bioreaktor gebildet. Die Synthese begann am dritten Kulturtag mit dem Verbrauch der Glucose und nahm beinahe linear

zu (Abbildung 5-32). Im Rührkessel-Bioreaktor hingegen stieg die Produktion kaum an. Möglicherweise wurde durch die Kultur im Festbett eine Esterase oder Alkoholacyltransferase vermehrt exprimiert. Methylbenzoat wurde von Abraham *et al.* (1994) in Schüttelkulturen mit *F. rosea* nachgewiesen.



**Abbildung 5-31:** Methyl-3-methylbutanoat (I) in der Abluft von Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB). Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium unter Standardbedingungen.

3-Butenylisothiocyanat wurde mittel MS und Geruch identifiziert. Literaturwerte für eine vergleichbare Kapillarsäule liegen nicht vor. Die Substanz entsteht durch Abbau des Senfölglycosids Gluconapin (Frank *et al.* (2010)), welches in Raps enthalten ist (Velasco *et al.* (2008)). Die unterschiedlich hohe Konzentration des Thiocyanats vor dem Animmen (Tag -1, Abbildung 5-33) könnte mit mechanischem Aufschluss oder dem direkten Luftkontakt im Rührkessel begründet werden. Der erneute Konzentrationsanstieg ab dem dritten Kulturtag, dem Zeitpunkt des vollständigen Glucoseverbrauchs, hing vermutlich mit der Bildung von Hydrolasen zusammen. Da im Festbett zu Beginn der Kulturführung kaum 3-Butenylisothiocyanat freigesetzt wurde, war die Konzentration des Senfölglycosids möglicherweise an Tag drei im Festbett höher als im Rührkessel. Dies würde die Tatsache erklären, dass die Konzentration von 3-Butenylisothiocyanat in der Festbett-Bioreaktorabluft gegen Kulturende höher war als beim Rührkessel.



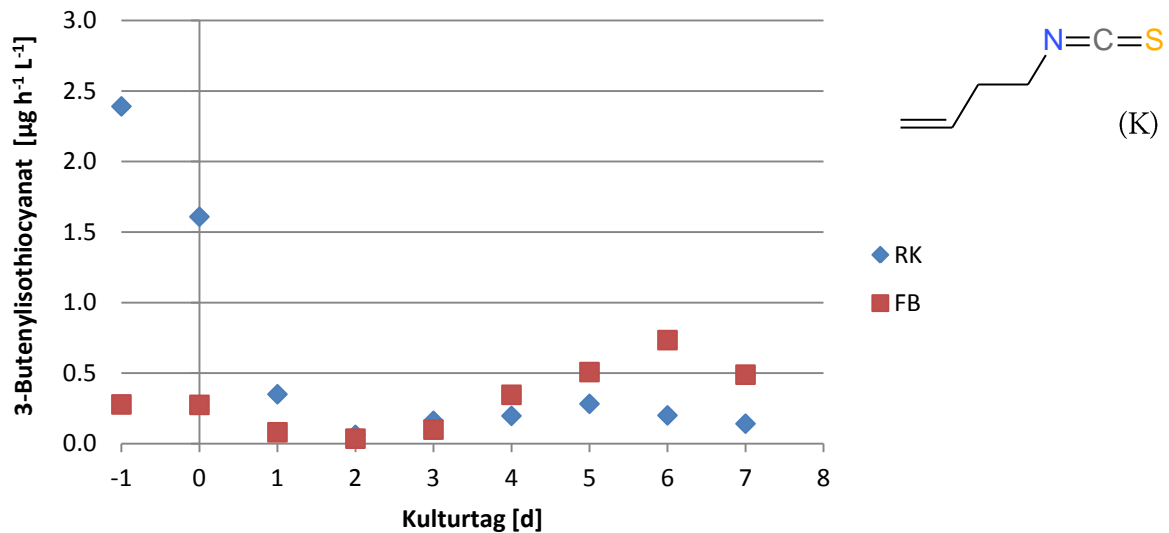
**Abbildung 5-32:** Methylbenzoat (J) in der Abluft von Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB).  
Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium  
unter Standardbedingungen.

Die Betrachtung der Gesamtflüchtigen (Abbildung 5-34) – ein Summenparameter, der alle aus der Abluft adsorbierten Substanzen auf den Standard Cyclopentanol normiert – zeigte, dass im Rührkessel-Bioreaktor an den Kulturtagen drei und vier ein temporäres Maximum erreicht wurde. An Tag drei wurde Glucose vollständig abgebaut (Abbildung 5-35). Die Dauer des temporären Maximums bis Tag vier könnte dadurch begründet werden, dass Basidiomyceten Polysaccharide und organische Säuren in das Medium abgaben. Diese dienen vermutlich als Substrat, nachdem die Glucose aufgebraucht war, und verzögerten so eine grundlegende Umstellung des Stoffwechsels. Die Zunahme der Gesamtflüchtigen im Rührkessel-Bioreaktor an Tag neun hängt wahrscheinlich mit der einsetzenden Zelllyse zusammen.

Im Festbett-Bioreaktor unterschied sich die Menge der Gesamtflüchtigen zu keinem Zeitpunkt der Kulturführung deutlich vom Leerwert (Abbildung 5-34, dargestellt als Tag -1). Hierfür sind verschiedene Begründungen denkbar. Das Ausbleiben von Scherstress minimierte die Zahl der zerstörten Zellen, wodurch entweder weniger flüchtige Verbindungen oder weniger Enzyme freigesetzt wurden, die aus Medienbestandteilen flüchtige Stoffe bildeten. Möglich ist auch, dass eine Unterversorgung der Zellen zu einer Mangelsituation führte und daher weniger flüchtige Substanzen gebildet wurden. Dagegen spricht jedoch, dass Glucose im Festbett-Bioreaktor



ähnlich schnell wie im Rührkessel-Bioreaktor abgebaut wurde (vgl. Abbildung 5-35). Trotzdem könnte zu einem späteren Zeitpunkt ein Nährstoffmangel eingetreten sein, da die unlöslichen Bestandteile des Reststroms im Festbett immobilisiert waren und daher nur angrenzenden Zellen zur Verfügung standen.

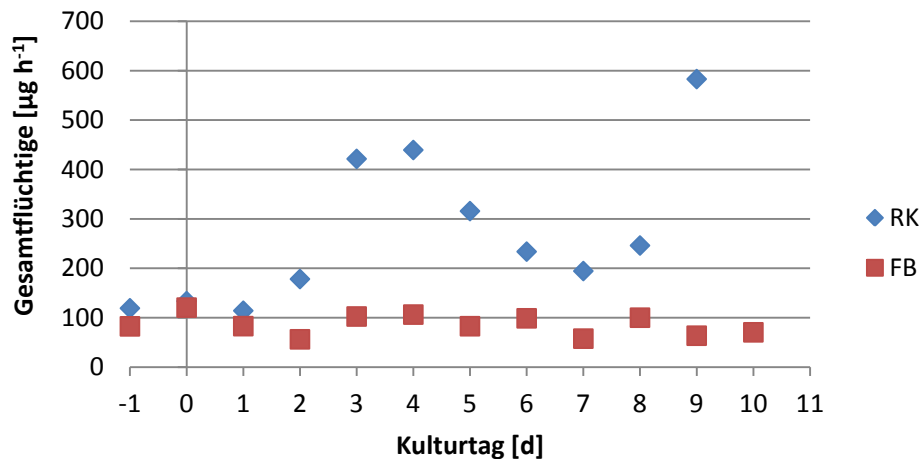


**Abbildung 5-33:** 3-Butenylisothiocyanat (K) in der Abluft von Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB). Tag -1 stellt die Abluftprobe vor dem Animpfen dar. Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium unter Standardbedingungen.

Mit zunehmendem Bewuchs des Festbetts ist außerdem die Ausbildung von Kanälen für das zirkulierende Medium denkbar. Dies hätte diffusiv versorgte Bereiche zur Folge, die substratlimitiert sein könnten (vgl. Abschnitt 5.2.5). Letztlich kann auch angenommen werden, dass die veränderten Kulturbedingungen der Festbettkultivierung zu einem veränderten Metabolismus führten, der ein anderes Enzymspektrum mit sich bringt. Der Rührkessel-Bioreaktor bildet zwar insgesamt mehr flüchtige Substanzen – die quantifizierten, aromaaktiven Substanzen überwiegen jedoch im Festbett-Bioreaktor.

Unter der Annahme, dass die Bildung der Gesamtflüchtigen innerhalb von 24 Stunden keinen großen Schwankungen unterlag und alle Substanzen adsorbiert wurden, kann die Produktion flüchtiger Verbindungen über den gesamten Kulturverlauf berechnet werden. Demnach wurden im Rührkessel ungefähr 71,5 mg Flüchtige produziert, im Festbett 22,5 mg (bezogen auf den Standard Cyclopentanol). Von den adsorbierten Verbindungen war nur ein Teil geruchsaktiv. Es

muss berücksichtigt werden, dass polare und schwerer flüchtige Verbindungen nur anteilig mit der Abluft aus dem Medium getragen wurden und die tatsächlich gebildeten Konzentrationen einiger Aromastoffe somit höher gewesen sein dürften. Der Abbau von nicht ausgetragenen Substanzen ist naheliegend.



