

**Produktion natürlicher Aromastoffe durch monokaryotische  
Stämme von *Pleurotus sapidus* mit *Citrus*-Nebenströmen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*

Dr. rer. nat.

dem Fachbereich Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Friederike Bürger**

staatl. geprüfte Diplom-Lebensmittelchemikerin

geboren in Lutherstadt Eisleben

2024

Dekan: Prof. Dr. H. Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Wüst

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

## Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu.

---

Datum

---

Unterschrift

## Danksagung

An dieser Stelle darf ich auf die letzten Jahre zurückblicken und einigen Wegbegleitern Danke sagen, welche auf die ein oder andere Weise an der Entstehung dieser Dissertation beteiligt waren.

Zuallererst geht mein besonderer Dank an Professor Dr. Holger Zorn, welcher mir großes Vertrauen entgegengebracht hat, indem er mich nach 5 Jahren reiner Industrietätigkeit in das wissenschaftliche Umfeld zurückkehren und dieses interessante und vielseitige Thema bearbeiten ließ.

Ich danke Herrn Professor Dr. Matthias Wüst für die Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen sowie Frau Professorin Dr. Sylvia Schnell und Herrn Professor Dr. Martin Rühl für den Beitritt zur Prüfungskommission.

Ein großer Dank gilt auch dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gilt, ohne dessen finanzielle Förderung die Arbeiten nicht möglich gewesen wären. Zusätzlich wurde mir dadurch die Möglichkeit gegeben nach Argentinien zu reisen, wofür ich sehr dankbar bin. In diesem Zusammenhang danke ich auch den Projektpartnern insbesondere Dr. Alexandra Omarini und Dr. Nina Katharina Krahe, welche die Pilzstämmen zur Verfügung gestellt haben.

Herrn Dr. Marco A. Fraatz danke ich für die Hilfestellung an den Gaschromatographen, seine ständige Diskussionsbereitschaft über wissenschaftliche Fragestellungen und seine Geduld.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Kolleginnen und Kollegen des Institutes für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Dr. Andreas Hammer, Fabio Brescia, Dr. Friederike Hahne, Janin Pfeiffer, Jean-Philippe Kanter, Julia Büttner und Dr. Svenja Sommer. Ich danke Euch für Eure Ratschläge, für den fachlichen Austausch, Euren Humor und die zahlreichen gemeinsamen Mittagspausen und Gespräche auch außerhalb der Arbeit. Fabio danke ich zusätzlich für das Korrekturlesen.

Den Studierenden, welche durch ihre Abschlussarbeiten, Wahlpflichtmodule oder als studentische Hilfskraft an der Datengenerierung für diese Arbeit beteiligt waren, gilt ebenso mein Dank. Stellvertretend möchte ich hier Merle Bückler, Maximilian Koch, Leon M. Lang, Alex Lidars und Annika Möller erwähnen.

Die letzten Zeilen widme ich an dieser Stelle meinen Eltern, Geschwistern und Freunden. Vielen Dank für Eure jederzeitige Unterstützung, Eure immer offenen Ohren und Euren Zuspruch. Außerdem möchte ich meiner „Busecker Familie“ von Herzen für die sehr wertvolle gemeinsame Zeit danken. Ich bin dankbar und glücklich, dass ihr Teil meines Lebens seid.

„Meine Hilfe kommt von dem Herrn, der Himmel und Erde gemacht hat!“

„Wunderbar sind deine Werke und meine Seele weiß es sehr wohl.“

Die Bibel – Psalm 121 Vers 2 & Psalm 139 Vers 14

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Bürger, F.; Koch, M.; Fraatz, M.A.; Omarini, A.B.; Berger, R.G.; Zorn H. (2022): Production of an Anise- and Woodruff-like Aroma by Monokaryotic Strains of *Pleurotus sapidus* Grown on *Citrus* Side Streams. *Molecules* **27** (651), 1-19. DOI: 10.3390/molecules27030651

Orban, A.; Bürger, F., Mewe, C.; Sella, N.; Zorn, H.; Rühl, M. (*E*)-Nerolidol formation in dikaryotic and monokaryotic strains of *Pleurotus sapidus*. In preparation

### Projektbericht

Bürger, F.; Albuquerque W.; Fraatz, M.A.; Zorn, H. (2021) Schlussbericht zum Teilvorhaben des Forschungsprojekts: Bioökonomie International 2015: MOPSACI: Monokaryotische Stämme von *Pleurotus sapidus* zur Gewinnung natürlicher Produkte mit biologischer Aktivität aus Nebenströmen der *Citrus*-Industrie. <https://doi.org/10.2314/KXP:1809310520>

### Tagungsbeiträge

#### Poster

Bürger, F.; Omarini, A.; Krahe, N.K.; Fraatz, M.A.; Berger R.G.; Zorn, H. (2019) Herstellung natürlicher Aromastoffe durch monokaryotische *Pleurotus sapidus*-Stämme unter Nutzung von Nebenströmen der *Citrus*-verarbeitenden Industrie. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, Deutschland

Bürger, F.; Omarini, A.; Krahe, N.K.; Fraatz, M.A.; Berger R.G.; Zorn, H. (2019) Production of natural flavour compounds by monokaryotic strains of *Pleurotus sapidus* using side-streams of the *Citrus* processing industries. 12<sup>th</sup> Wartburg Symposium on Flavor Chemistry & Biology, Eisenach, Deutschland

Bürger, F.; Koch, M.; Krahe, N.K.; Berger R.G.; Fraatz, M.A.; Zorn, H. (2021) Production of natural flavour compounds with monokaryotic strains of *Pleurotus sapidus* grown on *Citrus* side streams. 16<sup>th</sup> Weurman Flavour Research Symposium (online)

## Zusammenfassung

Im Sinne der Kreislaufwirtschaft und dem damit unmittelbar verbundenen Nachhaltigkeitsgedanken wächst das Bestreben nach Wertsteigerung vermeintlicher Abfälle der Lebensmittelproduktion. Hinzu kommt der steigende Bedarf an natürlichen Duft- und Aromastoffen, wobei bei der Herstellung immer mehr auf biotechnologische Verfahren zurückgegriffen wird.

Diese Aspekte wurden in der vorliegenden Arbeit fokussiert, indem Nebenströme der *Citrus* verarbeitenden Industrie mit 60 monokaryotischen und zwei parentalen dikaryotischen Stämmen des Pilzes *Pleurotus sapidus* in Oberflächenkulturen fermentiert wurden und diese nach ihren Geruchsprofilen klassifiziert wurden. Dabei wiesen einige Kulturen einen sehr angenehmen Geruch auf, der mit Attributen wie Waldmeister, Anis und krautig verknüpft wurde. Ähnliche Aromaprofile zeigten auch die im weiteren als Submerskultur angelegten Pilzstämmen. Um relevante volatile Substanzen zu identifizieren, wurde anhand eines Monokaryoten eine Flüssig/Flüssigextraktion der submersen Kultur mit anschließender Isolierung der Aromasubstanzen durch *solvent assisted flavor evaporation* durchgeführt. Mit Hilfe einer Aromaextraktverdünnungsanalyse wurde *p*-Anisaldehyd (süßlich, anis- und waldmeisterartig) mit einem *flavor dilution* Faktor von  $2^{18}$  als Schlüsselverbindung ausgemacht.

Außerdem wurde das kokosnussartige, krautige und süßlich riechende Acyloin (2*S*)-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon identifiziert, welches in dieser Arbeit erstmals als aromaaktive Komponente mit einer Geruchsschwelle in Luft von  $0,2 \text{ ng L}^{-1}$  bis  $2,4 \text{ ng L}^{-1}$  beschrieben wurde und eine hohe Enantiomerenreinheit mit einem Enantiomerenverhältnis (er) von 98,4:1,6 aufwies. Das Chromatogramm der Analyse der volatilen Substanzen in Abhängigkeit von der Kulturdauer zeigte an Kulturtag 8 die zweitgrößte Intensität dieses Aromastoffs nach *p*-Anisaldehyd. Letzteres wurde mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse mit bis zu  $160,3 \pm 26,9 \text{ mg L}^{-1}$  bestimmt, was innerhalb der literaturbekannten Fermentationen von Nebenströmen durch Pilze der Abteilung Basidiomycota einer sehr hohen Ausbeute entspricht.

Die Supplementation des Kulturmediums mit, unter anderem, isotopenmarkiertem L-Tyrosin ließ den Rückschluss zu, dass diese aromatische Aminosäure gemeinsamer Präkursor sowohl von *p*-Anisaldehyd als auch von (2*S*)-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon ist. Ein Schlüsselenzym für die Biosynthese des Acyloins ist dabei eine Pyruvatdecarboxylase, wobei auch die Reduktion des entsprechenden Diketons, wahrscheinlich katalysiert durch eine Aldo-Ketoreduktase, eine wesentliche Rolle spielt. Diese reduktive Eigenschaft des Pilzes wurde hier erstmalig beschrieben.

Die Untersuchung der Biosynthese des *p*-Anisaldehyds ließ zudem auf die Präsenz einer *O*-Methyltransferase schließen, die bisher in der Literatur in diesem Zusammenhang noch keine Erwähnung fand.

Neben der Betrachtung als Fermentationssystem für Aromastoffe war ein Ziel dieser Arbeit auch die Bereitstellung des Myzels für Projektpartner. Dazu erfolgte die stufenweise Maßstabsvergrößerung unter Anpassung der Prozessparameter bis hin zum Pilotmaßstab im 150-L-Bioreaktor. Bei der kulturbegleitenden Analytik lag der Fokus auf den Aminosäuren und den Parametern zur Beurteilung der Proteinqualität.

Insgesamt wurde durch die Maßstabsvergrößerung und Prozessoptimierung eine Steigerung des Gesamtaminosäuregehaltes und Proteinanteils von  $(14,01 \pm 0,28) \text{ g (100 g Trockenmasse)}^{-1}$  auf  $(16,58 \pm 0,44) \text{ g (100 g Trockenmasse)}^{-1}$  erreicht. Dabei spielten im Fermentationsprodukt Histidin, Aspartat/Asparaginsäure, Glutamat/Glutaminsäure sowie Arginin mengenmäßig die Hauptrolle. Als limitierende Aminosäuren wurden je nach Prozessmaßstab Tryptophan, Valin, Cystein und Methionin identifiziert.

## Abstract

Due to the spirit of circular economy and the directly associated idea of sustainability, there is a growing desire to increase the value of side streams from the food processing industry. In addition, there is an increasing demand for natural fragrances and flavorings, with more and more biotechnological processes being used for their production.

These aspects were focused in the present work by fermenting side streams of the *Citrus* processing industry with 60 monokaryotic and two parental dikaryotic strains of the fungus *Pleurotus sapidus* in surface cultures and grouping them according to their odor profiles. Herein, some cultures exhibited a very pleasant odor that was linked to attributes such as woodruff, anise, and herbaceous. Similar aroma profiles were also exhibited by the mushroom strains grown in submerged cultures. In order to identify the relevant volatile substances, a liquid/liquid extraction of the submerged monokaryotic culture was performed, followed by isolation of the aroma substances by means of solvent assisted flavor evaporation. Using aroma extract dilution analysis, *p*-anisaldehyde (sweetish, anise-like, and woodruff-like) was identified as the key compound with a flavor dilution factor of 2<sup>18</sup>.

Additionally, the coconut-like, sweetish and herbaceous smelling acyloin (2*S*)-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanone was identified for the first time as an aroma compound within this work. The substance emitted an extremely low odor threshold in air of 0.2 ng L<sup>-1</sup> to 2.4 ng L<sup>-1</sup> and exhibited a high enantiomeric purity with an enantiomeric ratio (er) of 98.4:1.6. The chromatogram of the aroma analysis as a function of time showed the second highest intensity of this aroma compound, after *p*-anisaldehyde on culture day 8<sup>th</sup>. The latter was quantified with 160.3 ± 26.9 mg L<sup>-1</sup> by stable isotope dilution analysis, which corresponds to a high yield for fermentations of side streams by fungi of the division Basidiomycota.

Supplementation studies of the culture medium with, among others, isotopically labeled L-tyrosine allowed the conclusion that this aromatic amino acid is a common precursor of both, *p*-anisaldehyde and (2*S*)-hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanone. A key enzyme for the biosynthesis of the acyloin is a pyruvate decarboxylase, although the reduction of the corresponding diketone, probably catalyzed by an aldo-ketoreductase, also plays an essential role. This reductive property of the fungus was described for the first time within this work.

Studies on the biosynthesis of *p*-anisaldehyde suggested the presence of an *O*-methyltransferase, which has not been previously described in the literature.

Besides aroma production, one additional goal of the present work was the production of biomass for the project partner. For this purpose, a gradual scale-up was carried out with adaptation of the process parameters up to the pilot scale in a 150-L bioreactor. Cultivation-related analytics were focused on amino acids and protein quality assessment parameters.

Overall, an increase in the total amino acid content and protein content from  $(14.01 \pm 0.28) \text{ g (100 g dry weight)}^{-1}$  to  $(16.58 \pm 0.44) \text{ g (100 g dry weight)}^{-1}$  was achieved by scale up and process optimization. In terms of quantity, histidine, aspartate/aspartic acid, glutamate/glutamic acid and arginine played the main role in the fermentation product. Depending on the process scale, tryptophan, valine, cysteine and methionine were identified as limiting amino acids.

## Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung .....	I
Danksagung .....	II
Veröffentlichungen .....	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract .....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
Abbildungsverzeichnis.....	XVII
Tabellenverzeichnis.....	XX
1 Einleitung.....	1
1.1 Industrielle Nebenströme .....	1
1.2 Fermentation/Biotechnologie.....	3
1.3 Basidiomycota .....	4
1.3.1 Pleuroten.....	5
1.3.2 Lebenszyklus von Pilzen der Abteilung der Basidiomycota .....	5
1.3.3 Mono- und Dikaryoten.....	7
1.3.4 Ligninolytisches Enzymsystem von Basidiomycota.....	9
1.4 Basidiomycota in der Biokatalyse.....	11
1.5 <i>de novo</i> Synthese und Biotransformation von Aromastoffen.....	14
1.5.1 <i>p</i> -Anisaldehyd.....	14
1.5.2 $\alpha$ -Hydroxyketone .....	15
1.6 Zielsetzung.....	19
2 Experimenteller Teil .....	20
2.1 Materialien .....	20
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.3 Geräte .....	26

2.1.4	Mikroorganismen.....	34
2.1.5	Substrate .....	35
2.2	Allgemeine Kulturführung von Pilzen.....	36
2.2.1	Medienzusammensetzung.....	36
2.2.2	Stammhaltung.....	38
2.2.3	Submerse Kultivierung.....	38
2.3	Kultivierung von monokaryotischen Stämmen von PSA als <i>Food Grade Material</i> .....	39
2.3.1	Submerse Kultivierung im Schüttelkolben.....	39
2.3.2	Maßstabsvergrößerung im 7,5-L-Bioreaktor .....	40
2.3.3	Maßstabsvergrößerung im 150-L-Bioreaktor .....	40
2.4	Charakterisierung von Substraten, Medien und Fermentationsprodukten.....	41
2.4.1	Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay	41
2.4.2	Bestimmung des Restfeuchtegehaltes.....	41
2.4.3	Bestimmung des Stickstoffgehaltes mittels Kjeldahl .....	41
2.4.4	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung .....	43
2.4.5	Berechnung der Proteingehalte und -qualitäten.....	48
2.4.6	Elementaranalyse.....	51
2.4.7	Bestimmung des Fettgehaltes.....	51
2.4.8	Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung .....	52
2.5	Screening .....	54
2.5.1	Screening der Oberflächenkulturen.....	54
2.5.2	Screening mittels GC-MS.....	54
2.6	Extraktionsvergleich & sensorische Analyse submerser Kulturen .....	58
2.6.1	Kulturführung & Probenahme .....	58
2.6.2	<i>Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME)</i> .....	58
2.6.3	<i>Direct immersion-stir bar sorptive extraction (DI-SBSE)</i> .....	58
2.6.4	Flüssig/Flüssig-Extraktion, <i>solvent assisted flavor evaporation (SAFE)</i> und sensorische Analyse.....	60