**Abbildung 5-34:** Gesamtflüchtige als Summenparameter in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB). Tag -1 gibt den Gehalt vor dem Animpfen an. Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium unter Standardbedingungen.

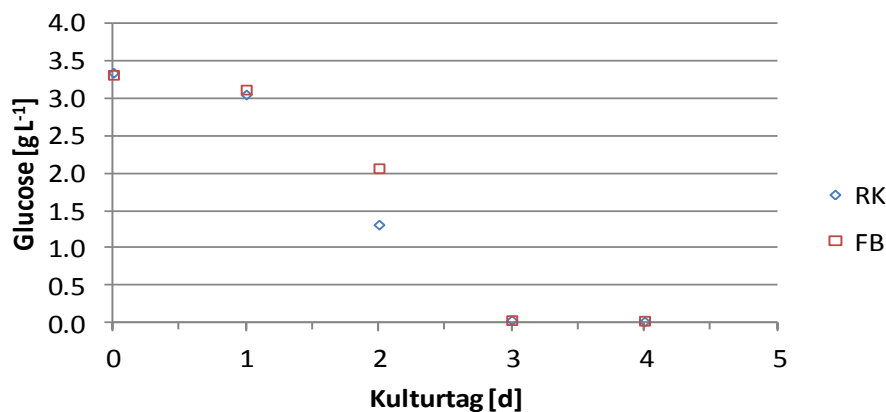
Analog zur Berechnung der Gesamtflüchtigen wurde die gesamte Menge der quantifizierten Substanzen, die mit der Abluft ausgetragen wurden, berechnet (Tabelle 5-9). Es wird deutlich, dass die Ausbeute an Metaboliten von *F. rosea* im Festbett-Bioreaktor überwiegt. So wurde in diesem Kultursystem nahezu die zehnfache Menge an Methyl-3-methylbutanoat produziert. Dagegen wurde das aus dem Substrat freigesetzte 3-Butenylisothiocyanat vor allem aus dem Rührkessel ausgetragen (siehe auch Abbildung 5-33).

**Tabelle 5-9:** Abgabe verschiedener Substanzen mit der Abluft aus Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB) über den gesamten Kulturzeitraum

	Produktbildung [mg]	
	RK	FB
<b>Methyl-3-methylbutanoat</b>	0.05	0.46
<b>C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>O</b>	1.51	2.57
<b>Methylbenzoat</b>	0.22	1.70
<b>3-Butenylisothiocyanat</b>	0.65	0.34

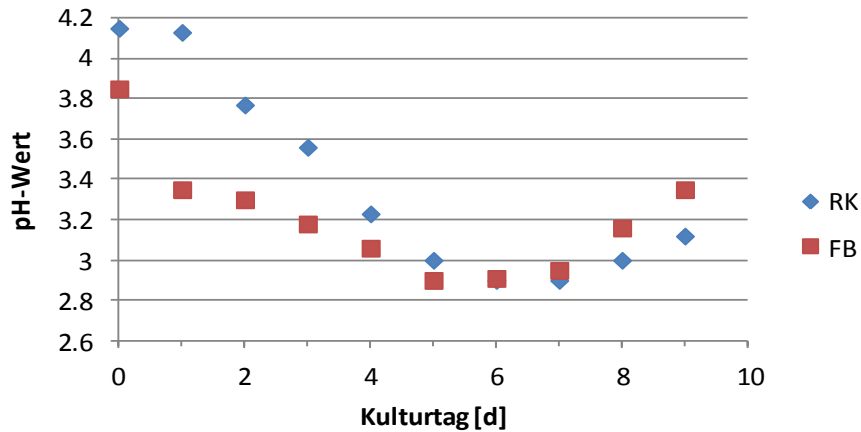
Als Wachstums- und Stoffwechselindikatoren wurden der Glucoseverbrauch (Abbildung 5-35)

sowie der pH-Wert bestimmt. Glucose war am dritten Kulturtag in beiden Bioreaktoren verbraucht – dieser Zeitpunkt fiel mit Veränderungen im Aromaprofil zusammen. Erkennbar war außerdem, dass im Rührkessel-Bioreaktor am zweiten Kulturtag mehr Glucose verbraucht wurde als im Festbett-Bioreaktor. Dies lässt darauf schließen, dass *F. rosea* im Rührkessel-Bioreaktor unter den Anfangsbedingungen schneller wuchs.



**Abbildung 5-35:** Glucoseabbau in Rührkessel- (RK) und Festbett-Bioreaktor (FB). Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium unter Standardbedingungen.

Der pH-Wert (Abbildung 5-36) sank in beiden Fermentern auf 2,9. Steigt der pH-Wert wieder, ist dies ein Indiz dafür, dass der Abbau von organischen Säuren stattfindet. Der pH-Anstieg fiel im Rührkessel mit einer makroskopisch sichtbaren Zelllyse zusammen. Es war auffällig, dass *F. rosea* zwar im Rührkessel Glucose schneller verbrauchte, im Festbett-Bioreaktor aber schneller das Medium ansäuerte. Dies könnte ein Hinweis auf eine Sauerstofflimitierung sein. Da der pH in beiden Kultursystemen auf den gleichen Wert sank, ist davon auszugehen, dass unterschiedliche Syntheseleistungen nicht auf einen pH-Effekt zurück zu führen waren. Ein niedriger pH-Wert wurde von Berger *et al.* (1986a) als Voraussetzung für die Bildung von Lactonen mit *F. rosea* beschrieben.



**Abbildung 5-36:** pH-Wert bei der Kultur von *F. rosea* mit Rapspresskuchen in Minimalmedium unter Standardbedingungen

Betrachtet man den Glucoseverbrauch und die Bildung der Gesamtflüchtigen, so verläuft die Kultur von *F. rosea* im Rührkessel-Bioreaktor schneller als im Festbett. Dies wurde auch bei der Untersuchung verschiedener Enzymproduzenten festgestellt (siehe Abschnitt 5.2). Die Bildung einzelner Aromastoffe, wie Methylbenzoat,  $C_5H_{12}O$  (3-Methylbutan-1-ol oder 1-Pentanol) und Methyl-3-methylbutanoat, überwiegt jedoch im Festbett-Bioreaktor. Dies demonstriert das Potential des neuartigen Kultursystems, das Produktspektrum von Basidiomyceten zu prägen.

## 6 Ausblick

Die Fähigkeit zahlreicher Basidiomyceten, auf dem industriellen Nebenstrom Rapspresskuchen Aromastoffgemische zu generieren, wurde im Rahmen eines *screenings* mit 32 Pilzstämmen demonstriert. Durch die Auswahl weiterer Nebenströme und Pilzstämme könnte das Produktspektrum vergrößert werden. Eine Maßstabsvergrößerung mit *F. rosea* ergab im Vergleich zu Schüttelkulturen ein olfaktorisch unverändertes Aromaspektrum. Die Quantifizierung ausgewählter Verbindungen, die aus der Bioreaktorabluft adsorbiert wurden, ermöglichte das Erstellen einer Bildungskinetik und bietet damit eine Basis für eine Ausbeuteoptimierung sowie das Verständnis des Aromametabolismus. Der Einsatz eines TDS-GC-MS für die Bestimmung der Bildungskinetik könnte das Potential der Aromaanalytik aus der Abluft erweitern. Auch eine Lösungsmittel-elution der Aromastoffe wäre möglich (Kaiser (2010)). Dieser könnten gängige analytische und präparative Verfahren folgen.

Da die Konzentration der untersuchten Verbindungen im unteren Milligrammbereich lag, besteht Bedarf einer Ausbeuteerhöhung für die Aromaproduktion mit *F. rosea*. Die Dauer einer Kultivierung müsste verkürzt werden, um eine wirtschaftliche Anwendung zu erleichtern. Dazu könnte der Einfluss grundlegender Betriebsparameter und Medienbestandteile untersucht werden, um das Verfahren anschließend mittels statistischer Versuchsplanung zu optimieren. Außerdem bietet das Identifizieren von Präkursoren und eine Supplementierung ebensolcher das Potential, die Produktbildung zu steigern. Die Verwendung einer höheren Nebenstromkonzentration scheint ebenfalls vielversprechend. Hierfür könnte auch ein Feststoff-Bioreaktor in Frage kommen. Die Produktgewinnung, die eine Hürde bei der Produktion von Aromen darstellt, könnte auf potentielle Zielkomponenten angepasst werden. Denkbar wäre die Kombination von *in situ*-Verfahren zur Extraktion aus dem Medium und eine Adsorption aus der Abluft. Eine gesteigerte Wertschöpfung wäre zusätzlich durch die Verwendung mehrerer Produkte eines Kulturansatzes vorstellbar. So könnten etwa parallel Aromastoffe, Enzyme, Zellprotein und Exopolymer verwertet werden.

Mit *P. farinosus* wurde 4-Vinylguajacol, ein Bestandteil von Raucharomen, produziert. Für eine weitere Aufreinigung wurden Ausgangsbedingungen geschaffen. Da bisher ausschließlich prokaryotische Ferulasäuredecarboxylasen charakterisiert wurden, verspricht das Enzym aus *P. farinosus* neuartige Eigenschaften, die für die kalte Produktion von Raucharoma genutzt werden könnten.

Der Vergleich von vier verschiedenen Enzymproduzenten in Festbett- und Rührkessel-Bioreaktor ergab durchgehend eine höhere Produktbildung im Rührkessel. Da die ausgewählten Stämme in Schüttelkultur gut kultivierbar sind, verfügen sie über eine gewisse Scherkrafttoleranz. Ein *screening*, welches auf die Ansprüche scherkraftsensitivere Organismen ausgelegt wurde, würde eine Basis für die Verwendung bisher wenig beachteter Arten schaffen. Für die Kultur solcher Organismen wäre der Festbett-Bioreaktor aussichtsreich. Auch eine Anpassung der Kulturbedingungen im Festbett-Bioreaktor auf die Bildung ausgewählter Aromastoffe scheint vielversprechend, wie durch die höhere Ausbeute einiger Produkte bei der Kultur von *F. rosea* deutlich wurde.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abraham, B. G. und R. G. Berger (1994). "Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies." Journal of Agricultural and Food Chemistry **42**(10): 2344-2348.
- Abraham, B. G., U. Krings und R. G. Berger (1993). "Dynamic extraction. An efficient screening procedure for aroma-producing Basidiomycetes." Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel **15**(5/6): 178-181.
- Adamu, H. A., S. Iqbal, K. W. Chan und M. Ismail (2012). "Biotransformation of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by *Lactobacillus farciminis*." African Journal of Biotechnology **11**(5): 1177-1184.
- Alasalvar, C., F. Shahidi und K. R. Cadwallader (2003). "Comparison of Natural and Roasted Turkish Tombul Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Volatiles and Flavor by DHA/GC/MS and Descriptive Sensory Analysis." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(17): 5067-5072.
- Anastasi, A., F. Spina, V. Prigione, V. Tigini, P. Giansanti und G. C. Varese (2010). "Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*." Bioresource Technology **101**(9): 3067-3075.
- Anderson, J. B. und L. M. Kohn (2007). Dikaryons, Diploids, and Evolution. Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications. J. Heitman, J. W. Kronstad and J. W. Taylor, ASM Press: 333-348.
- Anke, T., F. Oberwinkler, W. Steglich und G. Schramm (1977). "The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*." The Journal of Antibiotics **30**(10): 806-810.
- Assaf, S., Y. Hadar und C. G. Dosoretz (1995). "Biosynthesis of 13-hydroperoxylinoleate, 10-oxo-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol from linoleic acid by a mycelial-pellet homogenate of *Pleurotus pulmonarius*." Journal of Agricultural and Food Chemistry **43**(8): 2173-2178.
- Assaf, S., Y. Hadar und C. G. Dosoretz (1997). "1-Octen-3-ol and 13-hydroperoxylinoleate are products of distinct pathways in the oxidative breakdown of linoleic acid by *Pleurotus pulmonarius*." Enzyme and Microbial Technology **21**(7): 484-490.
- Baqueiro-Pena, I., G. Rodriguez-Serrano, E. Gonzalez-Zamora, C. Augur, O. Loera und G. Saucedo-Castaneda (2010). "Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*." Bioresource Technology **101**(12): 4721-4724.
- Barthelmebs, L., B. Lecomte, C. Divies und J. F. Cavin (2000). "Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator." Journal of Bacteriology **182**(23): 6724-6731.
- Becard, G. und Y. Piche (1989). "Fungal Growth Stimulation by CO<sub>2</sub> and Root Exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis." Applied and Environmental Microbiology **55**(9): 2320-2325.
- Belinky, P. A., S. Masaphy, D. Levanon, Y. Hadar und C. G. Dosoretz (1994). "Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulmonarius*." Applied Microbiology and Biotechnology **40**(5): 629-633.
- Belitz, H.-D., W. Grosch und P. Schieberle (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin Heidelberg, Springer
- Ben Aziz, A., S. Grossman, I. Ascarelli und P. Budowski (1971). "Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method." Phytochemistry **10**(7): 1445-1452.
- Berends, E., K. Scholtmeijer, H. A. Wosten, D. Bosch und L. G. Lugones (2009). "The use of mushroom-forming fungi for the production of N-glycosylated therapeutic proteins." Trends in Microbiology **17**(10): 439-443.
- Berger, R. G., K. Neuhäuser und F. Drawert (1986a). "Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. 6. Odorous Constituents of *Polyporus durus* (Basidiomycetes)." Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel **41c**: 963-970.

- Berger, R. G., K. Neuhäuser und F. Drawert (1986b). "Characterization of the odour principles of some basidiomycetes: *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*." Flavour and Fragrance Journal **1**(4-5): 181-185.
- Bettin, F., Q. Montanari, R. Calloni, T. Gaio, M. Silveira und A. Dillon (2009). "Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **36**(1): 1-9.
- Binninger, D. M., C. Skrzynia, P. J. Pukkila und L. A. Casselton (1987). "DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*." The EMBO Journal **6**(4): 835-840.
- Blight, M. M., J. A. Pickett, L. J. Wadhams und C. M. Woodcock (1995). "Antennal perception of oilseed rape *Brassica napus* (Brassicaceae), volatiles by the cabbage seed weevil *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera, Curculionidae)." Journal of Chemical Ecology **21**(11): 1649-1664.
- Bodizs, L., M. Titica, N. Faria, B. Srinivasan, D. Dochain und D. Bonvin (2007). "Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation." Journal of Process Control **17**(7): 595-606.
- Boerjesson, T. S., U. M. Stoellman und J. L. Schnuerer (1993). "Off-odorous compounds produced by molds on oatmeal agar: Identification and relation to other growth characteristics." Journal of Agricultural and Food Chemistry **41**(11): 2104-2111.
- Bohmann, A., R. Pörtner und H. Märkl (1995a). "Performance of a membrane-dialysis bioreactor with a radial-flow fixed bed for the cultivation of a hybridoma cell line." Applied Microbiology and Biotechnology **43**(5): 772-780.
- Bohmann, A., R. Pörtner und H. Märkl (1995b). "Performance of a radial-flow fixed bed bioreactor for the cultivation of a hybridoma cell line." Applied Microbiology and Biotechnology(43): 772-780.
- Bolla, K., S. V. S. S. L. Hima Bindu N, S. Burra und M. A. S. Charya (2011). "Effect of plant oils, surfactants and organic acids on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides of *Trametes* spp." Journal of Agricultural Technology **7**(4): 957-965.
- Brebu, M. und C. Vasile (2010). "Thermal Degradation of Lignin - A Review." Cellulose Chemistry And Technology **44**(9): 353-363.
- Bresinsky, A. und H. Besl (1985). Giftpilze. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Bresinsky, A., C. Körner, J. W. Kadereit, G. Neuhaus und U. Sonnewald (2008). Strasburger - Lehrbuch der Botanik, Spektrum Akademischer Verlag.
- Brijwani, K., A. Rigdon und P. V. Vadlani (2010). "Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing." Enzyme Research **2010**.
- Bugg, T. D., M. Ahmad, E. M. Hardiman und R. Rahmanpour (2011). "Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi." Natural Product Reports **28**(12): 1883-1896.
- Buller, A. H. R. (1931). Researches on fungi. London, Longmans, Green and Co.
- Capdevila, C., S. Moukha, M. Ghyczy, J. Theilleux, B. Gelie, M. Delattre, G. Corrieu und M. Asther (1990). "Characterization of Peroxidase Secretion and Subcellular Organization of *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 in the Presence of Various Soybean Phospholipid Fractions." Applied and Environmental Microbiology **56**(12): 3811-3816.
- Casselton, L. A. (2002). "Mate recognition in fungi." Heredity **88**(2): 142-147.
- Castanares, A., S. I. McCrae und T. M. Wood (1992). "Purification and properties of a feruloyl/coumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*." Enzyme and Microbial Technology **14**(11): 875-884.
- Cavin, J.-F., V. Dartois und C. Divies (1998). "Gene Cloning, Transcriptional Analysis, Purification, and Characterization of Phenolic Acid Decarboxylase from *Bacillus subtilis*." Applied and Environmental Microbiology **64**(4): 1466-1471.
- Cavin, J. F., L. Barthelmebs und C. Divies (1997). "Molecular characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional

- analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization." Applied and Environmental Microbiology **63**(5): 1939-1944.
- Chaisaena, W. (2009). Light effects on fruiting body development of wildtype in comparison to light-insensitive mutant strains of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, grazing of mites (*Tyrophagus putrescentiae*) on the strains and production of volatile organic compounds during fruiting body development Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology. Göttingen, Georg-August-University Göttingen. Doctor of Philosophy (PhD).
- Chang, S. (2005). "Witnessing the development of the mushroom industry in China." Acta Edulis Fungi **12**: 3-19.
- Charaya, M. U. und R. S. Mehrotra (1999). From ethnomycology to fungal biotechnology: a historical perspective. From Ethnomycology to Fungal Biotechnology: Exploiting Fungi from Natural Resources for Novel Products. J. Singh and K. R. Aneja, Springer: 1-10.
- Cheung, P. C. (2008). Mushrooms as Functional Foods, Wiley-Interscience.
- Chibata, I., K. Okumura, S. Takeyama und K. Kotera (1969). "Lentinacin: a new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*." Experientia **25**(12): 1237-1238.
- Child, J. J., C. Knapp und D. E. Eveleigh (1973). "Improved pH Control of Fungal Culture Media." Mycologia **65**(5): 1078-1086.
- Chiron, Nicolas, Michelot und Didier (2005). Odeurs des champignons: chimie et role dans les interactions biotiques - une revue. Paris, France, Elsevier.
- Chmiel, H. (2005). Bioprozesstechnik, Spektrum Akademischer Verlag.
- Cho, J.-H., S.-E. Lee, W.-B. Chang und J.-S. Cha (2006). "Agrobacterium-mediated Transformation of the Winter Mushroom, *Flammulina velutipes*." Mycobiology **34**(2): 104-107.
- Clark, T. A. und J. B. Anderson (2004). "Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: evolution in long-term culture." Genetics **167**(4): 1663-1675.
- Combet, E., J. Henderson, D. C. Eastwood und K. S. Burton (2006). "Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis." Mycoscience **47**(6): 317-326.
- Conesa, A., P. J. Punt und C. A. M. J. J. van den Hondel (2002). "Fungal peroxidases: molecular aspects and applications." Journal of Biotechnology **93**(2): 143-158.
- Couto, S. R. und M. A. Sanroman (2005). "Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production." Biochemical Engineering Journal **22**(3): 211-219.
- Couto, S. R. und M. A. Sanroman (2006). "Application of solid-state fermentation to food industry - A review." Journal of Food Engineering **76**(3): 291-302.
- Cui, F. J., Y. Li, Z. H. Xu, H. Y. Xu, K. Sun und W. Y. Tao (2006). "Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology." Bioresource Technology **97**(10): 1209-1216.
- Cullere, L., A. Escudero, J. Cacho und V. Ferreira (2004). "Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(6): 1653-1660.
- del Vecchio, C., V. Lettera, C. Pezzella, A. Piscitelli, G. Leo, L. Birolo und G. Sannia (2012). "Classical breeding in *Pleurotus ostreatus*: a natural approach for laccase production improvement." Biocatalysis and Biotransformation **30**(1): 78-85.
- Desai, S. S. und C. Nityanand (2011). "Microbial Laccases and their Applications: A Review." Asian Journal of Biotechnology **3**: 98-124.
- Dhitaphichit, P. und C. Pornsuriya (2005). "Protoplast fusion between *P. ostreatus* and *P. djamor*." Songklanakarin Journal of Science and Technology **27**(5): 975-982.
- Donaghy, J. A., P. F. Kelly und A. McKay (1999). "Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice." Journal of the Science of Food and Agriculture **79**(3): 453-456.
- Doolittle, M. und K. Reue (1998). Lipase and Phospholipase Protocols, Humana Press.
- Doran, P. M. (1995). Bioprocess Engineering Principles. Oxford, Elsevier Ltd.



- Driouch, H., R. Hansch, T. Wucherpfennig, R. Krull und C. Wittmann (2012). "Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles." Biotechnology and bioengineering **109**(2): 462-471.
- Du, S., A. Dang und F. Wang (1997). "Nutritional requirements and a submerged culture medium for the mycelial growth of *Flammulina velutipes*." Weishengwuxue Tongbao **24**(3): 134-137.
- Durand, A. (2003). "Bioreactor designs for solid state fermentation." Biochemical Engineering Journal **13**(2-3): 113-125.
- Eggert, C., U. Temp, J. F. D. Dean und K.-E. L. Eriksson (1996). "A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase." FEBS Letters **391**(1-2): 144-148.
- Eichlerová-Voláková, I. und L. Homolka (1997). "Variability of ligninolytic enzyme activities in basidiospore isolates of the fungus *Pleurotus ostreatus* in comparison with that of protoplast-derived isolates." Folia Microbiologica **42**(6): 583-588.
- Eichlerová, I. und L. Homolka (1999). "Preparation and crossing of basidiospore-derived monokaryons – a useful tool for obtaining laccase and other ligninolytic enzyme higher-producing dikaryotic strains of *Pleurotus ostreatus*." Antonie van Leeuwenhoek **75**(4): 321-327.
- Eisele, N., D. Linke, K. Bitzer, S. Na'amnieh, M. Nimtz und R. G. Berger (2011). "The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*." Bioresource Technology **102**(3): 3316-3321.
- Elamayerhi, H. (1975). "Mechanisms of pellet formation of *Aspergillus niger* with additives." Journal of Fermentation Technology **53**(10): 722-729.
- Elamayerhi, H. und J. M. Scharer (1973a). "Physiological studies on *Aspergillus niger* fermentation with polymer additives." Journal of general and applied microbiology **19**(5): 277–282.
- Elamayerhi, H., J. M. Scharer und M. Moo-Young (1973b). "Effects of polymer additives on fermentation parameters in a culture of *A. niger*." Biotechnology and bioengineering **15**: 845–859.
- Elisashvili, V., E. Kachlishvili und M. Penninckx (2008). "Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(11): 1531-1538.
- Enayatzamir, K., H. A. Alikhani und S. Rodríguez Couto (2009). "Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor." Journal of Hazardous Materials **164**(1): 296-300.
- Erkel, G. und T. Anke (1997). Products from Basidiomycetes. Biotechnology. H.-J. Rehm and G. Reed, Wiley-VCH Verlag GmbH: 489-533.
- Erkel, G., T. Anke, R. Velten, A. Gimenez und W. Steglich (1994). "Hyphodontal, a new antifungal inhibitor of reverse transcriptases from *Hyphodontia* sp. (*Corticaceae*, *Basidiomycetes*)." Zeitschrift für Naturforschung C **49**(9-10): 561-570.
- Eyal, J. (1991). Mushroom mycelium grown in submerged culture - potential food applications. Biotechnology and Food Ingredients. I. Goldberg and R. Williams, Springer: 31-64.
- Fäldt, J., M. Jonsell, G. Nordlander und A.-K. Borg-Karlson (1999). "Volatiles of Bracket Fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and Their Functions as Insect Attractants." Journal of Chemical Ecology **25**(3): 567-590.
- Faraco, V., C. Ercole, G. Festa, P. Giardina, A. Piscitelli und G. Sannia (2008). "Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*." Applied Microbiology and Biotechnology **77**(6): 1329-1335.
- Fassnacht, D. (2001). Fixed-Bed Reactors for the Cultivation of Animal Cells. Düsseldorf, VDI-Verlag.
- Faulds, C. B. und G. Williamson (1994). "Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose." Microbiology **140**(4): 779-787.

- Fazenda, M. L., L. M. Harvey und B. McNeil (2010). "Effects of dissolved oxygen on fungal morphology and process rheology during fed-batch processing of *Ganoderma lucidum*." Journal of Microbiology and Biotechnology **20**(4): 844-851.
- Fedorova, L. N. und A. N. Shivrina (1974). "Proteases with rennet activity in cultures of higher fungi." Mikologiya i Fitopatologiya **8**(1): 22-25.
- Feijoo, G., C. Dosoretz und J. M. Lema (1995). "Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in a packed bed bioreactor operated in semi-continuous mode." Journal of Biotechnology **42**(3): 247-253.
- Ferreira, V., M. Aznar, L. R. und J. Cacho (2001). "Quantitative Gas Chromatography-Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract. Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(10): 4818-4824.
- Fowler, B. (2001). Ice man: uncovering the life and times of a prehistoric man found in an alpine glacier, University of Chicago Press.
- Fraga, B. M. (1990). "Natural sesquiterpenoids." Natural Product Reports **7**(1): 61-84.
- Frank, N., M. Dubois, T. Goldmann, A. Tarres, E. Schuster und F. Robert (2010). "Semi-quantitative analysis of 3-butenyl isothiocyanate to monitor an off-flavor in mustard seeds and glycosinolates screening for origin identification." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(6): 3700-3707.
- Fukami, K., S. Ishiyama, H. Yaguramaki, T. Masuzawa, Y. Nabeta, K. Endo und M. Shimoda (2002). "Identification of Distinctive Volatile Compounds in Fish Sauce." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(19): 5412-5416.
- Gallois, A., B. Gross, D. Langlois, H.-E. Spinnler und P. Brunerie (1990). "Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic Basidiomycetes." Mycological Research **94**(4): 494-504.
- Germerdonk, R. und H.-P. Ohlinger (1987). "Bioreaktor für die Fermentation in agglomeratbildenden, scherempfindlichen Kulturen." Chemie Ingenieur Technik **59**(3): 244-245.
- Gianfreda, L., F. Xu und J.-M. Bollag (1999). "Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes." Bioremediation Journal **3**(1): 1-25.
- Gomes, N., J. Teixeira und I. Belo (2012). "Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for  $\gamma$ -decalactone production from methyl ricinoleate." Biotechnology Letters **34**(4): 649-654.
- Govender, S., V. L. Pillay und B. Odhav (2010). "Nutrient manipulation as a basis for enzyme production in a gradostat bioreactor." Enzyme and Microbial Technology **46**(7): 603-609.
- Grimm, L., S. Kelly, R. Krull und D. Hempel (2005). "Morphology and productivity of filamentous fungi." Applied Microbiology and Biotechnology **69**(4): 375-384.
- Grimrath, A., P. Berends, S. Rabe, R. Berger und D. Linke (2011). "Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*." European Food Research and Technology **232**(3): 415-424.
- Gutierrez, A., L. Caramelo, A. Prieto, M. J. Martinez und A. T. Martinez (1994). "Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*." Applied and Environmental Microbiology **60**(6): 1783-1788.
- Hanssen, H. P. und W. R. Abraham (1987). "Odoriferous compounds from liquid cultures of *Gloeophyllum odoratum* and *Lentinellus cochleatus* (Basidiomycotina)." Flavour and Fragrance Journal **2**(4): 171-174.
- Harney, S. K. (1989). Ecological and physiological aspects of *Paecilomyces farinosus* (Holm ex S. F. Gray) Brown & Smith : a potential biological control agent of spruce budworm. Department of Biology. Montreal, Concordia University. Master.
- Hass, V. C. und R. Pörtner (2011). Praxis der Bioverfahrenstechnik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Hatakeyama, H., E. Hayashi und T. Haraguchi (1977). "Biodegradation of poly(3-methoxy-4-hydroxy styrene)." Polymer **18**(8): 759-763.