2.7	Aromaextraktverdünnungsanalyse & Substanzidentifizierung.....	61
2.7.1	Aromextraktverdünnungsanalyse (AEVA).....	61
2.7.2	Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen.....	61
2.7.3	Strukturaufklärung von 2-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon (2-HPP).....	63
2.8	Aromastoffgenese im Kulturverlauf & Quantifizierung von <i>p</i> -Anisaldehyd.....	65
2.8.1	Aromastoffgenese im Kulturverlauf.....	65
2.8.2	Stabilisotopenverdünnungsanalyse von <i>p</i> -Anisaldehyd .....	65
2.9	Induktion der Aromastoffbildung durch Präkursoren.....	67
2.9.1	Optimierung der Medien zur Aminosäuresupplementierung .....	67
2.9.2	Vergleich von statischer Kultivierung gegen Schüttelkultivierung unter Zusatz von L-Phenylalanin und L-Tyrosin .....	68
2.9.3	Stabilisotopensupplementierung von L-Tyrosin .....	69
2.10	Biotransformationsstudien.....	70
2.10.1	Zusammensetzung des Puffers .....	70
2.10.2	Reaktionsansätze .....	70
2.10.3	Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,[2- <sup>13</sup> C]-propandion & [2- <sup>13</sup> C]-HPP .....	72
2.11	Abschätzung der Geruchsschwelle von 2-HPP .....	74
3	Ergebnisse .....	75
3.1	Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes der Substrate und Berechnung der Medienzusammensetzung .....	75
3.2	Kultivierung von monokaryotischen PSA-Stämmen als <i>Food Grade Material</i> .....	77
3.2.1	Maßstabsvergrößerung.....	77
3.2.2	Charakterisierung von Substrat, Medium und Fermentationsprodukten .....	77
3.2.3	Elementaranalyse.....	78
3.2.4	Aminosäureanalytik .....	79
3.3	Screening von monokaryotischen Stämmen des PSA .....	85
3.3.1	Screening in Oberflächenkulturen .....	85
3.3.2	Screening in SNL-Submerskultur.....	86

3.3.3	Screening in CSS-Submerskultur .....	88
3.4	Extraktionsvergleich & sensorische Analyse submerser Kulturen .....	90
3.4.1	Vergleich der Extraktionstechniken HS-SPME, DI-SBSE & LLE/SAFE.....	90
3.4.2	Sensorische Analyse.....	92
3.5	Aromaextraktverdünnungsanalyse & Substanzidentifizierung.....	94
3.6	Geruchsschwelle von 2-HPP .....	99
3.7	Aromastoffe im Kulturverlauf .....	100
3.8	Quantifizierung von <i>p</i> -Anisaldehyd durch Stabilisotopenverdünnungsanalyse .....	101
3.9	Induktion der Bildung von <i>p</i> -Anisaldehyd und 2-HPP .....	103
3.9.1	Medienoptimierung für die Supplementation mit L-Phenylalanin & L-Tyrosin .....	103
3.9.2	Vergleich von statischer Kultivierung gegen Schüttelkultivierung unter Zusatz von L-Phenylalanin & L-Tyrosin.....	104
3.9.3	Stabilisotopensupplementierung von L- Tyrosin.....	106
3.10	Biotransformationsstudien.....	109
3.10.1	Umsetzungen in Abhängigkeit des Nährmediums.....	109
3.10.2	Umsetzungen mit verschiedenen Pilzstämmen.....	110
3.10.3	Umsetzungen in Abhängigkeit von Inkubationsdauer & -temperatur .....	110
3.10.4	Substratabhängigkeit .....	111
3.10.5	Biotransformation von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandion (Diketon) .....	116
4	Diskussion.....	118
4.1	Screening von mono- und dikaryotischen Stämmen des PSA.....	118
4.2	Isolierung, Anreicherung & Identifizierung flüchtiger Verbindungen.....	125
4.3	Induktion der Bildung von <i>p</i> -Anisaldehyd und 2-HPP .....	134
4.4	Biotransformationsstudien.....	137
4.5	Zusammenfassende Synthesewege von <i>p</i> -Anisaldehyd und 2-HPP.....	140
4.6	Vergleichende Nährwertcharakterisierung von Substrat, Medium und Fermentationsprodukt .....	142
4.7	Maßstabsvergrößerung.....	147

5	Ausblick .....	148
6	Literaturverzeichnis.....	150
7	Anhang .....	XXIV

## Abkürzungsverzeichnis

AAD	Aryl-Alkohol-Dehydrogenase
AADD	Aryl-Aldehyd-Dehydrogenase
AAO	Aryl-Alkoholoxidase
AEVA (AEDA)	Aromaextraktverdünnungsanalyse ( <i>aroma extract dilution analysis</i> )
AS <sub>res</sub>	<i>Amino Acid Residue</i>
AAS	<i>Amino Acid Score</i>
AHAS	Acetolactatsynthase
AS	Aminosäure(n)
BAL	Benzaldehydlyase
BFD	Benzoylformiatdecarboxylase
BW	Biologische Wertigkeit
CAR	Carboxen
CS	<i>Chemical Score</i>
CSS	<i>citrus side streams</i>
CSSM	<i>citrus side stream</i> Medium
DHS	<i>dynamic headspace</i>
DI	<i>direct immersion</i>
Dk	Dikaryot
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVB	Divinylbenzol
EAAI	Essentieller Aminosäureindex
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EMD	3,9-Epoxy- <i>p</i> -mentha-1,8(10)-dien

<i>er</i>	Enantiomerenverhältnis ( <i>enantiomeric ratio</i> )
F	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
F <sub>net</sub>	netto Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
FD	<i>flavor dilution</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
G <sub>AS</sub>	Summe Aminosäuregehalte/Gesamtaminosäuregehalte
GC	Gaschromatograph, Gaschromatographie
GKH	Gesamtkohlenhydratgehalt
HPLC (-PDA)	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>High Performance Liquid Chromatographie</i> ) (-Photodiodenarray-Detektion)
1-HPP	1-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-2-propanon
2-HPP	2-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon
HS	Kopfraum ( <i>headspace</i> )
k. A.	keine Angabe
LiP	Ligninperoxidase
LLE	<i>liquid/liquid extraction</i> (Flüssig/Flüssig-Extraktion)
ME	Malzextrakt
MEP	Malzextrakt-Pepton
Mk	Monokaryot
MS	Massenspektrometer
n. a.	nicht angewendet
n. b.	nicht bestimmt
N <sub>ASA</sub>	Gesamtstickstoffgehalt, aus der Aminosäureanalyse resultierend
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
N <sub>K</sub>	Gesamtstickstoffgehalt, aus der Kjeldahl-Analyse resultierend
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

O	Olfaktometrie
ODP	<i>olfactory detection port</i>
OMT	O-Methyltransferase
p. a.	<i>pro analysi</i>
PAC	Phenylacetylcarbinol
PDC	Pyruvatdecarboxylase
PDMS	Polydimethylsiloxan
PhPDC	Phenylpyruvatdecarboxylase
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
RHP	Rohproteingehalt
RI	Retentionsindex
RT	Raumtemperatur
SAFE	<i>solvent assisted flavor evaporation</i>
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SNL	Standardnährlösung
SBSE	<i>stir bar sorptive extraction</i>
SPME	Festphasenmikroextraktion ( <i>solid phase microextraction</i> )
TOF	<i>time of flight</i>
UV/Vis	<i>Ultraviolet/visible detector</i>
VE	vollentsalzt
vvm	<i>vessel volume per minute</i>
WHO	World Health Organization

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus von <i>Pleurotus sapidus</i> nach (Casselton & Kües, 1994; Heitman et al., 2013; Coelho et al., 2017; Nieuwenhuis & Aanen, 2018) .....	6
Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der enzymatischen Decarboxylierung und Bildung von aromatischen $\alpha$ -Hydroxyketonen durch Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) (Pohl, 1997; Iding et al., 1998; Neuser et al., 2000a) .....	17
Abbildung 3: Aminosäureprofile im Verlauf der Maßstabsvergrößerung vom Substrat über Medium bis hin zu den Fermentationsprodukten .....	80
Abbildung 4: GC-MS-Chromatogramm des Kulturüberstandes (Tag 3) von SNL PSA Mk 37, extrahiert mittels HS-SPME; a: Dillether 1, b: 3,9-Epoxy-p-mentha-1,8-(10)-dien (EMD), c: Dillether 2, d: p-Anisaldehyd, e: (E)-Nerolidol. ....	86
Abbildung 5: ausgewählte geruchsaktive Substanzen in SNL-Kulturüberständen verschiedener PSA Dikaryoten (Dk) und Monokaryoten (Mk).....	87
Abbildung 6: GC-MS-Chromatogramm des Kulturüberstandes (Tag 3) von SNL PSA Mk 49 extrahiert mittels HS-SPME; a: Dillether 1, b: 3,9-Epoxy-p-mentha-1,8-(10)-dien (EMD), c: Dillether 2, d: p-Anisaldehyd, e: (E)-Nerolidol. ....	88
Abbildung 7: ausgewählte volatile Substanzen in CSS-Kulturüberständen verschiedener PSA Di- und Monokaryoten im Vergleich zum Medium (CSSM BW)(Kulturtag 4).....	89
Abbildung 8: GC-MS-Chromatogrammausschnitt von CSSM <sub>1</sub> PSA Mk 37 extrahiert mittels HS-SPME (Split 20:1) .....	91
Abbildung 9: GC-MS-Chromatogrammausschnitt von CSSM <sub>1</sub> PSA Mk 37 extrahiert mittels DE-SBSE (Split 50:1) .....	91
Abbildung 10: GC-MS-Chromatogrammausschnitt von CSSM <sub>1</sub> PSA Mk 37 extrahiert mittels LLE/SAFE .....	92
Abbildung 11: Sensorische Eindrücke von LLE/SAFE Proben von CSSM <sub>1</sub> Kulturen eines dikaryotischen Stammes (Dk) und verschiedener monokaryotischer Stämme (Mk).....	93
Abbildung 12: Strukturen arylischer Verbindungen in CSSM PSA Mk 37 identifiziert, Anisol (11), Benzaldehyd (18), p-Methylacetophenon (27), p-Anisaldehyd (33), (E)-Methylcinnamat (34), Methyl-p-anisat (35), p-Methoxyphenylacetone (37), p-Methoxypropiofenon, p-Methoxybenzylalkohol (40), 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (43), 2-HPP (48).....	97
Abbildung 13: Ausschnitt des MDGC-Chromatogramms von 2-HPP; *vorläufig identifiziert .....	98

Abbildung 14: Chromatogramm der chiralen HPLC-Analyse des 2-HPP-Isolates (270 nm).....	99
Abbildung 15: Ausgewählte volatile Substanzen im Kulturverlauf des CSSM <sub>1</sub> PSA Mk 37 (LLE) .....	100
Abbildung 16: Massenspektren von p-Anisaldehyd (a) und [7- <sup>13</sup> C]-p-Anisaldehyd (b) .....	101
Abbildung 17: Kalibriergerade der Peakflächenverhältnisse definierter Mengen von [7- <sup>13</sup> C]-p-Anisaldehyd und p-Anisaldehyd in Abhängigkeit der entsprechenden Konzentrationsverhältnisse .	102
Abbildung 18: Vergleich der Peakflächen an Hauptaromastoffen nach Supplementierung mit L-Tyrosin bzw. L-Phenylalanin zu Kulturen des PSA Dk (Kulturtag 7); L-Tyrosin-Konzentrationen: Tyr A 33 mM; Tyr B 17 mM + Asp; Tyr C 8 mM + Asp; Tyr D 4 mM + Asp; L-Phenylalanin-Konzentrationen: Phe A 39 mM; Phe B 23 mM + Asp; Phe C 11 mM + Asp; Phe D 8 mM + Asp .....	103
Abbildung 19: Vergleich der Peakflächen an Hauptaromastoffen nach Supplementierung mit L-Tyrosin bzw. L-Phenylalanin zu Kulturen des PSA Mk 74 (Kulturtag 4); Tyr A: 14 mM Aspartat, 33 mM Tyr; Tyr B: 35 mM Aspartat, 33 mM Tyr; Tyr C: 0,3 g L <sup>-1</sup> Hefeextrakt, 33 mM Tyr; Phe A: 14 mM Aspartat, 11 mM Phe; Phe B: 35 mM Aspartat, 11 mM Phe; Phe C: 0,3 g L <sup>-1</sup> Hefeextrakt, 11 mM Phe; CB: chemischer Blindwert .....	104
Abbildung 20: Induktion der Bildung von p-Anisaldehyd durch PSA Dk und PSA Mk 37 unter Zusatz von L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) in statischer (stat) bzw. Schüttelkultivierung (shak) .....	105
Abbildung 21: Induktion der Bildung von 2-HPP durch PSA Dk und PSA Mk 37 unter Zusatz von L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) in statischer (stat) bzw. Schüttelkultivierung (shak).....	106
Abbildung 22: Ausschnitt des Massenspektrums von p-Anisaldehyd (links) und [3,5- <sup>2</sup> H]-4-methoxybenzaldehyd (rechts) nach Umsetzung von L-2-Amino-3-([3,5- <sup>2</sup> H]-4-hydroxyphenyl)-propansäure mit PSA 69 Dk.....	107
Abbildung 23: Ausschnitt des Massenspektrums von 2-HPP (links) und 2-Hydroxy-1-(4-methoxy-[3,5- <sup>2</sup> H]-phenyl)-1-propanon (rechts) nach Umsetzung mit PSA 69 Dk .....	108
Abbildung 24: Relative Peakflächen (Summe aus 1- & 2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit des Nährmediums und des C2-Donors.....	109
Abbildung 25: Relative Peakflächen (Summe aus 1- & 2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit des verwendeten PSA-Lyophilisates. ....	110
Abbildung 26: Relative Peakflächen (Summe aus 1- & 2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit von Inkubationsdauer (a; 24 °C) und -temperatur (b; 24 h) .....	111
Abbildung 27: Relative Peakflächen (Summe aus 1- & 2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an p-Anisaldehyd.....	112

Abbildung 28: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Acetaldehyd.....	113
Abbildung 29: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Natriumpyruvat. ....	114
Abbildung 30: Ausschnitte aus den Massenspektren von 2-HPP (links) und markiertem 2-HPP nach Umsetzung von p-Anisaldehyd und <sup>13</sup> C-Natriumpyruvat (rechts) .....	115
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm (265 nm) der Umsetzung von p-Anisaldehyd in Gegenwart von 25 mM Natriumpyruvat durch PSA Mk 37 mit m-Anisaldehyd als internem Standard; *vorläufig identifiziert.....	115
Abbildung 32: Chromatogrammausschnitte zur Bildung von 2-HPP aus <sup>13</sup> C-Diketon vor (unten) und nach (oben) der Umsetzung mit PSA Mk 37 .....	116
Abbildung 33: Ausschnitt des Massenspektrums des substituierten 2-HPPs nach Reduktion von <sup>13</sup> C-Diketon .....	117
Abbildung 34: Biosynthese von Methylcinnamat ausgehend von L-Phenylalanin über die Bildung von Cinnamat; PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, CCMT: Zimtsäure-Carboxyl-Methyltransferase .....	130
Abbildung 35: Struktur von 4,6-Dimethoxyphthalid .....	130
Abbildung 36: Mögliche Bildungswege von p-Anisaldehyd in PSA (modifiziert nach Lapadatescu et al., 2000) .....	140
Abbildung 37: Mögliche Bildungswege von 2-HPP in PSA; PDC: Pyruvatdecarboxylase .....	141

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung verschiedener Arten an Citrus Peel Waste (Marín et al., 2007) .....	2
Tabelle 2: Vergleichende Studien zu mono-(Mk) und dikaryotischen (Dk) Stämmen von <i>Pleurotus sapidus</i> . ....	8
Tabelle 3: Überblick ausgewählter Studien zur Kultivierung von Spezies der Gattung <i>Pleurotus</i> auf verschiedenen Nebenströmen.....	11
Tabelle 4: Überblick thiaminabhängiger Enzyme mit Carboligase-Aktivität.....	18
Tabelle 5: Medienbestandteile .....	20
Tabelle 6: Lösungsmittel .....	21
Tabelle 7: Referenzverbindungen .....	21
Tabelle 8: sonstige Chemikalien.....	23
Tabelle 9: Gase .....	24
Tabelle 10: Verbrauchsmaterial .....	25
Tabelle 11: Gaschromatographische Systeme mit Flammenionisationsdetektor .....	26
Tabelle 12: gaschromatographische Systeme mit massenspektrometrischem Detektor .....	27
Tabelle 13: Parameter zur Analyse mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) .....	28
Tabelle 14: Kapillarsäulen für die Gaschromatographie .....	29
Tabelle 15: sonstiges Zubehör für die Gaschromatographie .....	29
Tabelle 16: analytische HPLC-Systeme.....	30
Tabelle 17: präparative HPLC-Systeme .....	30
Tabelle 18: Säulen für die HPLC .....	31
Tabelle 19: sonstige Geräte.....	32
Tabelle 20: dikaryotische (Dk) und monokaryotische Stämme (Mk) des <i>Pleurotus sapidus</i> .....	34
Tabelle 21: Zusammensetzung der Standardnährlösung (SNL) .....	36
Tabelle 22: Zusammensetzung der Spurenelementlösung.....	36
Tabelle 23: Zusammensetzung des Malzextrakt-Mediums (ME).....	37

Tabelle 24: Zusammensetzung des Malzextrakt-Pepton-Mediums (MEP).....	37
Tabelle 25: Zusammensetzung der Citrus side stream Medien (CSSM) .....	37
Tabelle 26: Nährmedien mit l-Tyrosin- bzw. l-Phenylalanin-Supplementierung.....	37
Tabelle 27: Geradengleichungen von Glucose-Monohydrat aus Orcinol-Schwefelsäure-Assay zur Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes (GGM) der eingesetzten Citrusnebenströme .....	41
Tabelle 28: Heizprogramm der Turbotherm-Aufschlussapparatur.....	42
Tabelle 29: Destillationsprogramm der Destillationsapparatur Vapodest 450 .....	42
Tabelle 30: Lösungen für die Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung der Aminosäuren.....	43
Tabelle 31: chromatographische Parameter zur Bestimmung der Aminosäuren (AS) .....	46
Tabelle 32: Gradienten der Aminosäureanalyse (AS)-Methoden I & II.....	47
Tabelle 33: Zusammensetzung des von der FAO/WHO festgelegten Referenzproteins .....	50
Tabelle 34: Extraktionsparameter der Soxtherm®-Apparatur .....	51
Tabelle 35: GC-FID-Parameter zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung.....	52
Tabelle 36: Parameter der HS-SPME Extraktion .....	54
Tabelle 37: gaschromatographische Parameter zur Analyse der Screening Proben .....	55
Tabelle 38: Auswerteparameter der Chromatogramme der SNL-Proben des Screenings .....	56
Tabelle 39: Ausgewählte Stämme für das Screening in submerser Kultivierung im Citrus side stream Medium (CSSM1) .....	57
Tabelle 40: Auswerteparameter der Chromatogramme der CSSM-Proben des Screenings .....	57
Tabelle 41: GC-MS-Parameter zur Analyse der Extraktionsvergleichsproben (HS-SPME).....	58
Tabelle 42: GC-MS/MS-O Parameter mit TDU und Kaltaufgabesystem der Extraktionsvergleichsproben (DI-SBSE).....	59
Tabelle 43: GC-FID-O Parameter zur Aromaextraktverdünnungsanalyse .....	61
Tabelle 44: GC-MS/MS-O-Parameter zur Analyse der SAFE-Destillate (polare Trennsäule) .....	62
Tabelle 45: GC-MS-Parameter zur Analyse der SAFE-Destillate (unpolare Trennsäule).....	62
Tabelle 46: Parameter zur Bestimmung der exakten Masse mittels ESI-TOF-MS .....	63
Tabelle 47: Zugabe der [7-13C]-p-Anisaldehyd-Stammlösung in Abhängigkeit des Substrates und Kulturtages .....	65

Tabelle 48: GC-MS-Parameter zur Quantifizierung von p-Anisaldehyd mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) .....	66
Tabelle 49: Zusammensetzung des Grundmediums zur Aminosäuresupplementation .....	67
Tabelle 50: Konzentrationen der Supplemente zur Medienoptimierung in Stufe 1.....	67
Tabelle 51: Konzentrationen der Supplemente zur Medienoptimierung in Stufe 2.....	68
Tabelle 52: Zusammensetzung des Umsetzungspuffers (50 mM, pH 7,0).....	70
Tabelle 53: Parameter zur Untersuchung der Einflüsse auf die Bildung von 2-HPP .....	71
Tabelle 54: Parameter der HPLC-PDA Analyse von Natriumpyruvat-Anisaldehyd-Umsetzungen.....	71
Tabelle 55: Gesamtkohlenhydratgehalte der Substrate und deren eingesetzten Anteile im jeweiligen Medium .....	75
Tabelle 56: Gehalt an Stickstoff & Gesamtlipiden im lyophilisierten Fermentationsprodukt CSSM PSA Mk 74.....	77
Tabelle 57: Fettsäureverteilung im lyophilisierten Fermentationsprodukt CSSM PSA Mk 74.....	78
Tabelle 58: Ergebnisse der Elementaranalyse für die Substrate, den daraus hergestellten Medium sowie den daraus hergestellten Fermentationsprodukten .....	78
Tabelle 59: Gesamtaminosäuregehalte und residuale Aminosäuregehalte der Substrate und Medien .....	81
Tabelle 60: Gesamtaminosäuregehalte, Kjeldahlfaktoren und Proteingehalte verschiedener Fermentationsprodukte .....	81
Tabelle 61: Daten zur Beurteilung der Proteinqualität der verschiedenen Fermentationsstufen von CSSM4 PSA Mk 37 .....	82
Tabelle 62: Essential Amino Acid Index (EAAI) und biologische Wertigkeit (BW) der verschiedenen Fermentationsstufen des Substrates CSSM4 mit PSA Mk 37.....	84
Tabelle 63: Einteilung der PSA-Stämme in Geruchskategorien nach Oberflächenkultivierung in Citrus-supplementiertem Medium; 1: muffig, unangenehm, 2: PSA-typisch, jedoch schwach und z. T. mit Fehlnoten, 3: PSA-typisch, 4: waldmeisterartig, Cumarin, krautig und z. T. süßlich; Dk: Dikaryot, Mk: Monokaryot.....	85
Tabelle 64: Ergebnisse der Aromaextraktverdünnungsanalyse von CSSM1 PSA Mk 37 extrahiert mittels LLE/SAFE .....	94

Tabelle 65: Ergebnisse der Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie der Verbindung 48.....	97
Tabelle 66: Konzentration an p-Anisaldehyd in PSA Mk 37 Kulturen in Abhängigkeit des Substrats und des Kulturtages.....	102
Tabelle 67: massenspektrometrische Daten auf polarer Säule des [13C]-Diketons im Vergleich zum nicht substituierten authentischen Standard .....	116
Tabelle 68: Kohlenhydrat/Stickstoff-Verhältnisse von Substraten, Medien und Fermentationsprodukten .....	142

## 1 Einleitung

### 1.1 Industrielle Nebenströme

Um einerseits der Ernährung der wachsenden Weltbevölkerung gerecht zu werden und andererseits die Nachhaltigkeit unserer Güter zu verbessern, beschäftigen sich zahlreiche Wissenschaftler mit der Nutzbarmachung und Wertsteigerung von Agrar- und industriellen Nebenprodukten. Aus dem Agrarbereich bedeutet dies beispielsweise die Verwendung von Weizenstroh in der Bioraffinerie oder als Adsorber für Schwermetalle in Abwasser (Mohan & Singh, 2002; Beisl *et al.*, 2019).

Ein Ansatz um Nebenströme der Agrar- und Lebensmittelproduktion wieder in den Nahrungszyklus einzuführen, ist die Verwertung als Insektenfutter. Als alternative Proteinquelle stoßen letztere aufgrund der geringeren ökologischen Auswirkungen im Vergleich zur herkömmlichen Tierhaltung zunehmend auf größeres Interesse (Oonincx *et al.*, 2010; Broeckx *et al.*, 2021). Weiterhin zeigen Entwicklungen der letzten Jahre, dass beispielsweise Sonnenblumenkernmehl, welches bei der Herstellung von Sonnenblumenöl anfällt, für die Produktion von Crackern genutzt wird (ZBS Food UG, 2023).

Auch die Biotechnologie beschäftigt sich in verschiedensten Applikationen mit den Restprodukten der Lebensmittelindustrie. Durch hohe Gehalte an Kohlenhydraten dienen sie als ideale Substrate für die Fermentation. Zusätzlich enthalten die, oftmals als Abfall bezeichneten, Nebenströme noch zahlreiche bioaktive Inhaltsstoffe, welche von Mikroorganismen, Pilzen oder Enzymen zu verschiedensten Verbindungen umgesetzt werden können. Beispielsweise zeigte die Arbeitsgruppe um Nieter, dass mittels Feruloylsterasen aus *Schizophyllum commune* Ferulasäure aus entstärkter Weizenkleie und Zuckerrübenpektin freigesetzt wird und Kaffee-, Ferula- und *p*-Coumarsäure aus Kaffeepulpe gewonnen werden können (Nieter *et al.*, 2016).

Eine große Menge an Nebenströmen fällt auch in der *Citrus*-verarbeitenden Industrie an. Neben China befinden sich die größten Anbaugelände für Zitruspflanzen in Brasilien, Indien, Mexiko und Spanien. Mit einer Ernte von ca. 160 Mio t im Jahr 2021 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023) haben die Früchte dieser Gattung (*Citrus* L., hauptsächlich Zitrone, Orange, Mandarine und Grapefruit) eine große wirtschaftliche Bedeutung, wobei der Hauptverarbeitungszweig die Getränkeindustrie ist. Neben dem Saft werden dabei auch die ätherischen Öle aus den Schalen der Früchte extrahiert und vermarktet. Übrig bleiben große Mengen an Nebenprodukten wie Schalen, Segmentmembranen und Samen.

Marín *et al.* (2007) haben die Schalenreste verschiedener *Citrus*-Arten hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung untersucht, wobei die Hauptkomponenten Pektin, Cellulose, Hemicellulose und

Lignin waren und deren Gehalte je nach Art variierten (Tabelle 1). Die drei zuletzt genannten Bestandteile bilden zusammen Lignocellulose.

**Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung verschiedener Arten an Citrus Peel Waste (Marín et al., 2007)**

	<b>Lemon Peel Waste</b>	<b>Orange Peel Waste</b>	<b>Satsuma Mandarin Peel Waste</b>	<b>Grapefruit Peel Waste</b>
	[% Trockenmasse]			
<b>Asche</b>	2,5±0,1	2,6±0,1	5,1±0,2	8,1±0,4
<b>Zucker</b>	6,5±0,5	9,6±0,2	10,1±0,5	8,0±0,4
<b>Fett</b>	1,5±0,1	4,0±0,1	1,6±0,1	0,5±0,1
<b>Protein</b>	7,0±0,4	9,1±0,4	7,5±0,2	12,5±0,9
<b>Flavonoide</b>	12,5 ±0,6	4,5 ±0,1	5,1±0,0	3,0±0,0
<b>Pektin</b>	13,0±1,1	23,0±2,1	16,0±1,2	8,5 ±0,7
<b>Cellulose</b>	23,1±2,1	37,1±3,1	22,5±2,2	26,6±2,0
<b>Hemicellulose</b>	8,1±0,8	11,0±1,0	6,0±0,6	5,6±0,4
<b>Lignin</b>	7,6±0,5	7,5±0,6	8,6±0,8	11,6±1,0

Ein bedeutender Zweig der Verwertung dieser Nebenprodukte ist die Herstellung von Bioethanol, wovon zahlreiche Studien der letzten Jahrzehnte zeugen (Wilkins *et al.*, 2007; Oberoi *et al.*, 2010; Widmer *et al.*, 2010; Awan *et al.*, 2013; Boluda-Aguilar & López-Gómez, 2013; Tsukamoto *et al.*, 2013; Santi *et al.*, 2014; Choi *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2015; Patsalou *et al.*, 2019). Für die Herstellung des Ethanol ist jedoch eine thermische oder mechanische Vorbehandlung sowie eine enzymatische oder saure Hydrolyse der *Citrus*-Nebenströme (CSS) notwendig, bevor die eigentliche Fermentation durchgeführt wird. Dies macht den Produktionsprozess aufwendig, wobei andererseits auch D-Limonen als Nebenprodukt anfällt, welches wiederum als Lösungsmittelalternative verwendet werden kann (Golmakani *et al.*, 2014).

## 1.2 Fermentation/Biotechnologie

Eine der ältesten weltweit angewendeten Technologien Lebensmittel zu verarbeiten ist die Fermentation. Neben dem ursprünglichen Zweck der Haltbarmachung wird heutzutage Aspekten wie Aromabildung, Textur und ernährungsphysiologische Vorteile ein großer Stellenwert in der Anwendung beigemessen (Marco *et al.*, 2017). Prominente Beispiele sind Sauerkraut oder das koreanische Pendant Kimchi, sowie Käse, Wein, Bier und Brot, um nur eine kleine Auswahl anzuführen. Verantwortlich für den fermentativen Prozess sind, exemplarisch genannt, Mikroorganismen wie Milchsäurebakterien oder die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* aber auch Pilze wie *Rhizopus oligosporus* (Cheigh & Park, 1994; Caplice & Fitzgerald, 1999; Handoyo & Morita, 2006).

In der Biotechnologie wird zwischen Festbettkultivierung (*Solid-State-Fermentation*, SSF) und Flüssigkultivierung (*Submerged Fermentation*, SmF) unterschieden. Letztgenannte Technologie liefert einheitlichere und reproduzierbarere Biomasse, auch bedingt durch die einfachere Steuerung von Prozessparametern wie pH-Wert-, Temperatur- und Sauerstoffkontrolle (Smith *et al.*, 2002; Farinas, 2015). Jedoch gewinnt in den letzten Jahren immer mehr die Festbettkultivierung vor allem in der Herstellung von Enzymen an Aufmerksamkeit, da der freie Wasseranteil im Medium sehr gering ist und dies mehr den natürlichen Wachstumsbedingungen entspricht. Neben weiteren Vorteilen wie höhere Produktausbeuten, größere Stabilität gegenüber Temperatur- und pH-Wert-Effekten verbraucht die SSF weniger Energie bei der Sterilisation (Farinas, 2015; Wang *et al.*, 2019a). Nachteilig in der Festbettkultivierung sind jedoch das schwierige *Scale-up*, sowie die Inhomogenität verschiedener Produktionsansätze (Hölker & Lenz, 2005; Rodríguez Couto, 2008).

### 1.3 Basidiomycota

Pilze der Abteilung Basidiomycota rücken immer mehr in den Focus der Forschenden auf dem Gebiet der Biotechnologie. Grund dafür ist das Potential, was in den medizinisch genutzten Eigenschaften steckt, daneben aber auch das breite Enzymspektrum, sowie sensorische Merkmale.

Innerhalb aller beschriebenen Pilze bilden ca. 98% das Unterreich der Dikarya, welches in die größere Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilze) und die Basidiomycota (Ständerpilze) unterteilt wird (Hibbett *et al.*, 2007; Stajich *et al.*, 2009). Zu den ersteren zählen bedeutende Hefen- und Schimmelpilze, die in der Lebensmittelproduktion Anwendung finden. Darunter finden sich *Penicillium roqueforti* zur Herstellung von Blauschimmelkäse oder auch *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe, Bierhefe), wobei vor allem die Hefe Gegenstand zahlreicher Laborstudien war und ist (Stajich *et al.*, 2009). Innerhalb der Speisepilze sind insbesondere die hochpreisigen Morcheln und Trüffel dieser Abteilung zugeordnet.