- Hatakka, A. (2001). Biodegradation of lignin Lignin, Humic Substances and Coal. M. Hofrichter and A. Steinbüchel, Wiley-VCH: 129-180.
- Hautzel, R., H. Anke und W. S. Sheldrick (1990). "Mycenon, a new metabolite from a *Mycena* species TA 87202 (basidiomycetes) as an inhibitor of isocitrate lyase." The Journal of Antibiotics **43**(10): 1240-1244.
- Henzler, H. J. und M. Schedel (1991). "Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures." Bioprocess and Biosystems Engineering **7**(3): 123-131.
- Hess, J., C. Leitner, C. Galhaup, K. D. Kulbe, B. Hinterstoisser, M. Steinwender und D. Haltrich (2002). "Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*." Applied Biochemistry and Biotechnology **98-100**: 229-241.
- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, H. Thorsten Lumbsch, F. o. Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. McLaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L. A. Castlebury, P. W. Crous, Y.-C. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humber, K. D. Hyde, J. E. Ironside, U. Koljalg, C. P. Kurtzman, K.-H. Larsson, R. Lichtwardt, J. Longcore, J. Miadlikowska, A. Miller, J.-M. Moncalvo, S. Mozley-Standridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux, L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schüßler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C. Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiss, M. M. White, K. Winka, Y.-J. Yao und N. Zhang (2007). "A higher-level phylogenetic classification of the Fungi." Mycological Research **111**(5): 509-547.
- Hiscox, J., C. Hibbert, H. J. Rogers und L. Boddy (2010). "Monokaryons and dikaryons of *Trametes versicolor* have similar combative, enzyme and decay ability." Fungal Ecology **3**(4): 347-356.
- Hjort, C. (2007). Industrial enzyme production for food applications. Novel enzyme technology for applications. R. Rastall. Cambridge, Woodhead Publishing Ltd: 43-57.
- Hölker, U., M. Höfer und J. Lenz (2004). "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi." Applied Microbiology and Biotechnology **64**(2): 175-186.
- Homolka, L., I. Voláková und F. Nerud (1995). "Variability of enzymatic activities in ligninolytic fungi *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus tigrinus* after protoplasting and UV-mutagenization." Biotechnology Techniques **9**(3): 157-162.
- Huang, Z., L. Dostal und J. P. Rosazza (1993). "Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*." Applied and Environmental Microbiology **59**(7): 2244-2250.
- Hulme, M. A. und D. W. Stranks (1970). "Induction and the Regulation of Production of Cellulase by Fungi." Nature **226**(5244): 469-470.
- Humfeld, H. (1948). "The Production of Mushroom Mycelium (*Agaricus campestris*) in Submerged Culture." Science: 373.
- Humphrey, M., S. Pearce und B. Skill (1990). Biotransformation of coconut fat to methyl ketones. A commercial scale solid state fermentation. Abstracts, Symposium, Bioformation of flavours, London, Royal society of chemistry.
- Iversen, S. L. und M. H. Jørgensen (1995). "Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth." Biotechnology Techniques **9**(8): 573-576.
- Jaeger, A. und C. Wandrey (1990). "Production of lignin peroxidases from white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* in a fixed-bed loop reactor." Forum Mikrobiologie **13**(9): 410-417.
- Janssens, L., H. L. De Pooter, N. M. Schamp und E. J. Vandamme (1992). "Production of flavours by microorganisms." Process Biochemistry **27**(4): 195-215.
- Janusz, G., J. Rogalski, M. Barwinska und J. Szczodrak (2006). "Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by *Rhizoctonia praticola*." Polish Journal of Microbiology **55**(4): 309-319.

- Jones, P, Shahab, A. B, Trinci, J. A. P, Moore und D (1988). Effect of polymeric additives, especially Junlon and hostacerin, on growth of some basidiomycetes in submerged culture. London, Royaume-Uni, Cambridge University Press.
- Jong, S. C. und J. M. Birmingham (1993). Mushrooms as a source of natural flavor and aroma compounds. Mushroom Biology and mushroom products. S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu. Hong Kong, The Chinese University Press: 345-366.
- Kaiser, R. (2010). Scent of the Vanishing Flora Helvetica Chimica Acta.
- Kapfer, G. F., R. G. Berger und F. Drawert (1989). "Production of 4-decanolide by semicontinuous fermentation of *Tyromyces sambucus*." Biotechnology Letters **11**(8): 561-566.
- Karrasch, S. (2009). Personal communication: Screening for beta-carotin degrading basidiomycetes, Leibniz Universität Hannover, Institut für Lebensmittelchemie.
- Kaup, B. A., K. Ehrich, M. Pescheck und J. Schrader (2008). "Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example." Biotechnology and bioengineering **99**(3): 491-498.
- Kavanagh, F., A. Hervey und W. J. Robbins (1951). "Antibiotic Substances From Basidiomycetes: VIII. *Pleurotus Multilus* (Fr.) Sacc. and *Pleurotus Passeckerianus* Pilat." Proceedings of the National Academy of Sciences USA **37**(9): 570-574.
- Kawai, M. und N. Mukai (1972). Fermentative manufacture of basidiomycetes protease. JP, Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd. **JP 47034953**: 5.
- Khanahmadi, M., D. A. Mitchell, M. Beheshti, R. Roostaazad und L. R. Sanchez (2006). "Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flow pattern." Chemical Engineering Science **61**(8): 2675-2687.
- Kim, D. H., B. K. Yang, S. C. Jeong, J. B. Park, S. P. Cho, S. Das, J. W. Yun und C. H. Song (2001). "Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*." Biotechnology Letters **23**(7): 513-517.
- Kim, Y.-M. und H.-G. Song (2009). "Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in phthalate degradation." The Journal of Microbiology **47**(4): 420-424.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon und D. W. Winter (2008). Dictionary of the Fungi, CABI.
- Kirk, T. K. und D. Cullen (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. R. A. Young and M. Akhtar. New York, John Wiley and Sons: 273–308.
- Knauseder, F. und E. Brandl (1976). "Pleuromutilins. Fermentation, structure and biosynthesis." The Journal of Antibiotics **29**(2): 125-131.
- Ko, J. A., B. H. Lee, J. S. Lee und H. J. Park (2008). "Effect of UV-B exposure on the concentration of vitamin D<sub>2</sub> in sliced shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and white button mushroom (*Agaricus bisporus*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(10): 3671-3674.
- Krings, U., D. S. Banavara und R. G. Berger (2003). "Thin layer high vacuum distillation to isolate the flavor of high-fat food." European Food Research and Technology **217**(1): 70-73.
- Krings, U. und R. G. Berger (1998). "Biotechnological production of flavours and fragrances." Applied Microbiology and Biotechnology **49**(1): 1-8.
- Krings, U., M. Hinz und R. G. Berger (1996). "Degradation of [2H]phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*." Journal of Biotechnology **51**(2): 123-129.
- Krings, U., S. Pilawa, C. Theobald und R. G. Berger (2001). "Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* - elucidation of metabolic pathways using [5-2H]-ferulic acid." Journal of Biotechnology **85**(3): 305-314.
- Krishna, C. (2005). "Solid-state fermentation systems - an overview." Critical Reviews in Biotechnology **25**(1-2): 1-30.
- Krügenger, S., U. Krings, H. Zorn und R. G. Berger (2010). "A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation." Bioresource Technology **101**(2): 457-462.