Das Phylum der Basidiomycota umfasst ca. 35.000 Spezies, welche nach Hibbett *et al.* (2007) in drei Subphylen unterteilt werden (*Agaricomycotina*, *Pucciniomycotina* und *Ustilaginomycotina*) (Hibbett *et al.*, 2007; Sandargo *et al.*, 2019). Wie der Name vermuten lässt, gehört die Klasse der *Agaricomycetes* zu den *Agaricomycotina* (ca. 21.000 Spezies) und zeichnet sich durch die Ausbildung auffälliger fleischiger Fruchtkörper aus. Neben Champignon (*Agaricus bisporus*) und Shiitake (*Lentinula edodes*) gehören Vertreter der Pleuroten, primär *Pleurotus ostreatus* (*P. ostreatus*, Austernseitling) und *P. eryngii* (Brauner Kräuterseitling), weltweit zu den am häufigsten kultivierten Speisepilzen (Cohen *et al.*, 2002; Gregori *et al.*, 2007; Royle *et al.*, 2017; Raman *et al.*, 2020; Lin *et al.*, 2022) und werden allesamt der Unterklasse der *Agaricomycetidae* und Ordnung der *Agaricales* zugezählt (Matheny *et al.*, 2006; Royle, 2014; Kalichman *et al.*, 2020).

Neben der Bedeutung als Speisepilze werden die Pilze sowohl als solches in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt als auch das Potential der bioaktiven Verbindungen für verschiedene Applikationen untersucht. Darunter fallen beispielsweise Pleuromutilin-Derivate für Antibiotika, Strobilurine als Fungizide oder Lentinan in der Krebstherapie (Sauter *et al.*, 1999; Novak, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Das Subphylum *Ustilaginomycotina* enthält mit ca. 1700 die kleinste Anzahl an Spezies innerhalb der drei Subphylen. Es umfasst zahlreiche Pflanzenparasiten wie das Maispathogen *Ustilago maydis*, aber auch Vertreter, die bei Tieren oder Menschen zu finden sind (z. B. *Malassezia* spp.), welche in den allermeisten Fällen den Brandpilzen zuzuordnen sind (Kahmann *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2017; Theelen *et al.*, 2018). Rostpilze dagegen sind im Subphylum *Pucciniomycotina* (ca. 8400 beschriebene Spezies) beheimatet, deren Spezies vorwiegend parasitär an Pflanzen, Tieren und Pilzen leben (Aime *et al.*, 2014).

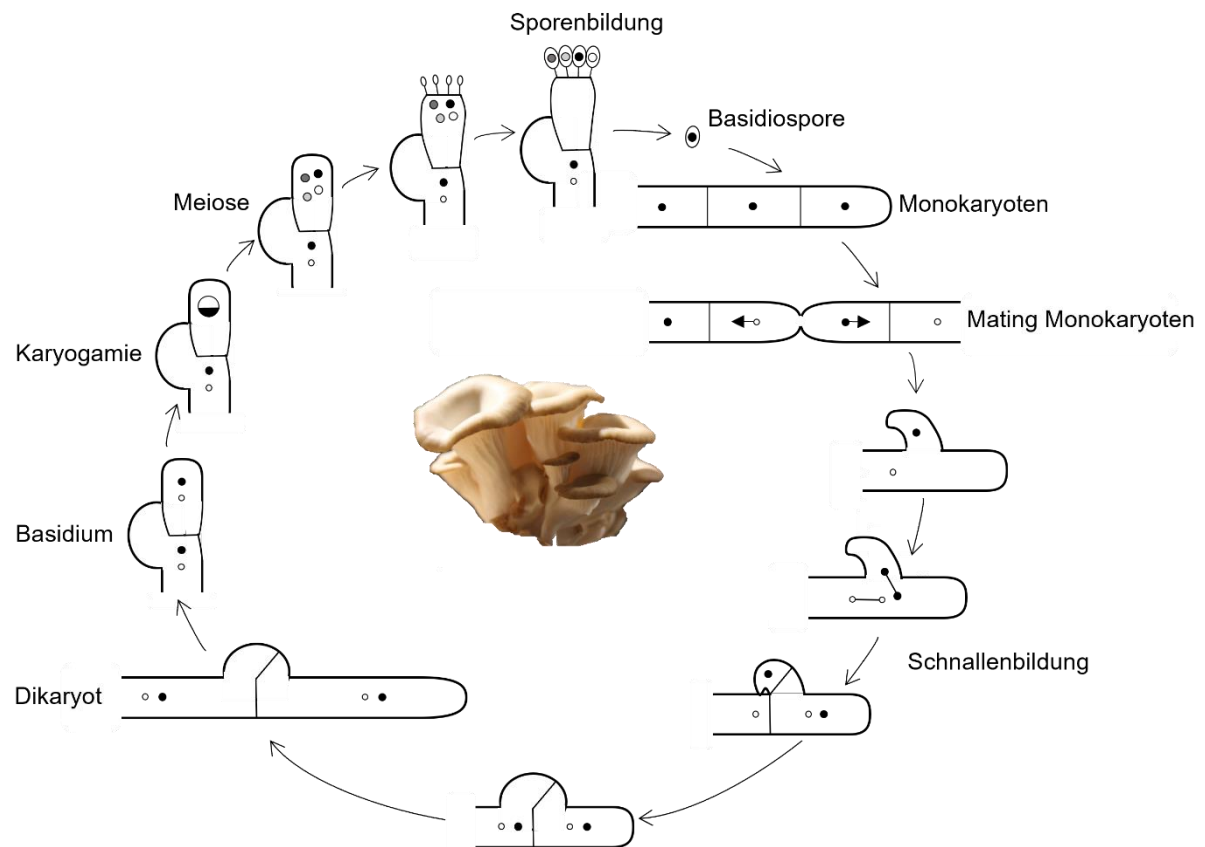
### 1.3.1 Pleuroten

Unter der sehr heterogenen Gattung *Pleurotus* (Seitlinge) gibt es ca. 40 bekannte Spezies, welche in gemäßigten bis tropischen Breiten vorkommen (Patel *et al.*, 2012; Golak-Siwulska *et al.*, 2018). Der große Kultivierungsanteil liegt in den günstigen Nährwerten inklusiver sehr guter organoleptischer Merkmale begründet. Hinzu kommen die zahlreichen medizinisch genutzten Merkmale (z. B. entzündungshemmend, antiviral, antibakteriell, antioxidativ) sowie das gute Wachstum mit hohen Ausbeuten und die recht anspruchslosen Kultivierungsbedingungen (Banik & Nandi, 2004; Gregori *et al.*, 2007). Üblicherweise wird für die Kultivierung strohbasiertes Substrat verwendet, jedoch können die Seitlinge auf einer Vielzahl an Nebenprodukten der Agrarindustrie und lebensmittelverarbeitenden Industrie wachsen (Cohen *et al.*, 2002; Gregori *et al.*, 2007). Neben der Fruchtkörperproduktion wird die Festbettkultivierung in der Herstellung von Tierfutter oder zur Enzymproduktion angewendet. Die Flüssigkultivierung dagegen liefert einheitlichere und reproduzierbarere Biomasse, was im Einsatz für Nahrungsergänzungsmittel oder Medizinprodukte geeigneter ist (Smith *et al.*, 2002).

Ein Vertreter der Seitlinge, welcher Gegenstand zahlreicher Studien beispielsweise zum Enzymsystem oder der Kultivierung auf verschiedenen Medien war und auch in dieser Arbeit betrachtet wird, ist *Pleurotus sapidus* (PSA). Dieser Pilz wird ebenfalls als Speisepilz gezüchtet und zeichnet sich durch beige bis hellbraune muschelförmige Hüte aus. Die häufig als naher Verwandter des *P. ostreatus* bezeichnete Spezies enthält jedoch, laut einer Studie von Yin *et al.* (2019), im Vergleich deutlich niedrige Konzentrationen der für das typische Pilzaroma verantwortlichen C8-Aromastoffe, wie beispielsweise 1-Octen-3-on, was sich im Gesamtaroma zeigt.

### 1.3.2 Lebenszyklus von Pilzen der Abteilung der Basidiomycota

Der Name des Unterreiches der Dikarya zeigt bereits eine besondere Eigenschaft: während des Lebenszyklus entstehen Hyphen mit zwei getrennten Kernen. Dabei unterscheidet sich jedoch die geschlechtliche Fortpflanzung der beiden Schwesterabteilungen voneinander. Charakteristisch für Basidiomycota ist die Ausbildung der namensgebenden, flaschenförmigen Basidien, welche die Meiosporen (bzw. Basidiosporen) bilden. Die Reifung der haploiden Sporen steht am Beginn des Zyklus woraus monokaryotische Hyphen mit, in der Regel, einem Zellkern pro Zelle entstehen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Lebenszyklus von *Pleurotus sapidus* nach (Casselton & Kües, 1994; Heitman et al., 2013; Coelho et al., 2017; Nieuwenhuis & Aanen, 2018)**

Im weiteren Verlauf kann es dann beim Aufeinandertreffen zweier kompatibler Monokaryoten zum Verschmelzen der Cytoplasmen (Plasmogamie) kommen. Da die beiden elterlichen Kerne nicht fusionieren, sondern nebeneinander erhalten bleiben, entsteht ein diploider Chromosomensatz in der Zelle (Dikaryot) (Kües *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2017; Nieuwenhuis & Aanen, 2018). In der Regel sind nur diese Dikaryoten in der Lage, Fruchtkörper auszubilden, wobei jedoch beispielsweise bei *Cyclocybe aegerita* (*Agrocybe aegerita*) und *Schizophyllum commune* auch Fruchtkörper unterschiedlicher Typen aus Monokaryoten beobachtet und untersucht wurden (Esser *et al.*, 1974; Esser & Meinhardt, 1977; Esser *et al.*, 1979; Herzog *et al.*, 2016). Weder für den im weiteren Verlauf der Arbeit betrachteten PSA noch für andere Spezies der Gattung *Pleurotus* wurde dieses Phänomen unter natürlichen Bedingungen bisher beschrieben. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit *P. eryngii* zeigte allerdings, dass durch genetische Veränderung die Ausbildung von Fruchtkörpern aus Monokaryoten gelingen kann, wobei diese jedoch keine Basidiosporen bildeten (Shang *et al.*, 2023).

Während des starken vegetativen Wachstums des dikaryotischen Hyphengeflechts (Myzels) bleiben die beiden unabhängigen parentalen Kerne pro Zelle erhalten. Im Zuge der mitotischen Zellteilung kommt es bei sehr vielen Spezies zur Ausbildung von Schnallen, wobei die Tochterkerne verteilt

werden und die Hyphen in Kompartimente durch Septen geteilt werden (Meinhardt *et al.*, 1990; Kües, 2000; Ramírez *et al.*, 2000).

Wenn die äußeren Bedingungen günstig sind, darunter sind vor allem Hell- und Dunkelphasen entscheidend, kommt es zur Ausbildung von Fruchtkörpern (Kües, 2000) und damit auch zur Ausbildung der Basidien (Teliosporen). Im Anschluss folgt dann die Karyogamie innerhalb des Basidiums mit anschließender Meiose, woraus vier haploide Kerne entstehen, die über die Sporenständer in vier Basidiosporen resultieren und womit der Lebenszyklus erneut beginnt (Meinhardt *et al.*, 1990; Coelho *et al.*, 2017; Nieuwenhuis & Aanen, 2018).

Ca. 90% der Basidiomycota pflanzen sich heterothallisch fort, was eine Zell-Zellfusion zwischen zwei Monokaryoten unterschiedlicher Kreuzungstypen (*mating types*) bedeutet (Kües *et al.*, 2011). Diese bestimmen die Kompatibilität der Zellen und werden im Falle der Dikarya durch den *mating type locus* definiert. Innerhalb der Basidiomycota gibt es *mating-type*-Untersuchungen auf molekularer Ebene zu mindestens drei repräsentativen Spezies: *Coprinopsis cinerea*, *Schizophyllum commune* und *Ustilago maydis*. Diese Spezies sind, wie die allermeisten, tetrapolar, was bedeutet, dass die *mating types* von Allelen an zwei genetisch unabhängigen *mating-types-loci*, *A* und *B loci* bzw. *HD* (Transkriptionsfaktoren) und *PR* (Pheromone und Pheromonrezeptoren) *loci*, kontrolliert werden (Casselton & Olesnicky, 1998; Brown & Casselton, 2001; Lee *et al.*, 2010; Kües, 2015). Die Spezies der Gattung *Pleurotus* haben ebenfalls ein tetrapolares *mating*-System (Eugenio & Anderson, 1968; Anderson *et al.*, 1973; Anderson *et al.*, 1991; James *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2014; Kües, 2015). Monokaryoten mit gleichen Allelen des *HD-locus* und Monokaryoten mit gleichen Allelen des *PR-locus* sind nicht kompatibel, nur wenn beide *loci* unterschiedliche Allele aufweisen, kann aus zwei Monokaryoten ein neuer Dikaryot entstehen (Kües, 2015). Die Monokaryoten der Folgegeneration sind immer eine genetische Variante des elterlichen Dikaryoten, da sie aus der Meiose hervorgehen. Aufgrund der Rekombination des Erbgutes weisen sie allesamt unterschiedliche Merkmale auf. Innerhalb der Monokaryoten, die von einem Dikaryoten stammen, gibt es somit eine sehr große Varianz (Eichlerová & Homolka, 1999).

### 1.3.3 Mono- und Dikaryoten

Um die Ausprägung verschiedener Merkmale zu verbessern, wie beispielsweise höhere Ausbeuten, größere Substrattoleranz, Sporenlosigkeit, höhere Temperaturtoleranzen, Geschmack und Textur des Fruchtkörpers, aber auch eine erhöhte Myzelwachstumsrate oder Enzymproduktion, wurde in den vergangenen Jahren, neben anderen Züchtungsmethoden, der Ansatz verfolgt, gezielt kompatible Monokaryoten zu neuen Dikaryoten zu kreuzen (Eichlerová & Homolka, 1999; Kaur *et al.*, 2008; Del Vecchio *et al.*, 2012; Omarini *et al.*, 2014; Casado López *et al.*, 2017). Da die Handhabung der

Monokaryoten leichter als die der Dikaryoten ist, rücken sie immer mehr in den Fokus der Forschenden, vor allem für Mutagenese, Transformation und Kreuzung zur Bildung neuer dikaryotischer Stämme mit verbesserten Merkmalen im Vergleich zu ursprünglichen Dikaryoten (Herpoël *et al.*, 2000). Außerdem sind die haploiden Zustände während der Langzeitkultivierung stabiler als die Dikaryoten, was für biotechnologische Anwendungen ein bedeutender Faktor ist (Clark & Anderson, 2004).

So hat sich beispielsweise die Gruppe um Casado López *et al.* (2017) mit dem genetischen Profil, Wachstumsraten und der Enzymproduktion in verschiedenen monokaryotischen Stämmen von *Dichomitus squalens* beschäftigt; bei Monokaryoten von *Pycnoborus cinnabarinus* wurden die Laccase-Aktivität untersucht (Herpoël *et al.*, 2000; Lomascolo *et al.*, 2003) und Studien zu *Cyclocybe aegerita* zeigten Unterschiede im Volatilom verschiedener Phasen der mono- und dikaryotischen Fruchtkörperbildung (Orban *et al.*, 2020).

In jüngster Vergangenheit gab es abgesehen von der hier vorliegenden Studie auch eine Reihe an Untersuchungen mit monokaryotischen und/oder neu gebildeten dikaryotischen Stämmen von PSA (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Vergleichende Studien zu mono-(Mk) und dikaryotischen (Dk) Stämmen von *Pleurotus sapidus***

Untersuchte Merkmale	Verwendete Stämme	Quelle
Wachstumsraten in Gegenwart von (+)-Valencen (+)-Valencen-Transformation zu Nootkaton Lipoxygenase-Aktivität	Dk 8266, daraus gebildete 100 Mk, neu gekreuzte Dk (3x74, 31x74, 8x66, 21x8, 66x20, 21x20, 3x88, 4x66, 4x21, 31x88, 37x66)	Omarini <i>et al.</i> , 2014
Nährwertzusammensetzung des Substrates nach Fermentation	Dk 3174, gebildet aus Mk 31 und Mk 74	Omarini <i>et al.</i> , 2019
Fähigkeit zur Entfärbung von Farbstoffen Oxidoreduktaseaktivität Laccase- und Peroxidaseproduktion	Dk 3174, gebildet aus Mk 31 und Mk 74, Mk aus Dk 3174	Postemsky <i>et al.</i> , 2019

**Fortsetzung Tabelle 2**

Untersuchte Merkmale	Verwendete Stämme	Quelle
<b>Phenolprofil</b>	Dk 3174, gebildet aus Mk 31 und Mk 74, MkP6 (= Mk	Pinela <i>et al.</i> , 2020
<b>Bioaktive Eigenschaften</b> (antioxidative, cytotoxische, hepatotoxische, antimikrobielle Aktivität, Stickstoffmonoxidinhibierung)	aus Dk 3174)	
<b>Wachstumsraten</b>	Dk 8266, daraus gebildete 101 Mk	Krahe <i>et al.</i> , 2021
<b>Alkenspaltungsaktivität</b>		
<b>Peroxidaseaktivität</b>		

### 1.3.4 Ligninolytisches Enzymsystem von Basidiomycota

*Pleurotus* spp. leben saprophytisch, was bedeutet, dass sie in der Natur oft in Wäldern auf abgestorbenen Bäumen oder gefällten Baumstämmen zu finden sind (Cohen *et al.*, 2002). Zur Kultivierung der Fruchtkörper dieser Weißfäulepilze wird ebenfalls lignocellulosehaltiges Material verwendet, welches von diesen Organismen abgebaut werden kann. Dieses begründet sich im Vorhandensein des lignolytischen Enzymsystems, d. h. es werden verschiedene Hämperoxidasen und Laccasen (*enzyme commission number* (EC) 1.10.3.2) sekretiert (Eggert *et al.*, 1996; Rühl *et al.*, 2008). Die in den Weißfäulepilzen vorkommenden Peroxidasen lassen sich in Ligninperoxidasen (LiP, EC 1.11.1.14), manganabhängige Peroxidasen (MnP, EC 1.11.1.13), versatile Peroxidasen (VP) und *dye-decolorizing* Peroxidasen (DyP-Typ Peroxidasen, EC 1.11.1.9) unterteilen (Stajic *et al.*, 2004; Liers *et al.*, 2010; Lauber *et al.*, 2017). LiP bauen aufgrund ihres hohen Redoxpotentials vorwiegend nicht-phenolische Strukturen ab, katalysieren aber auch die Oxidation phenolischer Strukturen wie Veratrylalkohol (Morgenstern *et al.*, 2008). MnP oxidieren Mangan(II)-Ionen zu Mangan(III)-Ionen und setzen diese über Chelatkomplexe mit Dicarbonsäuren (z. B. Oxalat oder Malonat) frei. Diese Chelatkomplexe agieren dabei als Redoxvermittler phenolischer Strukturen. VP vereinen die katalytischen Eigenschaften der beiden vorher genannten Enzyme und können sowohl phenolische als auch nicht-phenolische Strukturen oxidieren (Morgenstern *et al.*, 2008; Ruiz-Dueñas & Martínez, 2009; Lambertz *et al.*, 2016). Wie der Name vermuten lässt, sind DyP-Typ Peroxidasen vor allem aufgrund ihres Potentials dafür bekannt, Anthrachinone, Carotinoide und andere Farbstoffe zu oxidieren (Scheibner *et al.*, 2008; Sugano *et al.*, 2009; Hofrichter *et al.*, 2010). Aber vor allem Studien ab der Jahrtausendwende zeigen auch die Oxidationsfähigkeit von DyP-Typ Peroxidasen für Ligninverbindungen sowohl nicht-phenolischer als auch phenolischer Natur (Liers *et al.*, 2010; Liers *et al.*, 2013; Salvachúa *et al.*, 2013; Linde *et al.*, 2021; Sugano & Yoshida, 2021).

Peroxidasen sind generell Wasserstoffperoxid-abhängig (Morgenstern *et al.*, 2008). Aus diesem Grund haben bei *Pleurotus* spp. auch Aryl-Alkoholoxidasen (AAO, EC 1.1.3.7) als extrazelluläre Enzyme eine große Relevanz (Bourbonnais & Paice, 1988; Sannia *et al.*, 1991; Guillén *et al.*, 1992; Camarero *et al.*, 1996). Diese setzen primäre Alkohole zu entsprechenden Aldehyden bzw. Aldehyde zu entsprechenden Säuren um (Ferreira *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010).

Studien zu *P. eryngii* und *Bjerkandera adusta* (*B. adusta*) zeigten, dass durch Aryl-Alkohol-Dehydrogenasen (AAD, EC 1.1.1.90) aromatische Aldehyde zu entsprechenden Alkoholen reduziert werden und durch Aryl-Aldehyd-Dehydrogenasen (AADD, EC 1.2.1.29) erfolgt die Reduzierung von aromatischen Säuren zu den korrespondierenden Aldehyden (Guillén & Evans, 1994; Lapadatescu *et al.*, 2000).

#### 1.4 Basidiomycota in der Biokatalyse

Vor allem im Bereich der SSF finden unter Ausnutzung des ligninolytischen Systems von Basidiomycota verschiedene Agrar- und Industrienebenströme Anwendung als Substrat, wobei auch in der SmF solche Restprodukte zugesetzt werden. Da die Pilz-Substratkombinationen fast endlos scheinen, soll sich hier auf die Gattung *Pleurotus* in Kombination mit Nebenprodukten der Agrar- und lebensmittelverarbeitenden Industrie beschränkt werden.

Ein 2022 veröffentlichter Artikel gibt einen Überblick über die Kultivierung von *P. ostreatus* auf verschiedensten Nebenströmen (Doroški *et al.*, 2022). Daran wird die Vielfalt der zu betrachtenden Aspekte deutlich, sodass hier nur Beispiele gegeben werden können (Tabelle 3). Die Studien konzentrieren sich in weiten Teilen auf das Enzymsystem der Pleuroten, wobei die Aktivitäten von Laccasen, MnP, LiP, Carboxymethylcellulasen bzw. Endo-1,4 $\beta$ -D-glucanasen, Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanasen (Filterpapieraktivität), Xylanasen und Peptidasen analysiert wurden.

**Tabelle 3: Überblick ausgewählter Studien zur Kultivierung von Spezies der Gattung *Pleurotus* auf verschiedenen Nebenströmen**

Spezies	Nebenstrom	SSF/SmF	Hauptgegenstand der Studie	Quelle
<i>P. dryinus</i>	Mandarinen-, Bananen-	SSF, SmF	Enzymaktivitäten	Elisashvili <i>et al.</i> , 2006;
<i>P. ostreatus</i>	Apfelschalen, Blätter der			Elisashvili <i>et al.</i> , 2008
<i>P. tuberregium</i>	Rotbuche, Weizenstroh			
<i>P. ostreatus</i>	Weizenstroh	SSF	Biogas- und Enzymproduktion	Albornoz <i>et al.</i> , 2018
<i>P. eryngii</i>				
<i>P. ostreatus</i>	Bananennebenprodukte	SSF	Enzymaktivitäten	Reddy <i>et al.</i> , 2003
<i>P. sajor-caju</i>	(Blätter, Pseudostämme)			
<i>P. ostreatus</i>	Biertreber	SSF	Nährwertzusammensetzung, Biologische Effizienz	Wang <i>et al.</i> , 2001
<i>P. ostreatus</i>	Kaffeenebenprodukte (Kaffeeschalen, Kaffeeblätter, Kaffeesatz)	SSF	Protein- und Ballaststoffgehalt, Coffein-, Tanningehalt	Fan <i>et al.</i> , 2000
<i>P. ostreatus</i>	Maisstängel	SSF	Nährwertzusammensetzung inkl. Hemicellulose-, Cellulose- und Ligningehalt	Darwish <i>et al.</i> , 2012
<i>P. ostreatus</i>	Feuchter Olivenkuchen	SSF	Enzymaktivitäten, Elementzusammensetzung	Saavedra <i>et al.</i> , 2006

Fortsetzung Tabelle 3

Spezies	Nebenstrom	SSF/SmF	Hauptgegenstand der Studie	Quelle
<i>P. ostreatus</i>	Orangenschalen, Traubenziele, Weizenstroh	SSF	Rohprotein, <i>in vitro</i> Verdaubarkeit, Ligninverlust	Nicolini <i>et al.</i> , 1993
	Tomatentrester	SSF	Enzymaktivitäten, Proteingehalt	landolo <i>et al.</i> , 2011
	Bagasse (Zuckerrohr)	SSF	Laccaseaktivität	Karp <i>et al.</i> , 2015
	Ammonisiertes Maisstroh	SSF	Ergosterol-, Stickstoff-, Lignin-, Cellulose-, Hemicellulosegehalt, <i>in vitro</i> Verdaubarkeit, Aminosäurezusammensetzung, Enzymaktivitäten	Liu <i>et al.</i> , 2016
<i>P. ostreatus</i>	Blattreste nach Lorbeer- und Eucalyptus <i>essential oil</i> - Extraktion	SSF	Fruchtkörperproduktion, Sensorik	Omarini <i>et al.</i> , 2010
<i>P. ostreatus</i>	Blattreste nach Eucalyptus <i>essential oil</i> Extraktion		Volatiles Profil	Omarini <i>et al.</i> , 2016
<i>P. pulmonarius</i>	Restprodukte der gelben Passionsfrucht, Orangenbagasse, Bananenstängel, Ananasschale, Maiskolben, Reisschalen, Bagasse (Zuckerrohr), Weizenstroh		Enzymaktivitäten, Entfärbung	dos Santos Bazanella <i>et al.</i> , 2013
<i>P. pulmonarius</i>	Orangennebenprodukte	SSF	Enzymaktivitäten, Proteingehalt, antioxidative Aktivität	Inácio <i>et al.</i> , 2015
<i>P. sajor-caju</i>	Reisstroh, Weizenstroh, Bananenblätter, Bagasse (Zuckerrohr), Guarbohlenstroh Hirsestroh, Sarkandablätter, Maisstroh, Mangoblätter, Niemblätter, Baumwollsaamen	SSF	Nährwertzusammensetzung, Cellulose-, Hemicellulose-, Ligningehalt	Bisaria <i>et al.</i> , 1987
<i>P. sajor-caju</i>	Reis- und Weizenstroh	SSF	Ausbeute, biologische Effizienz	Zhang <i>et al.</i> , 2002
<i>P. sapidus</i>	Blätter von Radieschen und Blumenkohl, Reis- und Rapsstroh, Erbsenschoten	SSF	Nährwertzusammensetzung, biologische Effizienz	Singh & Singh, 2012

**Fortsetzung Tabelle 3**

Spezies	Nebenstrom	SSF/SmF	Hauptgegenstand der Studie	Quelle
<i>P. sapidus</i>	Reiskleie	SSF	Nährwertzusammensetzung	Omarini <i>et al.</i> , 2019
<i>P. sapidus</i>	Isomaltulosemelasse	SmF	Aromastoffzusammensetzung	Trapp <i>et al.</i> , 2018
<i>P. sapidus</i>	Reis- und Sonnenblumennebenströme	SSF	Bioraffination, Enzymaktivitäten	Postemsky <i>et al.</i> , 2019
<i>P. sapidus</i>	Reis- und Sonnenblumennebenströme	SSF	Phenolische Verbindungen, bioaktive Eigenschaften	Pinela <i>et al.</i> , 2020
<i>P. albidus</i> <i>P. cystidiosus</i> <i>P. djamor</i> var. <i>djamor</i> <i>P. djamor</i> var. <i>roseus</i> <i>P. ostreatus</i> <i>P. pulmonarius</i>	Sägemehl der Weide, Weizenstroh	SSF	Fruchtkörperproduktion	Lechner & Albertó, 2011
<i>P. salmoneostramineus</i> <i>P. sapidus</i> <i>P. sajor-caju</i>	Trester von Apfel, Granatapfel, Aronia, Zuckermelasse	SmF	Vitamin D <sub>2</sub> , Fettsäureprofil, Aminosäureprofil, Glucangehalt, Chitingehalt	Ahlborn <i>et al.</i> , 2019
<i>P. sapidus</i> <i>P. eryngii</i> <i>P. ostreatus</i> <i>P. eous</i>	Apfeltrester, Waffelbruch, Kuchenbruch, Kakaoschalen, Kakaopulver, Kaffeesatz, Weintrester (Gewürztraminer)	SmF	Aromascreening	Bosse <i>et al.</i> , 2013
<i>P. albidus</i>	Biertreber	SSF	Mycoprotein zur Herstellung von Cookies	Stoffel <i>et al.</i> , 2021

## 1.5 *de novo* Synthese und Biotransformation von Aromastoffen

Aromastoffe in Fermentationsprodukten werden durch zwei charakteristische Wege gebildet. Zum einen synthetisiert der Organismus Aromastoffe *de novo* und zum anderen durch Biotransformation (Krings & Berger, 1998; Lomascolo *et al.*, 1999). Soweit bekannt, gibt es für den bedeutendsten Aromastoff Vanillin bisher keine beschriebenen *de novo* Synthesewege für nennenswerten Mengen in Basidiomycota. Durch Biotransformation mittels *Pycnoborus cinnabarinus* kann jedoch diese sehr breit eingesetzte Substanz aus Ferulasäure oder aus Vanillinsäure gewonnen werden, wobei letztere wiederum durch *Aspergillus niger* aus Ferulasäure gebildet wird (Falconnier *et al.*, 1994; Lesage-Meessen *et al.*, 1996). *Pycnoborus cinnabarinus* synthetisiert das an Orangenblüten und Walderdbeeren erinnernde Methylantranilat *de novo* (Gross *et al.*, 1990). Als weiteres Beispiel soll hier 4-(4-Hydroxyphenyl)-butan-2-on (Himbeerketon) genannt werden, welches *de novo* in *Nidula niveo-tomentosa* gebildet wird und dessen Produktion durch Medienoptimierung und Zugabe von Präkursoren gesteigert werden kann (Ayer & Singer, 1980; Berger *et al.*, 1999; Böker *et al.*, 2001). Eine Alternative zur Herstellung des natürlichen Aromastoffes bietet der biotechnologische Ansatz ausgehend von Betulosid, welches in verschiedenen Pflanzen wie der Weißbirke (*Betula alba*) oder dem Ahorn (*Acer spp.*) vorkommt. Das 2-Glycosid wird zunächst hydrolysiert, wobei Betuligenol entsteht. Die anschließende Oxidation führt zum gewünschten Keton (Dumont *et al.*, 1996). Nach derzeitigem Kenntnisstand wurde dieser enzymatische Weg bisher nicht für Basidiomycota beschrieben (Vandamme & Soetaert, 2002; Kosjek *et al.*, 2003; Schrader, 2007).

Studien zu PSA zeigten, dass Verbindungen wie 3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobenzofuran (Dillether) und 3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(3H)-on (Stereoisomere des Weinlactons), aber auch *p*-Anisaldehyd durch den Pilz synthetisiert werden können (Abraham & Berger, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1994; Trapp *et al.*, 2018; Trapp *et al.*, 2019). Daneben gibt es verschiedene nachgewiesene Biotransformationswege dieses Seitlings, wie die Bildung von Carvon aus *R*(+)-Limonen über *trans*- und *cis*-Carveol (Onken & Berger, 1999), die Herstellung von (+)-Nootkaton aus (+)-Valencen (Fraatz *et al.*, 2009) und die Alkenspaltung von *trans*-Anethol zur Bildung von *p*-Anisaldehyd (Krahe *et al.*, 2020).