- Kudryavtseva, N., E. Gvozdeva, A. Sof'in und T. Valueva (2010). "The influence of cultural medium composition on the proteolytic enzyme secretion of fungus *Rhizoctonia solani*." Applied Biochemistry and Microbiology **46**(3): 324-330.
- Kudryavtseva, O., Y. Dunaevsky, O. Kamzolkin und M. Belozersky (2008). "Fungal proteolytic enzymes: Features of the extracellular proteases of xylophilic basidiomycetes." Microbiology **77**(6): 643-653.
- Kwon, M. S., T. Kato, D. T. und E. Y. Park (2005). "Application of a radialflow bioreactor in the production of beta1,3-N-cetylglucosaminyltransferase-2 fused with GFPuv using stably transformed insect celllines." Biotechnology and Applied Biochemistry(42): 41-46.
- Lambert, P. W. (1983). Industrial Enzyme Production. The Filamentous Fungi. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristiansen. London, U. K., Edward Arnold. **IV, Fungal Technology**: 210 - 237.
- Landete, J., H. Rodríguez, J. Curiel, B. de las Rivas, J. Mancheño und R. Muñoz (2010). "Gene cloning, expression, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus brevis* RM84." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **37**(6): 617-624.
- Leatham, G. F. und M. A. Stahmann (1987). "Effect of light and aeration on fruiting of *Lentinula edodes*." Transactions of the British Mycological Society **88**(1): 9-20.
- Lee, K. M., S. Y. Lee und H. Y. Lee (1999). "Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor." Journal of Bioscience and Bioengineering **88**(6): 646-650.
- Lemmer, H., A. Zaglauer und G. Metzner (1997). "Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 1: Physico-chemical and biological characterization." Water Research **31**(8): 1897-1902.
- Lenz, J. und U. Hölker (2004). "Trickle-film processing: an alternative for producing fungal enzymes." BIOforum Europe(6): 55-57.
- Lewandowski, G. A., P. M. Armenante und D. Pak (1990). "Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus." Water Research **24**(1): 75-82.
- Liers, C., C. Bobeth, M. Pecyna, R. Ullrich und M. Hofrichter (2010). "DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes." Applied Microbiology and Biotechnology **85**(6): 1869-1879.
- Lindequist, U., T. H. Niedermeyer und W. D. Julich (2005). "The pharmacological potential of mushrooms." Evid Based Complement Alternat Med **2**(3): 285-299.
- Link, H. und D. Weuster-Botz (2011). 2.11 - Medium Formulation and Development. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). M.-Y. Murray. Burlington, Academic Press: 119-134.
- Lomascolo, A., C. Stentelaire, M. Asther und L. Lesage-Meessen (1999). "Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry." Trends in biotechnology **17**(7): 282-289.
- Manning, K. (1986). Food value and chemical composition. The biology and technology of the cultivated mushroom. P. B. Flegg, D. M. Spencer und D. A. Wood, John Wiley & Sons Inc: 211.
- Marjanovic, D. (2007). "Zellkultivierung mit sanften Wellen." Labo **3**: 64-67.
- Mathew, S. und T. E. Abraham (2006). "Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid." Critical Reviews in Microbiology **32**(3): 115-125.
- Mehrotra, B. und N. Krishna (1966). "Amylase from Indian strains of moulds." Annual National Academy of Sciences of India: 86.
- Metz, B. und N. W. F. Kossen (1977). "The growth of molds in the form of pellets—a literature review." Biotechnology and bioengineering **19**(6): 781-799.
- Meyer, V. (2008). "Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends." Biotechnology Advances **26**(2): 177-185.
- Miles, P. G. (1992). Biological background for mushroom breeding. Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. S. Chang, J. A. Buswell und P. G. Miles, CRC Press: 37-64.
- Miles, P. G. und S. Chang (1997). Mushroom Biology: Concise Basics And Current Developments, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Moore-Landecker, E. (1996). Fundamentals of the Fungi Benjamin Cummings.

- Moreira, M. T., C. Palma, G. Feijoo und J. M. Lema (1998). "Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors." Journal of Biotechnology **66**(1): 27-39.
- Morozova, O., G. Shumakovich, S. Shleev und Y. Yaropolov (2007). "Laccase-mediator systems and their applications: A review." Applied Biochemistry and Microbiology **43**(5): 523-535.
- Mosciano, G. (1993). Perfumer & Flavorist **18**(2): 38.
- Mosciano, G. (1994). "The Organoleptic Characteristics of Flavor Materials." Perfumer & Flavorist **19**(3): 51.
- Mosciano, G. (2001). Perfumer & Flavorist **26**(5): 68.
- Nakasone, K. K., S. W. Peterson und S.-C. Jong (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. G. M. Mueller, G. F. Bills and M. S. Foster. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 37-47.
- Nazareth, S. und S. Mavinkurve (1986). "Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani* (Mart.) Sacc." Canadian Journal of Microbiology **32**(6): 494-497.
- Nevalainen, K. M. H., G. K. George und K. A. Dilip (2001). Strain improvement in filamentous fungi-an overview. Applied Mycology and Biotechnology, Elsevier. **Volume 1**: 289-304.
- Noel, T. und J. Labarere (1994). "Homologous transformation of the edible basidiomycete *Agrocybe aegerita* with the URA1 gene: characterization of integrative events and of rearranged free plasmids in transformants." Current Genetics **25**(5): 432-437.
- Ogawa, K., T. Yamazaki, T. Hasebe, S. Kajiwara, A. Watanabe, Y. Asada und K. Shishido (1998). "Molecular breeding of the basidiomycete *Coprinus cinereus* strains with high lignin-decolorization and -degradation activities using novel heterologous protein expression vectors." Applied Microbiology and Biotechnology **49**(3): 285-289.
- Ohga, S. und Y. Kitamoto (1997). "XVI. Future of mushroom production and biotechnology." Food Reviews International **13**(3): 461-469.
- Olsvik, E. S. und B. Kristiansen (1992). "Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth." Biotechnology and bioengineering **40**(11): 1293-1299.
- Onions, A. H. S. und D. Smith (1994). The Preservation and Maintenance of Living Fungi, CAB International.
- Pacioni, G. und G. Frizzi (1978). "*Paecilomyces farinosus*, the conidial state of *Cordyceps memorabilis*." Canadian Journal of Botany **56**: 391-394.
- Pagot, Y., A. Le Clainche, J. M. Nicaud, Y. Wache und J. M. Belin (1998). "Peroxisomal beta-oxidation activities and gamma-decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*." Applied Microbiology and Biotechnology **49**(3): 295-300.
- Panda, T. und G. N. Rameshaiah (2009). "Application of Actinobacterial and Fungal Morphology on the Design of Operating Strategies in Bioprocess Development." The Open Biotechnology Journal **3**: 31-39.
- Pandey, A., C. R. Soccol und C. Larroche (2008). Current Developments in Solid-state Fermentation, Springer.
- Papaspnyridi, L.-M., P. Katapodis, Z. Gonou-Zagou, E. Kapsanaki-Gotsi und P. Christakopoulos (2011). "Growth and biomass production with enhanced  $\beta$ -glucan and dietary fibre contents of *Ganoderma australe* ATHUM 4345 in a batch-stirred tank bioreactor." Engineering in Life Sciences **11**(1): 65-74.
- Pardo, A. G. (1996). "News & Notes: Effect of Surfactants on Cellulase Production by *Nectria catalinensis*." Current Microbiology **33**(4): 275-278.
- Park, S.-E., M.-H. Li, J.-S. Kim, K. Sapokota, J.-E. Kim, B.-S. Choi, Y.-H. Yoon, J.-C. Lee, H.-H. Lee, C.-S. Kim und S.-J. Kim (2007). "Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia." Bioscience Biotechnology & Biochemistry **71**: 2214-2222.
- Pavko, A. (2001). "The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter." Food Technology and Biotechnoloy **39**(3): 237-252.

- Peberdy, J. F. und H. M. Fox (1993). Protoplast technology and edible mushrooms. Genetics and breeding of edible mushrooms. S. T. Chang, J. A. Buswell and P. G. Milse. New York, Gordon and Breach Science Publishers: 125–155.
- Penalva, M. A. und H. N. Arst, Jr. (2002). "Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts." Microbiology and Molecular Biology Reviews **66**(3): 426-446, table of contents.
- Penalva, M. A., R. T. Rowlands und G. Turner (1998). "The optimization of penicillin biosynthesis in fungi." Trends in biotechnology **16**(11): 483-489.
- Peng, M., N. K. Singh und P. A. Lemke (1992). "Recovery of recombinant plasmids from *Pleurotus ostreatus* transformants." Current Genetics **22**(1): 53-59.
- Petersen, L. (2011). Minimierung der Produktinhibierung bei enzymatischen Hydrolyseprozessen. Der Naturwissenschaftlichen Fakultät. Hannover, Leibniz Universität Hannover. Master of Science.
- Pörtner, R., O. B. Platas, D. Fassnacht, D. Nehring, P. Czermak und H. Märkl (2007). "Fixed Bed Reactors for the Cultivation of Mammalian Cells: Design, Performance and Scale-Up." The Open Biotechnology Journal(1): 41-46.
- Pörtner, R., M. Seemuk, R. C. Schlothauer und D. Elsser (2004). "Anaerobe Kultivierung von *Lactococcus lactis* im Festbettreaktor." Chemie Ingenieur Technik **76**(10): 1599-1602.
- Präve, P., U. Faust, W. Sittig und D. A. Sukatsch (1994). "Handbuch der Biotechnologie ": 289.
- Prostenik, M., I. Burcar, A. Castek, Ä. Cosovic, J. Golem, Z. Jandric, K. Kljaic und V. Ondrusek (1978). "Lipids of higher fungi. III. The fatty acids and 2-hydroxy fatty acids in some species of Basidiomycetes." Chemistry and Physics of Lipids **22**(2): 97-103.
- Puniya, A. K., F. Zadrazil und K. Singh (1994). "Influence of gaseous phases on lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*." Bioresource Technology **47**(2): 181-183.
- Rabenhorst, J. und I. Gatfield (2000). Process for the production of gamma-decalactone. **EP0997533**.
- Rahouti, M., F. Seigle-Murandi, R. Steiman und K. E. Eriksson (1989). "Metabolism of Ferulic Acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*." Applied and Environmental Microbiology **55**(9): 2391-2398.
- Ramirez, L., L. M. Larraya und A. G. Pisabarro (2000). "Molecular tools for breeding basidiomycetes." International Microbiology **3**: 147-152.
- Raper, J. R. (1966). Genetics of sexuality in higher fungi, Ronald Press New York.
- Rau, U., E. Gura, E. Olszewski und F. Wagner (1992). "Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **9**(1): 19-25.
- Raven, P. H., R. F. Evert und S. E. Eichhorn (2006). Biologie der Pflanzen. Berlin, Walter de Gruyter.
- Reese, E. T. (1980). "Inactivation of cellulase by shaking and its prevention by surfactants." Journal of applied biochemistry **2**: 36-39.
- Rege, B. D., J. P. Kao und J. E. Polli (2002). "Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers." European Journal of Pharmaceutical Sciences **16**(4-5): 237-246.
- Rodriguez-Leon, J. A., C. R. Soccol, A. Pandey und D. E. Rodriguez (2008). Kinetics of solid-state fermentation. Current Developments in Solid-state Fermentation. A. Pandey, C. R. Soccol and C. Larroche, Springer: 48-73.
- Rodriguez, H., J. M. Landete, J. A. Curiel, B. de Las Rivas, J. M. Mancheno und R. Munoz (2008). "Characterization of the p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748(T)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(9): 3068-3072.
- Romaine, C. P. (2005). "Transgenic breeding of *Agaricus bisporus*: The next frontier." Acta Edulis Fungi **12**: 174-184.
- Romaine, C. P. und X. Chen (2002). Fruiting body tissue cell method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of filamentous fungi: 54 pp.
- Romaine, C. P., C. D. Schlaghauer und B. M. Woolston (2011). Agrobacterium-mediated transformation of filamentous fungi and culture methods for their utilization and containment: 82pp.

- Romero, M. C., M. I. Urrutia, H. E. Reinoso und M. M. Kiernan (2010). "Benzo[a]pyrene degradation by soil filamentous fungi." Journal of Yeast and Fungal Research **1**(2): 25-29.
- Rösecke, J. und W. A. König (2000a). "Odorous compounds from the fungus *Gloeophyllum odoratum*." Flavour and Fragrance Journal **15**(5): 315-319.
- Rösecke, J., M. Pietsch und W. A. König (2000b). "Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes." Phytochemistry **54**(8): 747-750.
- Rosenberg, I. M. (2001). Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques. Berlin, Springer.
- Rühl, M. (2011). Personal communication: cultivation of *Coprinopsis cinereus* in bioreactor scale. Göttingen, Institute of Forest Botany, Georg August University of Göttingen.
- Rühl, M., S. Kilaru, M. Navarro-González, P. J. Hoegger, A. Kharazipour und U. Kües (2007). Production of laccase and other enzymes for the wood industry. Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts. U. Kües, Universitätsverlag Göttingen: 469-507.
- Rühl, M. und U. Kües (2009). "Automated image analysis to observe pellet morphology in liquid cultures of filamentous fungi such as the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*." Current Trends in Biotechnology and Pharmacy **3**: 241-253.
- Sabotic, J., T. Trcek, T. Popovic und J. Brzin (2007). "Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity." Journal of Biotechnology **128**(2): 297-307.
- Sadava, D., G. H. Orians, H. C. Heller, D. Hillis und M. R. Berenbaum (2011). Biologie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Sagara, N. (1975). "Ammonia fungi – a chemoecological grouping of terrestrial fungi." Contributions of the Biology Lab of Kyoto **24**: 205–276.
- Sakurai, T. (1992). "Anaerobic reactions of *Rhus vernicifera* laccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate(II)." Biochemical Journal **284** ( Pt 3): 681-685.
- Sampedro, I., T. Cajthaml, S. Marinari, M. Petruccioli, S. Grego und A. D'Annibale (2009). "Organic matter transformation and detoxification in dry olive mill residue by the saprophytic fungus *Paecilomyces farinosus*." Process Biochemistry **44**(2): 216-225.
- Sanz, C., D. Ansorena, J. Bello und C. n. Cid (2001). "Optimizing Headspace Temperature and Time Sampling for Identification of Volatile Compounds in Ground Roasted Arabica Coffee." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(3): 1364-1369.
- Sato, T., K. Yaegashi, S. Ishii, T. Hirano, S. Kajiwara, K. Shishido und H. Enei (1998). "Transformation of the Edible Basidiomycete *Lentinus edodes* by Restriction Enzyme-Mediated Integration of Plasmid DNA." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **62**(12): 2346-2350.
- Scheibner, M., B. Hülsdau, K. Zelena, M. Nimtz, L. de Boer, R. Berger und H. Zorn (2008). "Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade  $\beta$  -carotene." Applied Microbiology and Biotechnology **77**(6): 1241-1250.
- Schimanski, S., U. Krings und R. G. Berger (2012). "Lösungsmittelfreie Extraktion und Thermodesorptions-Analyse von Aromastoffen." Lebensmittelchemie **66**(3): 61.
- Schmidt, G. (2012). Speisepilze als neue Quelle für Oxidoreduktasen zum Einsatz in der Lebensmittelindustrie. Institut für Lebensmittelchemie. Hannover, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- Schrader, J. (2007). Microbial Flavour Production. Flavours and Fragrances. R. G. Berger, Springer: 507-574.
- Serra, S., C. Fuganti und E. Brenna (2005). "Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances." Trends in Biotechnology **23**(4): 193-198.
- Shahriarinnour, M., M. N. A. Wahab, R. Mohamad, S. Mustafa und A. B. Ariff (2011). "Effect of medium composition and cultural condition on cellulase production by *Aspergillus terreus*." African Journal of Biotechnology **10**(38): 7459-7467.
- Sheldon, M. S. und H. J. Small (2005). "Immobilisation and biofilm development of *Phanerochaete chrysosporium* on polysulphone and ceramic membranes." Journal of Membrane Science **263**: 30-37.
- Shi, Z., J. Q. Wilkinson, D. S. Walters und C. P. Romaine (2012). Regulatory element for heterologous protein production in the fruiting body of filamentous fungi: 39pp.



- Shin, H. H. und H. S. Choi (1998). "Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*." The Journal of Microbiology **36**(1): 20-25.
- Shinozawa, S., K. Tsutsui und T. Oda (1979). "Enhancement of the antitumor effect of illudin S by including it into liposomes." Cellular and Molecular Life Sciences **35**(8): 1102-1103.
- Shraddha, R. Shekher, S. Sehgal, M. Kamthania und A. Kumar (2011). "Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications." Enzyme Research **2011**: 11.
- Silva, S. O., S. M. G. d. Costa und E. Clemente (2002). "Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., substrates and residue after cultivation." Brazilian Archives of Biology and Technology **45**: 531-535.
- Singh, J. und K. R. Aneja (1999). From Ethnomycology to Fungal Biotechnology: Exploiting Fungi from Natural Resources for Novel Products, Springer.
- Singh, S. K., G. Sczakas, C. R. Soccol und A. Pandey (2008). Production of enzymes by solid-state fermentation. Current developments in solid-state fermentation. A. Pandey, C. R. Soccol and C. Larroche, Springer: 183-204.
- Singh, V. (1999). "Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation." Cytotechnology **30**(1): 149-158.
- Smith, D. und J. Kolkowski (1996). Fungi. Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry. J. Hunter-Cevera and A. Belt. San Diego, Academic Press: 101-132.
- Solomon, E. I., U. M. Sundaram und T. E. Machonkin (1996). "Multicopper Oxidases and Oxygenases." Chemical Reviews **96**(7): 2563-2606.
- Song, C.-H., C.-H. Lee, J.-H. Ahn, B.-S. Hong und H.-C. Yang (1995). "Standardization of chemically defined medium for the production of mycelium and basidiocarps in *Flammulina velutipes*." Korean Journal of Mycology **23**: 53-60.
- Song, C. H., K. Y. Cho und N. G. Nair (1987). "A Synthetic Medium for the Production of Submerged Cultures of *Lentinus edodes*." Mycologia **79**(6): 866-876.
- Sonnleitner, B. und H. Chmiel (2005). Wachstum: Kinetik und Prozessführung. Bioprozesstechnik. H. Chmiel, Spektrum Akademischer Verlag.
- Spaether, S. (2000). Zellkultur von Shiitake : Schwefelmetabolismus und Lentinsäurebildung im Speisepilz *Lentinus edodes*. Institut für Lebensmittelchemie. Hannover, Leibniz Universität Hannover. Doktor der Naturwissenschaften.
- Sprecher, E. (1959). "Über die Guttation bei Pilzen." Planta **53**(6): 565-574.
- Stanbury, P. F. (1995). Principles of Fermentation Technology. Oxford, Butterworth-Heinemann Publications.
- Storhas, W. (2000). Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, Springer.
- Stretton, S. und A. E. Goodman (1998). "Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms." Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology **73**(1): 79-85.
- Täffner, T., M. Schlegelmilch, K. Kleeberg, S. Schindler, D. Genske, U. Krings, R. Stegmann, R. G. Berger und B. Niemeyer (2011). "Comparison of Analytic and Sensoric Methods on Evaluation of the Performance according to Odor Reduction." Chemie Ingenieur Technik **83**(6): 840-850.
- Taupp, D. E., M. Nimtz, R. G. Berger und H. Zorn (2008). "Stress response of *Nidula niveo-tomentosa* to UV-A light." Mycologia **100**(4): 529-538.
- Tavares, A. P., M. A. Coelho, M. S. Agapito, J. A. Coutinho und A. M. Xavier (2006). "Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design." Applied Biochemistry and Biotechnology **134**(3): 233-248.
- Téllez-Téllez, M., F. Fernández, A. Montiel-González, C. Sánchez und G. Díaz-Godínez (2008). "Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation." Applied Microbiology and Biotechnology **81**(4): 675-679.
- Tepwong, P., A. Giri und T. Ohshima (2012). "Effect of mycelial morphology on ergothioneine production during liquid fermentation of *Lentinula edodes*." Mycoscience **53**(2): 102-112.