### 1.5.1 *p*-Anisaldehyd

In Pflanzen kommt *p*-Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd) u. a. in Basilikum, Fenchel, Anis und Estragon vor. Der Aromastoff wurde in Basilikum mit  $15 \mu\text{g g}^{-1}$ , in Fenchel mit  $130 \mu\text{g g}^{-1}$  und in Anis mit  $220 \mu\text{g g}^{-1}$  bestimmt (Lee *et al.*, 2005; Zeller & Rychlik, 2006, 2007). Da der *flavor dilution factor* (FD-Faktor) von *p*-Anisaldehyd in Estragon vergleichsweise gering war, wurde der Gehalt nicht quantifiziert (Zeller & Rychlik, 2007). Auch in Fruchtkörpern verschiedener Pilze wie *Clitocybe odora*

(Grüner Anis-Trichterling) und *Lentinellus cochleatus* (Anis-Zähling) wurde dieser Aromastoff gefunden und war im erstgenannten Vertreter die Hauptkomponente der volatilen Substanzen (Rapior *et al.*, 2002).

*p*-Anisaldehyd sowie Derivate wie die entsprechende Säure oder der Alkohol sind innerhalb der Weißfäulepilze sehr verbreitete Aromastoffe, da die Bildung in direktem Zusammenhang mit dem ligninolytischen Enzymsystem der Pilze gesehen wird (de Jong *et al.*, 1994b; Gutiérrez *et al.*, 1994). Die Arbeitsgruppe um Okamoto beobachtete beispielsweise eine Aryl-Alkohol-Oxidase-Aktivität parallel zur Bildung von *p*-Anisaldehyd in *P. ostreatus* (Okamoto *et al.*, 2002).

Studien anhand anderer Basidiomycota postulierten verschiedene Bildungswege dieses aromatischen Aldehyds und dessen Derivate, ausgehend von den Aminosäuren L-Phenylalanin and L-Tyrosin (Jensen *et al.*, 1994; Krings *et al.*, 1996; Lapadatescu *et al.*, 2000).

Die Aromabeschreibungen dieses Aldehyds sind in der Literatur sehr vielfältig und reichen von anis-, coumarin- und mandelartig über süßlich, balsamisch, sahnig, blumig, Vanille, Marzipan, Kirsch, Mimose und Weißdorn bis zu krautig, holzig und scharf (The Good Scents Company; Díaz-Maroto *et al.*, 2005; Siegmund & Pöllinger-Zierler, 2006; Zeller & Rychlik, 2006; Hasegawa *et al.*, 2014).

### 1.5.2 $\alpha$ -Hydroxyketone

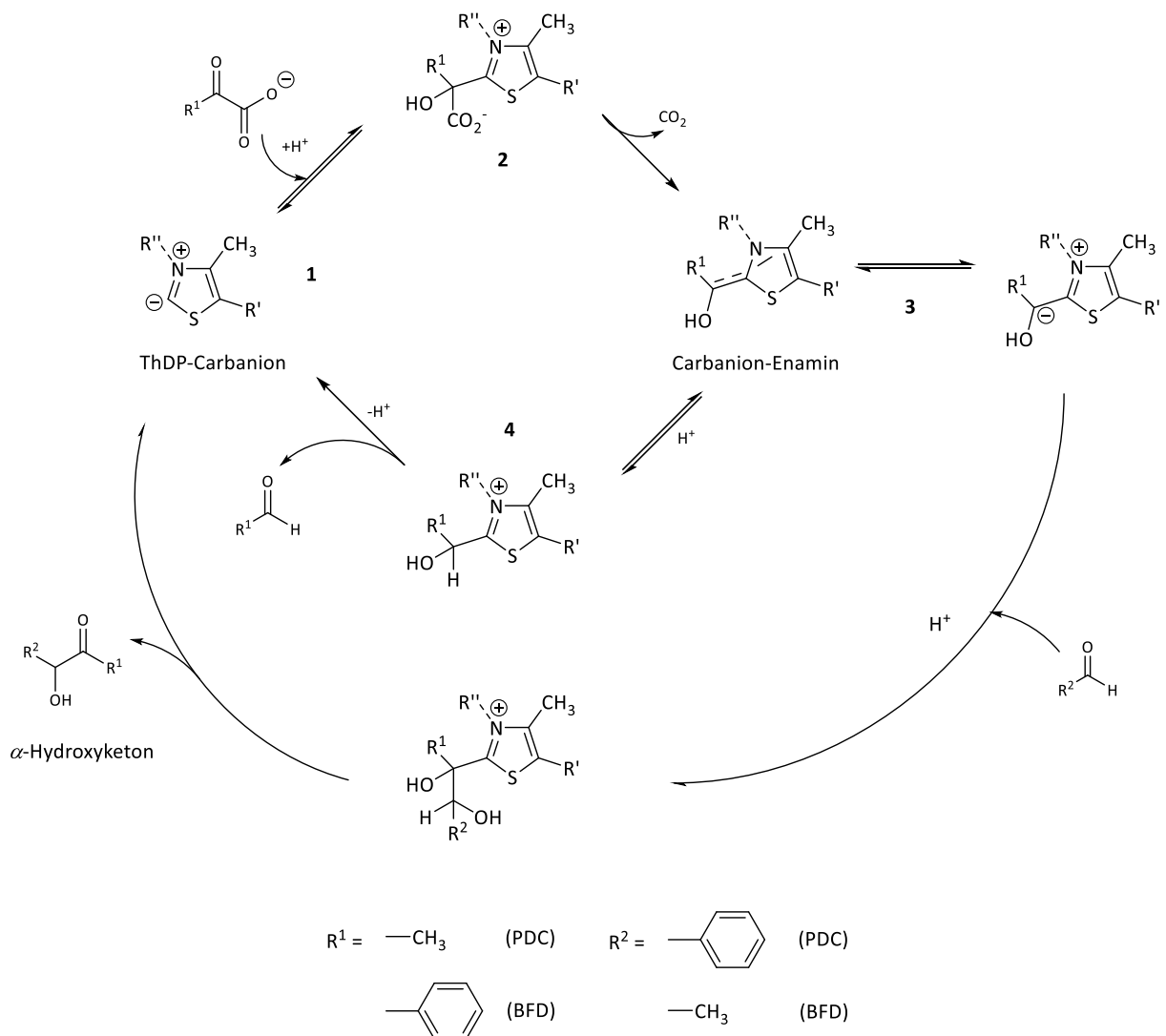
3-Hydroxy-2-butanon ist strukturell das kürzeste  $\alpha$ -Hydroxyketon und wird auch als Acetoin oder Acetylmethylcarbinol bezeichnet. Das Aroma zeichnet sich durch süßlich, buttrige und fettige Noten aus und wird zum Teil auch als fruchtig beschrieben (The Good Scents Company; Hasbullah *et al.*, 2019). Es findet unter anderem als Aromastoff in der Lebensmittelindustrie Anwendung, wobei das Spektrum sehr breit ist und unter anderem Backwaren, Eiscreme und Getränke umfasst (Hall & Oser, 1965; Xiao & Lu, 2014).

In der Natur ist Acetoin sehr weit verbreitet und kommt z. B. in verschiedenen Früchten wie der Erdbeere (Zabetakis & Holden, 1997; Zamorska, 2023), Banane (Aurore *et al.*, 2011) oder Lychee (Chyau *et al.*, 2003) vor. Typischerweise ist es jedoch auch ein Metabolit fermentierter Erzeugnisse, darunter Wein, Bier, Käse und Kakao (Haukeli & Lie, 1975; Postel & Güvenc, 1976; Romano & Suzzi, 1993, 1996; Zeppa *et al.*, 2001; Moens *et al.*, 2014; Xiao & Lu, 2014) und es wurde verschiedentlich als Produkt der Maillard-Reaktion beschrieben (Negroni *et al.*, 2000; Heredia *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2022). Unter den arylischen  $\alpha$ -Hydroxyketonen ist (*R*)-Phenylacetylcarbinol ((*R*)-PAC) sehr bedeutend, welches als chiraler Präkursor in der Synthese von L-Ephedrin Anwendung findet (Hildebrandt & Klavehn, 1932). Bereits 1921 entdeckten Neuberg und Hirsch die Bildung von 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon (= PAC) aus Benzaldehyd in Gegenwart von Hefe (Neuberg & Hirsch, 1921). Die Bildung dieses Moleküls schlossen die Autoren aus der Aktivität einer sogenannten Carboligase. Erste Hinweise

darauf, dass es sich nicht um ein separates Enzym handelt, sondern auf eine Nebenreaktion der Pyruvatdecarboxylase (PDC, EC 4.1.1.1) zurückzuführen ist, gab es ca. 10 Jahre später (Dirscherl, 1931a, 1931b; Langenbeck *et al.*, 1934), was mit Hilfe des isolierten Enzyms auch Ende des 20. Jahrhunderts nachgewiesen wurde (Chen & Jordan, 1984; Bringer-Meyer & Sahm, 1988; Crout *et al.*, 1991).

Der Reaktionszyklus, welcher insbesondere anhand der PDC von *Saccharomyces cerevisiae* und *Zymomonas mobilis* untersucht wurde, geht vom reaktiven Intermediat, dem Thiamindiphosphat (ThDP)-Carbanion **1**, aus, wovon ein nucleophiler Angriff auf die  $\alpha$ -Carbonylgruppe der Ketosäure erfolgt (Abbildung 2). Die anschließende Decarboxylierung führt zum Carbanion-Enamin-Intermediat **3**, dem sogenannten aktiven Aldehyd. Nach Protonierung entsteht Verbindung **4**, woraus ThDP nach Abspaltung des Aldehyds regeneriert wird. In Gegenwart höherer Konzentrationen eines zweiten Aldehyds kann ein nucleophiler Angriff des Carbanions auf den Kohlenstoff der Carbonylgruppe erfolgen woraus schließlich ein  $\alpha$ -Hydroxyketon hervorgeht.

Da der Protonierungsschritt auf **4** reversibel ist, kann das Carbanion-Enamin Intermediat auch in Folge der Addition eines Aldehyds an ThDP mit anschließender Deprotonierung erfolgen. Das bedeutet, dass die Bildung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen von zwei unterschiedlichen Aldehyden oder zwei Molekülen desselben Aldehyds ausgehen kann, unabhängig von der Präsenz der 2-Oxosäuren. In letzterem Fall entsteht unter Beteiligung zweier aromatischer Substanzen ein Benzoin (Pohl, 1997; Iding *et al.*, 1998; Neuser *et al.*, 2000a). Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wurde auch für ein weiteres thiaminabhängiges Enzym beschrieben, der Benzoylformiatdecarboxylase (BFD, EC 4.1.1.7). Unterschiedlich zwischen diesen beiden Biokatalysatoren in der Carboligase-Aktivität sind die jeweiligen Donor- bzw. Akzeptor-Aldehyde. Bei der Bildung von PAC unter Beteiligung einer PDC ist der Donor Pyruvat und der Akzeptor Benzaldehyd. Unter umgekehrten Bedingungen würde unter Beteiligung einer BFD das Tautomer 2-Hydroxy-1-phenyl-1-propanon entstehen (Pohl, 1997; Iding *et al.*, 1998).



**Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der enzymatischen Decarboxylierung und Bildung von aromatischen  $\alpha$ -Hydroxyketonen durch Pyruvatdecarboxylase (PDC) und Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) (Pohl, 1997; Iding et al., 1998; Neuser et al., 2000a)**

Carboligase-Aktivität zeigt auch das thiaminabhängige Enzym Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38). Aromatische Aldehyde reagieren dabei mit Acetaldehyd zu (*R*)-2-Hydroxypropiophenonen (Demir *et al.*, 2002). Mit Acetolactatsynthase (AHAS, EC 2.2.1.6) und Phenylpyruvatedecarboxylase (PhPDC, EC 4.1.1.43) kann die Liste der Enzyme, welche C-C Verknüpfungen katalysieren ergänzt werden (Guo *et al.*, 1999; Demir *et al.*, 2007) (Tabelle 4). Neben einer Thiaminpyrophosphatabhängigkeit besteht bei diesen Enzymen auch eine notwendige Präsenz von divalenten Kationen, wie  $Mg^{2+}$ , welche die Bindung des Enzyms an das jeweilige Substrat koordinieren (Frank *et al.*, 2007; Gocke *et al.*, 2009).

**Tabelle 4: Überblick thiaminabhängiger Enzyme mit Carboligase-Aktivität**

Enzym	Substrat 1	Substrat 2	Produkt
<b>Pyruvatdecarboxylase</b> <b>PDC, EC 4.1.1.1</b>	Pyruvat, Acetaldehyd	z. B. Benzaldehyd	z. B. ( <i>R</i> )-Phenyl-acetylcarbinol
<b>Benzoylformiat-decarboxylase</b> <b>BFD, EC 4.1.1.7</b>	z. B. Benzoylformiat (Benzaldehyd)	z. B. Pyruvat	z. B. ( <i>S</i> )-2-Hydroxy-propiofenon, Benzoin
<b>Benzaldehydlyase</b> <b>BAL, EC 4.1.2.38</b>	z. B. Benzoin, Benzaldehyd	z. B. Acetaldehyd, Benzaldehyd	( <i>R</i> )-2-Hydroxy-propiofenon
<b>Acetolactatsynthase</b> <b>AHAS, EC 2.2.1.6</b>	Acetaldehyd (Pyruvat)	Pyruvat, 2-Ketopyruvat, Benzaldehyd	z. B. ( <i>R</i> )-Phenyl-acetylcarbinol
<b>Phenylpyruvat-decarboxylase</b> <b>PhPDC, EC 4.1.1.43</b>	u. a. Phenylbrenztraubensäure, Indol-3-pyruvatsäure	Acetaldehyd	z. B. 3-( <i>R</i> )-Hydroxy-1-phenyl-2-butanon

## 1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel sich intensiv mit der fermentativen Herstellung aromaaktiver Verbindungen und deren Analytik auseinanderzusetzen.

Im Sinne der Kreislaufwirtschaft sollte dabei für das Nährmedium auf Nebenströme der *Citrus*-verarbeitenden Industrie zurückgegriffen werden, welches zunächst hinsichtlich seiner Hauptnährstoffe analysiert werden sollte. Als Organismen sollten Monokaryoten des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* zum Einsatz kommen und besonders interessante Stämme identifiziert werden. Dabei sollten in einem Screening 60 monokaryotische und 2 dikaryotische Stämme in einem Standard-Flüssigmedium kultiviert und mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert werden. Da ein Hauptaugenmerk auf dem Gesamtaromaprofil lag, sollte zudem eine sensorische Charakterisierung der Oberflächenkulturen dieser Stämme auf *Citrus*-Nebenstrom enthaltendem Medium erfolgen. Dieses Fermentationssystem sollte für interessante Stämme auf die Flüssigkultivierung übertragen werden; mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse sollten nach Flüssig-Flüssigextraktion und *solvent assisted flavor evaporation* (SAFE) Schlüsselaromastoffe in der volatilen Fraktion identifiziert werden. Im Fokus sollte außerdem die Aufklärung der Biosyntheseweg relevanter Aromastoffe über geeignete Supplementationsstudien stehen.

Über die Zusammenarbeit mit den Projektpartnern sollte des weiteren Pilzmyzel in größerem Maßstab zur Futterergänzung von Fischen bereitgestellt werden. Dafür sollte der Prozess in den Pilotmaßstab übertragen und Parameter wie Substratmenge und Kultivierungsdauer angepasst werden.

## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Für die Herstellung der verschiedenen Kultivierungsmedien wurden verschiedene Komponenten verwendet (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Medienbestandteile**

<b>Medienkomponente</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agar-Agar Kobe I</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>L-Asparagin-Monohydrat, <math>\geq 99,5\%</math></b>	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
<b>Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, p.a.</b>	AppliChem
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 99%</b>	AppliChem
<b>D-Glucose-Monohydrat</b>	Carl Roth
<b>Hefeextrakt</b>	Carl Roth
<b>Hefeextrakt (<i>Food Grade</i>)</b>	Th. Geyer (Renningen, Deutschland)
<b>Kaliumdihydrogenphosphat, <math>\geq 98\%</math></b>	Carl Roth
<b>Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, <math>\geq 99\%</math></b>	Carl Roth
<b>Magnesiumsulfat-Hydrat, <math>\geq 99\%</math></b>	Carl Roth
<b>Magnesiumsulfat-Heptahydrat, <math>\geq 99,5\%</math></b>	AppliChem
<b>Malzextrakt</b>	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
<b>Mangan(II)-sulfat-Monohydrat, p.a.</b>	AppliChem
<b>Sojapepton</b>	Sigma-Aldrich
<b>Zink(II)sulfat-Heptahydrat, <math>\geq 99\%</math></b>	AppliChem

Zur Durchführung der im folgenden beschriebenen Experimente kamen verschiedene Lösungsmittel zum Einsatz (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Lösungsmittel**

Substanz	Hersteller		Reinheit	
Acetonitril	Th. Geyer		≥99,9% (HPLC)	
Chloroform	D1	mit	Carl Roth	≥99,8% (HPLC)
Tetramethylsilan (TMS)	(0,03 vol%), stabilisiert mit Ag			
Diethylether	BCH	Brühl-Chemikalien	Ph. Eur.	
	Handel (Brühl, Deutschland)			
Dimethylsulfoxid	Carl Roth		99,5%	
Ethanol	Carl Roth		99,8%	
n-Heptan	Sigma Aldrich			
n-Hexan	Honeywell	(Offenbach, Deutschland)	97%	
Methanol	Sigma Aldrich		99,9%	
n-Pentan	Th. Geyer		99%	
Petrolether, niedrig siedend [35-65°C]	Thermo Fisher (Waltham/MA, USA)			
Propan-1,2-diol	Sigma Aldrich		99,5%	
2-Propanol	Carl Roth		99,8%	

Für die Identifizierung der detektierten Aromastoffe wurden authentische Standards verschiedener Hersteller bezogen (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Referenzverbindungen**

Substanz	Reinheit	Hersteller
Acetaldehyd	99,5%	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
m-Anisaldehyd	97%	Sigma Aldrich
p-Anisaldehyd	>98,0%	Fluka (Seelze, Deutschland)
Anisol	≥99%	Sigma Aldrich
Benzaldehyd	≥99%	AppliChem

Fortsetzung Tabelle 7

Substanz	Reinheit	Hersteller
<i>p</i> -Cymen	>95%	TCI (Zwijndrecht, Belgien)
<i>p</i> -Cymen-8-ol	≥95%	Sigma Aldrich
(2 <i>E</i> )-Dec-2-enal	≥95%	Alfa Aesar (Kandel, Deutschland)
( <i>E</i> )-Dihydrocarvon	98%	Sigma Aldrich
3,4-Dimethoxybenzaldehyd	99%	Alfa Aesar
3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(3 <i>H</i> )-on	k. A.	Nils H. Schebb (Wuppertal, Deutschland)
Hepten-1-en-3-ol	98%	Alfa Aesar
( <i>R</i> )-Limonen	≤100%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
( <i>Z</i> )-Limonenoxid	97%	Sigma Aldrich
Linalool	97%	Acros Organics (Geel, Belgien)
( <i>Z</i> )-Linalooloxid (furanoid)	≥97%	Fluka
<i>p</i> -Methoxybenzylalkohol	98%	Sigma Aldrich
<i>p</i> -Methoxyphenylaceton	≥98%	Acros Organics
1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandion	95%	ChemPUR (Karlsruhe, Deutschland)
<i>p</i> -Methoxypropiophenon	≥99%	Sigma Aldrich
<i>p</i> -Methylacetophenon	95%	Acros Organics
Methyl- <i>p</i> -anisat	>99%	TCI
2-Methyl- <i>n</i> -butanol	98%	Acros Organics
2-Methylbut-3-en-2-ol	≥97,5%	Sigma Aldrich
( <i>E</i> )-Methylcinnamat	≥98,5%	Alfa Aesar
α-Pinen	97%	Fisher Scientific
β-Pinen	≥98,5%	Alfa Aesar
Piperiton	≥98%	Sigma Aldrich
Sabinen	≥98,5%	Carl Roth
Terpinen-4-ol	97%	Acros Organics
α-Terpineol	≥96%	Carl Roth
5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4 <i>H</i> )-benzofuranon	95%	abcr (Karlsruhe)

k. A. keine Angabe

Zur Durchführung der im folgenden beschriebenen Experimente kamen neben den bisher aufgeführten Substanzen weitere Chemikalien zum Einsatz (Tabelle 8).

**Tabelle 8: sonstige Chemikalien**

Substanz	Reinheit	Hersteller
Aminosäurestandard (H-Ox)	k. A.	SYKAM (Fürstenfeldbrück, Deutschland)
Ameisensäure	99-100%	Th. Geyer
[7- <sup>13</sup> C]- <i>p</i> -Anisaldehyd	99,9 atom%; 97%	Toronto Research Chemicals, (Toronto, Kanada)
Borsäure	≥99,8%	Th. Geyer
Citronensäure, wasserfrei	≥99,5%	Carl Roth
Dess-Martin-Periodinan	97%	Fluorochem (Hadfield, UK)
Dikaliumhydrogenphosphat	≥99%	Carl Roth
FAME-Testmischung	k.A.	CS-Chromatographie (Langerwehe, Deutschland)
Isooctan	≥99,8%	Merck
Kieselgel 60		Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Kjeldahlkatalysatortabletten KJELCAT Cu	k.A.	Gerhardt (Königswinter, Deutschland)
Mischindikator nach Sher		Bernd Kraft (Duisburg, Deutschland)
Natriumchlorid	≥99,8%	Carl Roth
Natrium-Citrat-Puffer, 0,12 N, pH 3,45	k. A.	SYKAM
Natrium-Citrat-Puffer, 0,20 N, pH 10,85	k. A.	SYKAM
Natriumdisulfit	≥97%	Carl Roth
Natriumhydroxid	≥98%	Carl Roth
Natriumpyruvat		Sigma Aldrich
Natriumpyruvat-2- <sup>13</sup> C	99 atom% <sup>13</sup> C	Sigma Aldrich
Natriumsulfat (wasserfrei)	≥99%	Carl Roth
Ninhydrin, 0,1 M in Methanol	k. A.	SYKAM
Orcinol	97%	Sigma Aldrich

Fortsetzung Tabelle 8

Substanz	Reinheit	Hersteller
Phenol	p. a. Ph. Eur.	Merck
Salzsäure 37%	technisch	Carl Roth
Salzsäure rauchend 37%	p. a.	Carl Roth
Schwefelsäure 72%	p. a.	AppliChem
Schwefelsäure (98%)		Th. Geyer
Seesand	k. A.	AppliChem
Thiamindiphosphat		Sigma Aldrich
2,2'-Thiodiethanol	≥95%	Sigma Aldrich
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	≥99%	Carl Roth
L-Tryptophan	≥98%	Sigma Aldrich
L-Tyrosin	98%	Merck
L-2-Amino-3-([3,5- <sup>2</sup> H]-4-hydroxyphenyl)-propansäure	98 atom%	Sigma Aldrich

p. a. *pro analysi*

Die gaschromatographischen Analysen wurden unter Verwendung verschiedener Gase durchgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Gase

Gas	Hersteller
Helium, 5.0	Praxair (Ratingen, Deutschland)
Stickstoff, 5.0	Air Liquide (Paris, FR)
Wasserstoff, 5.0	Praxair

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Für die Durchführung der im Folgenden beschriebenen Methoden kamen zahlreiche Verbrauchsmaterialien zum Einsatz (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Verbrauchsmaterial**

Material	Hersteller
Cellulose-Extraktionshülsen, 33 x 80 mm	Lab Logistics Group LLG (Meckenheim, Deutschland)
Faltenfilter MN 615 ¼	Macherey-Nagel
Filzstifthülsen	ratioplast (Schwabach, Deutschland)
Gewindeflasche, ND13, 4 mL, Braunglas	Th. Geyer
Gewindeflasche, ND18, 20 mL, Klarglas	Th. Geyer
Glas-Mikrofaser Pads	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Kurzwindenflasche, ND9, 1,5 mL, Braunglas	Th. Geyer
Kurzwindenflasche, ND9, 1,5 mL, Klarglas	Lab Logistics Group LLG
Küvetten (Polystyrol), 1,5 mL	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroeinsatz, 250 µL für 2 mL Schraubvials	Wicom (Heppenheim, Deutschland)
NMR-Röhrchen	Th. Geyer
Pipettenspitzen, 2-200 µL	SARSTEDT
Pipettenspitzen, 100-1000 µL	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen, 500-5000 µL	Brand
Präzisions-Dispenser-Tips, 1-50 mL	Brand
Petrischalen (Ø 60 mm)	ratiolab (Dreieich, Deutschland)
Petrischalen (Ø 90 mm)	Greiner Bio-One
Probenschalen (Alu-Wägeteller) (Ø 90 mm)	Korff (Oberbipp, Schweiz)
Reaktionsgefäße, 1,5 & 2 mL	Brand
Reaktionsgefäß 2 mL SafeSeal	SARSTEDT
Rollrand-Schnappdeckelglas (50 x 30 mm)	IDL Laborbedarf (Nidderau, Deutschland)
Schraubkappen ND9, PTFE Septum (0,25 mm)	Lab Logistics Group LLG
Schraubkappen ND9, Red Rubber/PTFE Septum (1,0 mm)	Lab Logistics Group LLG

## Fortsetzung Tabelle 10

Material	Hersteller
Schraubkappen ND9, Silikon/PTFE Septum, geschlitzt (1,0 mm)	Machery-Nagel
Schraubkappe ND13	Th. Geyer
Schraubkappe ND18 (magnetisch)	Th. Geyer
Siedesteinchen, Typ A	Gerhardt (Königswinter, Deutschland)
Spritzenfilter CHROMAFIL® PET 45/15 MS (0,45 µm)	Machery-Nagel
Spritzenfilter Nylon (0,45 µm)	Th. Geyer
Zentrifugenröhrchen, 15 mL & 50 mL	Greiner Bio-One

## 2.1.3 Geräte

## 2.1.3.1 Gaschromatographie

Zur gaschromatographischen Analyse mit Flammenionisationsdetektor wurden zwei Systeme genutzt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Gaschromatographische Systeme mit Flammenionisationsdetektor

	GC-FID	GC-FID-O
<b>System</b>	7890 A	7890A
	Agilent Technologies (Waldbronn)	
<b>Autosampler</b>	7683B Sampler	G4513A Sampler
	Agilent Technologies	
<b>Detektoren</b>	Flammenionisationsdetektor (FID)	
	Agilent Technologies	
	Olfactory Detection Port (ODP) 3	
	GERSTEL (Mülheim a. d. Ruhr, Deutschland)	
<b>Software</b>		
<b>Datenaufnahme</b>	GC ChemStation Rev. B.04.01 [481]	

Daneben kamen gaschromatographische Systeme mit massenspektrometrischem Detektor zum Einsatz, wobei bei dem dritten System der *triple* Quadrupol als *single* Quadrupol genutzt wurde (Tabelle 12).

**Tabelle 12: gaschromatographische Systeme mit massenspektrometrischem Detektor**

	GC-MS I	GC-MS II	GC-MS/MS-O
<b>System</b>	7890A	7890B	7890A
	Agilent Technologies		
<b>Autosampler</b>	MultiPurpose Sampler (MPS) 2XL	MPS robotic	MPS 2XL
	GERSTEL		
<b>Detektoren</b>	5975C VL Mass Selective Detector (MSD)	5977B MSD	QQQ 7000B Triple Quadrupole
	Agilent Technologies		
			ODP3 GERSTEL
<b>Software</b>			
<b>Datenaufnahme</b>	MassHunter GC/MS Acquisition (Agilent Technologies)		
	Version B.07.01.1805	B 07.04.2260	Version B.07.01.1805
<b>Datenauswertung</b>	MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies)		
	Version B.06.00	B.07.00	Version B.06.00
	MassHunter Quantitative Analysis (Agilent Technologies)		
	B.07.00	B.07.01	B.07.00
<b>Steuerung</b>	Maestro (GERSTEL)		
<b>Autosampler</b>			
	Maestro 1.4.26.40/3.5	Maestro 1.5.3.36/3.5	Maestro 1.4.26.40/3.5
<b>Datenbank zum Abgleich der Massenspektren</b>	NIST MS Search 2.0 (2011/2014) ( <i>National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg/MD, USA</i> )		

Zur Unterscheidung chiraler Verbindungen wurde die multidimensionale Gaschromatographie genutzt (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Parameter zur Analyse mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC)**

	GC - 1	GC - 2
<b>Gaschromatographen</b>	GC-2010 Plus Gas Chromatographen (Shimadzu Europa, Duisburg, Deutschland)	
<b>Autosampler</b>	AOC-20i Auto Injector (Shimadzu)	
<b>Trennsäule</b>	VF-WAXms	Astec CHIRALDEX™
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), auf 220 °C mit 20 °C min <sup>-1</sup> (23 min)	40 °C (15 min), auf 140 °C mit 20 °C min <sup>-1</sup> (30 min)
<b>Trägergas</b>	He (5.0)	
<b>Injektor &amp; Probenaufgabe</b>	<i>split/splitless</i> -Inlet	
<b>Injektionsvolumen</b>	1 µL	
<b>Injektortemperatur</b>	250 °C	
<b>Liner</b>	FocusLiner®, SGE Analytical Science	
<b>Splitverhältnis</b>	5:1	
<b>FID</b>	Shimadzu	
<b>Heater</b>	250 °C	
<b>Flussrate H<sub>2</sub></b>	40 mL min <sup>-1</sup>	
<b>Flussrate Luft</b>	400 mL min <sup>-1</sup>	
<b>make-up-Gas</b>	N <sub>2</sub> (30 mL min <sup>-1</sup> )	
<b>Transferline-Temperatur</b>	220 °C	
<b>GC - 1 zu GC - 2</b>		
<b>Multi Deans Switch</b>	<i>Heart Cut</i> 24,90 bis 25,00 min	
<b>MS - Parameter</b>	GCMS-QP2010, Shimadzu	
<b>Ionisierungsenergie</b>	70 eV	
<b>Temperaturen</b>	Ionenquelle: 200 °C, Quadrupol: 150 °C, Transferline: 220 °C	
<b>scan Massenbereich</b>	<i>m/z</i> 33-300	
<b>Software</b>	MDGCsolution Version 2.72 (Shimadzu)	

Die Trennung der mittels Gaschromatographie analysierten Verbindungen erfolgte mittels Kapillarsäulen (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Kapillarsäulen für die Gaschromatographie**

Bezeichnung	Polarität	Maße (Länge, Innendurchmesser, Filmdicke)	Hersteller
DB-5ms	unpolar	30 m x 250 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
HP-INNOWax	polar	30 m x 320 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
VF-WAXms	polar	30 m x 250 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
VF-WAXms	polar	30 m x 320 µm x 0,25 µm	Agilent Technologies
Astec CHIRALDEX™		30 m x 250 µm x 0,12 µm	Supelco St. Louis, USA

Des Weiteren wurden bei der gaschromatographischen Analyse weitere Materialien benötigt (Tabelle 15).