- Theander, O., P. Aman, G. E. Miksche und S. Yasuda (1977). "Carbohydrates, polyphenols, and lignin in seed hulls of different colors from turnip rapeseed." Journal of Agricultural and Food Chemistry **25**(2): 270-273.
- TheGoodScentsCompany. (2012). Retrieved 15.06.2012, from <http://www.thegoodscentscompany.com>.
- Tinoco, R., A. Acevedo, E. Galindo und L. Serrano-Carreón (2011). "Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **38**(4): 531-540.
- Tressl, R., D. Bahri und K. H. Engel (1982). "Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **30**(1): 89-93.
- Tribak, M., J. A. Ocampo und I. Garcia-Romera (2002). "Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*." Mycologia **94**(3): 404-410.
- Tsukihara, T., Y. Honda, R. Sakai und T. Watanabe (2006). "Exclusive overproduction of recombinant versatile peroxidase MnP2 by genetically modified white rot fungus, *Pleurotus ostreatus*." Journal of Biotechnology **126**(4): 431-439.
- Umano, K., Y. Hagi und T. Shibamoto (2002). "Volatile Chemicals Identified in Extracts from Newly Hybrid Citrus, Dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J)." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(19): 5355-5359.
- Valim, M. F., R. L. Rouseff und J. Lin (2003). "Gas Chromatographic-Olfactometric Characterization of Aroma Compounds in Two Types of Cashew Apple Nectar." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(4): 1010-1015.
- van de Rhee, M. D., P. M. Graca, H. J. Huizing und H. Mooibroek (1996). "Transformation of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*, to hygromycin B resistance." Molecular and General Genetics **250**(3): 252-258.
- van der Schaft, P. H. (2007). Chemical Conversations of Natural Precursors. Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability: Chemistry, Technology and Resources. R. G. Berger. Berlin Heidelberg, Springer: 285-301.
- van Suijdam, J. C. und B. Metz (1981). "Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds." Biotechnology and bioengineering **23**(1): 111-148.
- Varming, C., M. A. Petersen und L. Poll (2004). "Comparison of Isolation Methods for the Determination of Important Aroma Compounds in Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Juice, Using Nasal Impact Frequency Profiling." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(6): 1647-1652.
- Velasco, P., P. Soengas, M. Vilar, M. E. Cartea und M. del Rio (2008). "Comparison of Glucosinolate Profiles in Leaf and Seed Tissues of Different *Brassica napus* Crops." Journal of the American Society for Horticultural Science **133**(4): 551-558.
- Vuorela, S., A. Meyer und M. Heinonen (2003). "Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC." European Food Research and Technology **217**(6): 517-523.
- Wainwright, M. (1992). An Introduction to Fungal Biotechnology. Chichester, U. K., John Wiley & Sons.
- Wainwright, M. (1995). Biotechnologie mit Pilzen. Berlin, Springer.
- Wang, L., D. Ridgway, T. Gu und M. Moo-Young (2005). "Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations." Biotechnology Advances **23**(2): 115-129.
- Wardle, K. S. und L. C. Schisler (1969). "The Effects of Various Lipids on Growth of Mycelium of *Agaricus Bisporus*." Mycologia **61**(2): 305-314.
- Wasser, S. P. und A. L. Weis (1999). "Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective." Critical Reviews™ in Immunology **19**(1): 65-96.
- Webster, J. und R. Weber (2007). Introduction to Fungi Cambridge, Cambridge University Press.

- Weiss, R. F. (1970). "The Solubility of Nitrogen, Oxygen and Argon in Water and Seawater." Deep-Sea Research **17**: 721–735.
- Winterhalter, P. und R. L. Rouseff (2002). Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. Carotenoid-derived aroma compounds. Winterhalter P, Rouseff RL, Winterhalter P, Rouseff RL: 1-17.
- Wittier, R., H. Baumgartl, D. W. Lübbers und K. Schügerl (1986). "Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements." Biotechnology and bioengineering **28**(7): 1024-1036.
- Wucherpennig, T., K. A. Kiep, H. Driouch, C. Wittmann und R. Krull (2010). "Morphology and rheology in filamentous cultivations." Advances in Applied Microbiology **72**(10): 89-136.
- Wurzenberger, M. und W. Grosch (1984). "The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*)." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism **794**(1): 25-30.
- Wymelenberg, A. V., P. Minges, G. Sabat, D. Martinez, A. Aerts, A. Salamov, I. Grigoriev, H. Shapiro, N. Putnam, P. Belinky, C. Dosoretz, J. Gaskell, P. Kersten und D. Cullen (2006). "Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins." Fungal Genetics and Biology **43**(5): 343-356.
- Yang, F., Y. Ke und S. Kuo (2000). "Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures." Enzyme and Microbial Technology **27**(3-5): 295-301.
- Yaropolov, A. I., O. V. Skorobogat'ko, S. S. Vartanov und S. D. Varfolomeyev (1994). "Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability." Applied Biochemistry and Biotechnology **49**(3): 257-280.
- Yim, S.-K., T. Ahn, J.-S. Kim und C.-H. Yun (2002). "Polyacrylamide Gel Electrophoresis without a Stacking Gel: Application for Separation of Peptides." Analytical Biochemistry **305**(2): 277-279.
- Zadrazil, F. und A. K. Puniya (1994). "Influence of carbon dioxide on lignin degradation and digestibility of lignocellulosics treated with *Pleurotus sajor-caju*." International Biodeterioration & Biodegradation **33**(3): 237-244.
- Zago, A., G. Degrassi und C. V. Bruschi (1995). "Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus pumilus* gene for ferulic acid decarboxylase." Applied and Environmental Microbiology **61**(12): 4484-4486.
- Zelena, K., B. Hardebusch, B. Hulsdau, R. G. Berger und H. Zorn (2009). "Generation of norisoprenoid flavors from carotenoids by fungal peroxidases." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(21): 9951-9955.
- Zhang, F.-M., J. S. Knapp und K. N. Tapley (1999). "Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus." Enzyme and Microbial Technology **24**(1-2): 48-53.
- Zhang, Y., G. L. Mills und M. G. Nair (2003). "Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*." Phytomedicine **10**(5): 386-390.
- Zhang, Z.-G. und H.-Z. Chen (2010). "Xanthan Production on Polyurethane Foam and Its Enhancement by Air Pressure Pulsation." Applied Biochemistry and Biotechnology **162**(8): 2244-2258.
- Zhu, H., C. Cao, S. Zhang, Y. Zhang und W. Zou (2011). "pH-control modes in a 5-L stirred-tank bioreactor for cell biomass and exopolysaccharide production by *Tremella fuciformis* spore." Bioresource Technology **102**(19): 9175-9178.
- Zimmermann, G. (2008). "The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control." Biocontrol Science and Technology **18**(9): 865-901.

- Znidarsic, P. und A. Pavko (2001). "The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter." Food Technology and Biotechnology **39**(3): 237-252.
- Zorn, H., M. Fischer-Zorn und R. G. Berger (2003a). "A labeling study to elucidate the biosynthesis of 4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (raspberry ketone) by *Nidula niveo-tomentosa*." Applied and Environmental Microbiology **69**(1): 367-372.
- Zorn, H., S. Langhoff, M. Scheibner und R. G. Berger (2003b). "Cleavage of b,b-carotene to flavor compounds by fungi." Applied Microbiology and Biotechnology **62**(4): 331-336.
- Zorn, H., T. Peters, M. Nimitz und R. G. Berger (2005). "The secretome of *Pleurotus sapidus*." Proteomics **5**(18): 4832-4838.
- Zorn, H., M. Scheibner, B. Hülldau, R. G. Berger, L. de Boer und R. B. Meima (2006). Novel enzymes for use in enzymatic bleaching of food products. E. P. Appl. **EP 64132 20060712**.
- Zou, X., X. Guo und M. Sun (2009). "pH control strategy in a shaken minibioreactor for polysaccharide production by medicinal mushroom *Phellinus linteus* and its anti-hyperlipemia activity." Bioprocess and Biosystems Engineering **32**(2): 277-281.

Lebenslauf auf Wunsch des Autors am 06.04.2018 entfernt.