**Tabelle 15: sonstiges Zubehör für die Gaschromatographie**

Komponente	Hersteller
Flüssigliner, 4 mm ID	Th. Geyer
Kaltaufgabesystem KAS 4	GERSTEL
Glasliner (TDU)	GERSTEL
Glasverdampferrohr mit silanisierter Glaswatte	GERSTEL
Mehrfachmagnetrührer für Twister™	Thermo Electron Corporation (Waltham, US)
SPME-Faser PDMS/DVB, 65 µm Schichtdicke	Supelco
SPME-Liner	Supelco
Thermodesorptionseinheit TDU 2	GERSTEL
Tube Conditioner TC 2	GERSTEL
Twister™, PDMS beschichtet, 10 mm Länge, 0,5 mm Filmdicke	GERSTEL

### 2.1.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) kamen analytische (Tabelle 16) und präparative Systeme (Tabelle 17) zum Einsatz.

**Tabelle 16: analytische HPLC-Systeme**

Modul/Parameter	Analytisches System I	Analytisches System II
System(controller)	CBM-20A, Shimadzu	AZURA, Knauer (Berlin)
Degasser	DGU-20A5R, Shimadzu	
Pumpe	LC-20AD, Shimadzu	P4.1S, Knauer
Autosampler	SIL-20AC HT, Shimadzu	
Säulenofen	CTO-20AC, Shimadzu	
Detektor	Photodiodenarray-Detektor, SPD-M20A, Shimadzu	Diodenarray-Detektor, DAD 2.1L, Knauer
Software	LabSolutions Version 5.93	ClarityChrom

**Tabelle 17: präparative HPLC-Systeme**

Modul/Parameter	Präparatives System I	Präparatives System II
System	AZURA, Knauer	Young Lin
Degasser		300p, ERC
Druck		10,7 kPa
Pumpe	P6.1L	YL9110S, Young Lin (Anyang, Südkorea)
Flussrate	8 mL min <sup>-1</sup>	15 mL min <sup>-1</sup>
Modus		isokratisch
Eluent A	Acetonitril (50%)	
Eluent B	Reinstwasser (50%)	
Eluentenzusammensetzung		<i>n</i> -Hexan/2-Propanol (99/1; v/v)
Injektionsvolumen	5 mL	1,5 mL
Temperatur	RT	RT
Ultraviolett/visible (UV/VIS)- Detektor	UVD 2.1S	YL9120S, Young Lin
Wellenlänge(n)	294 nm	230 nm, 265 nm

Fortsetzung Tabelle 17

Modul/Parameter	Präparatives System I	Präparatives System II
Fraktionssammler	Foxy R1	CHF122SC, Advantec
Fraktionsvolumen	5 mL	5 mL
Software	PurityChrom® 5.09.115	YL-Clarity 3.0.4.444

Die Trennung der mittels HPLC gemessenen Proben erfolgte im Wesentlichen anhand von Normalphasen und/oder *Reversed Phase* Säulen (Tabelle 18).

Tabelle 18: Säulen für die HPLC

Bezeichnung	Trennsäule/ Vorsäule	Phase	Anwendung	Maße (Länge x Innendurchmesser, Porenweite)	Hersteller
<b>Nucleosil C18</b>	Trennsäule	<i>Reversed Phase</i>	Analytische HPLC	250 mm x 4 mm, 5 µm	Macherey-Nagel
<b>Nucleosil</b>	Vorsäule	<i>Reversed Phase</i>	Analytische HPLC	4 mm x 3 mm	Macherey-Nagel
<b>Nucleodur 100</b>	Trennsäule	<i>Normal Phase</i>	Analytische HPLC	250 mm x 4,6 mm, 5 µm	Macherey-Nagel
<b>Nucleodur</b>	Vorsäule	<i>Normal Phase</i>	Analytische HPLC	4 mm x 3 mm	Macherey-Nagel
<b>Chiralpak® IC</b>	Trennsäule	Immobilisierte Phase	Analytische HPLC	250 mm x 4,6 mm	Daicel Chiral Technologies (Illkirch Cedex, FR)
<b>Nucleosil 100</b>	Trennsäule	<i>Reversed Phase</i>	Präparative HPLC	250 mm x 16 mm, 7 µm	Macherey-Nagel
<b>Nucleosil C18</b>	Vorsäule	<i>Reversed Phase</i>	Präparative HPLC	10 mm x 16 mm	Macherey-Nagel
<b>Nucleodur 100</b>	Trennsäule	<i>Normal Phase</i>	Präparative HPLC	250 mm x 21 mm	Macherey-Nagel
<b>Nucleodur</b>	Vorsäule	<i>Normal Phase</i>	Präparative HPLC	10 mm x 16 mm	Macherey-Nagel

### 2.1.3.3 Sonstige Geräte

Die Durchführung der nachfolgend beschriebenen Experimente erfolgte unter Verwendung weiterer Geräte (Tabelle 19).

**Tabelle 19: sonstige Geräte**

Gerät	Hersteller
Adapter für Präzisions-Dispenser-Tips	Brand
Analysenwaage Adventurer AX224	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz)
Analysenwaage BP 211D	Sartorius, Göttingen
Analysenwaage Extend	Sartorius
Analysenwaage Si-234A	Denver Instrument (Denver/CO, USA)
Aminosäureanalysator S433	SYKAM (Fürstenfeldbrück, Deutschland)
Aufschlussapparatur (TURBOTHERM) mit Absaugvorrichtung (TURBOSOG)	Gerhardt
Autoklav Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik (Schloss Detzel, Deutschland)
Autoklav Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik
Automatische Titrationseinheit TitroLine 5000	SI Analytics (Mainz, Deutschland)
Avance II NMR 400 MHz	Bruker (Billerica/MA, USA)
Avance III NMR 400 MHz HD	Bruker
BAENG Destillationseinheit	Bahr (Manching, Deutschland)
CHN-Analysator, FlashEA – 1112 Series	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Feuchtebestimmer MA35	Sartorius
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LDplus und Alpha 1-4 LSCbasic	Martin Christ (Osterode am Harz, Deutschland)
Grobwaage Atilon AccuLab	Sartorius
Grobwaage AX6202	Sartorius
Heizblock HLC Cooling ThermoMixer MKR 13	DITABIS – Digital Biomedical Imaging Systems AG (Pforzheim, Deutschland)

Fortsetzung Tabelle 19

Gerät	Hersteller
Hochvakuumpumpe	Pfeiffer Vacuum (Aßlar, Deutschland)
Inkubationsschrank IPP 5000	Memmert (Schönaich, Deutschland)
Inkubationsschrank HERAtherm	Thermo Fisher Scientific
Inkubationsschüttler Minitron	Infors (Einsbach, Deutschland)
Kälte-Umwälzthermostat Minichiller	Peter Huber Kältemaschinenbau (Offenburg, Deutschland)
Kolbenhubpipetten PEQ-20E, PEQ-200E, PEQ-1000E	peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Kolbenhubpipette D-5000	Brand
Magnetrührer Hei-Standard	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
Mehrfachdispenser Handy Step®	Brand
Mehrfachdispenser Handy Step® S	Brand
Mikroskop VHX-2000 & Objektiv VH-Z250R	KEYENCE Deutschland (Neu-Isenburg, Deutschland)
Multifunktions-Küchenmaschine Thermomix® TM5	Vorwerk (Wuppertal, Deutschland)
Ofen Bosch HCE8544.0	Robert Bosch Haushaltsgeräte (München, Deutschland)
Orbitalschüttler Orbitron	Infors
pH-Meter Seven-Easy	Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland)
Photometer SPECORD	Analytik Jena (Jena, Deutschland)
Polarimeter P-2000	JASCO (Pfungstadt, Deutschland)
Reinstwasseranlage Arium® 611VF	Sartorius
Rotationsinkubator Rotator SB3	Stuart (Staffordshire, UK)
Rotationsverdampfer Rotavapor R-300	Büchi (Flawil, Schweiz)
Soxtherm®-Extraktionseinheit SOX 416 Makro	Gerhardt
Ultratiefkühlgerät Forma™ 900 Series	Thermo Fisher Scientific
Ultra-Turrax Dispergierstab T25	IKA (Staufen)
Vakuumpumpe Drehschieberpumpe 302102	ILMVAC (Ilmenau, Deutschland)

**Fortsetzung Tabelle 19**

Gerät	Hersteller
Vakuumpumpe PC 3004 VARIO	VACUUBRAND (Wertheim, Deutschland)
Vakuumpumpe RZ 6	VACUUBRAND
VAPODEST 450 Destillationsapparatur	Gerhardt
Vortex-Schüttler VTX-3000L	LMS Co. (Tokyo, Japan)
Wärme-Umwälzthermostat	JULABO
Wärme-Umwälzthermostat	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Allegra X-15-R	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)

**2.1.4 Mikroorganismen**

Der dikaryotische Stamm (Dk) von *Pleurotus sapidus* (PSA, DSM No. 8266) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen des Leibniz Instituts Braunschweig (DSMZ) bezogen. 30 monokaryotische Stämme (Mk), erhalten aus den Basidiosporen dieses Dk, ein zweiter Dk (Dk 3174) und daraus 30 weitere gebildete Mk (Sammlung No. 343) wurden vom Institut für Lebensmittelchemie (LCI) der Leibniz Universität in Hannover zur Verfügung gestellt (Omarini *et al.*, 2014; Postemsky *et al.*, 2019) (Tabelle 20).

**Tabelle 20: dikaryotische (Dk) und monokaryotische Stämme (Mk) des *Pleurotus sapidus***

1. Generation (Dk)			2. Generation (Dk 3174)		
Mk 1	Mk 33	Mk 70	Mk 101	Mk 125	Mk 217
Mk 2	Mk 34	Mk 74	Mk 103	Mk 126	Mk 219
Mk 5	Mk 37	Mk 78	Mk 106	Mk 127	Mk 223
Mk 13	Mk 38	Mk 82	Mk 107	Mk 129	Mk 225
Mk 15	Mk 41	Mk 85	Mk 108	Mk 132	Mk 226
Mk 19	Mk 45	Mk 88	Mk 113	Mk 201	Mk 228
Mk 27	Mk 49	Mk 90	Mk 115	Mk 203	Mk 229
Mk 28	Mk 55	Mk 93	Mk 117	Mk 209	Mk 232
Mk 31	Mk 57	Mk 96	Mk 119	Mk 214	Mk 233
Mk 32	Mk 60	Mk 100	Mk 124	Mk 216	Mk 234

### 2.1.5 Substrate

Im Verlauf der Studien wurden insgesamt vier Substrate verwendet. *Citrus side stream 1* (CSS<sub>1</sub>) stammte ebenso wie *Citrus side stream 2* (CSS<sub>2</sub>) aus Spanien und wurde von der Firma Fruit Tech Natural zur Verfügung gestellt. Entsprechend den Begleitinformationen handelte es sich dabei jeweils um *Lemon Peel Waste*. Das Material wurde gefroren geliefert, anschließend am Institut gefriergetrocknet und schließlich zerkleinert. *Citrus side stream 3* (CSS<sub>3</sub>, *Orange Peel Waste*) wurde durch die argentinischen Projektpartner bereits lyophilisiert zur Verfügung gestellt und bei *Citrus side stream 4* (CSS<sub>4</sub>) handelte es sich um Orangenschalen, welche vom regionalen Wochenmarkt bezogen wurden. Diese wurden tiefgefroren, direkt vor der Verwendung schonend aufgetaut und anschließend als feuchtes Material, soweit nicht anders angegeben, für die Experimente eingesetzt.

## 2.2 Allgemeine Kulturführung von Pilzen

### 2.2.1 Medienzusammensetzung

Die Kultivierung der Pilze erfolgte mit den in Tabelle 21 bis Tabelle 26 dargestellten Medien. Nach dem Einwiegen der relevanten Bestandteile wurden diese mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) aufgefüllt und autoklaviert (121 °C, 20 min). Wenn Glucose ein Bestandteil des Mediums war, wurde diese in einem geringen Volumen VE-Wasser vorgelöst und separat autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden beide Lösungen unter sterilen Bedingungen zusammengegeben und mit autoklaviertem VE-Wasser auf das entsprechende Zielvolumen aufgefüllt. Für die emerse Kultivierung wurde festes Medium hergestellt, indem diesem Agar-Agar [ $15 \text{ g L}^{-1}$ ] hinzugefügt wurde und das warme Medium nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen wurde.

**Tabelle 21: Zusammensetzung der Standardnährlösung (SNL)**

Komponente	Konzentration [ $\text{g L}^{-1}$ ]
D-Glucose-Monohydrat	30
L-Asparagin-Monohydrat	4,5
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5
Hefeextrakt	3,0
	Konzentration [ $\text{mL L}^{-1}$ ]
Spurenelement-Lösung (Tabelle 22)	1

Die Standardnährlösung (SNL) wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M Natriumhydroxidlösung auf pH 6,0 eingestellt.

**Tabelle 22: Zusammensetzung der Spurenelementlösung**

Komponente	Konzentration [ $\text{mg L}^{-1}$ ]
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	5
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	80
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	90
Mangan(II)-sulfat-Hydrat	30
EDTA	400

**Tabelle 23: Zusammensetzung des Malzextrakt-Mediums (ME)**

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Malzextrakt	20

**Tabelle 24: Zusammensetzung des Malzextrakt-Pepton-Mediums (MEP)**

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
Malzextrakt	30
Sojapepton	3

Das Malzextrakt-Pepton-Medium (MEP) wurde vor dem Autoklavieren mit 1 M NaOH-Lösung auf pH 5,6 eingestellt.

**Tabelle 25: Zusammensetzung der Citrus side stream Medien (CSSM)**

Komponente	CSSM <sub>1</sub>	CSSM <sub>2</sub>	CSSM <sub>3</sub>	CSSM <sub>4</sub>
	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]			
D-Glucose-Monohydrat			3 g	
Substrat	17,4	39,1	14,7	71,8
Kaliumdihydrogenphosphat			1,5	
Magnesiumsulfat-Hydrat			0,5	
Hefeextrakt			0,3	
	Konzentration [mL L <sup>-1</sup> ]			
Spurenelement-Lösung (Tabelle 22)			1	

Die Medien mit CSS wurden vor dem Autoklavieren mit 4 M oder 6 M NaOH-Lösung jeweils auf pH 6,0 eingestellt.

**Tabelle 26: Nährmedien mit L-Tyrosin- bzw. L-Phenylalanin-Supplementierung**

Komponente	NM <sub>Tyr</sub>	NM <sub>Phe</sub>
	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	
D-Glucose-Monohydrat		15 g
Aminosäure		
L-Tyrosin	6,0	

Fortsetzung Tabelle 26

Komponente	NM <sub>Tyr</sub>	NM <sub>Phe</sub>
	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]	
L-Phenylalanin		1,875
Kaliumdihydrogenphosphat		1,5
Magnesiumsulfat-Hydrat		0,5
Hefeextrakt		0,3
	Konzentration [mL L <sup>-1</sup> ]	
Spurenelement-Lösung (Tabelle 22)		1

### 2.2.2 Stammhaltung

Nachdem die beiden parentalen dikaryotischen Stämme und die 60 monokaryotischen Stämme von dem Projektpartner erhalten wurden, wurden diese als Agar-Plattenkulturen bei 4°C gelagert, bei Bedarf ein Quadrat mit einer Kantenlänge von 0,5 cm ausgestochen und bei 24 °C bis zu einem Myzelwachstum von mindestens 80%iger Oberflächenbedeckung inkubiert. Von den Stämmen, welche sich nach dem Screening als interessant herausstellten, wurden mit Hilfe eines Korkbohrers kleine Myzel-bewachsene Agarstückchen ausgestochen und in 10%iger Glycerollösung bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurde ein Myzelstück des jeweiligen Stamms auf eine neue Agar-Plattenkultur überführt und bei 24°C bis zu einer Oberflächenbedeckung von mindestens 80% inkubiert. Bevor der Pilz für die submerse Kultivierung genutzt wurde, wurde mindestens noch einmal auf eine neue Agar-Platte umgesetzt und inkubiert.

### 2.2.3 Submerse Kultivierung

Die PSA-Stämme (2.1.4) wurden entweder auf SNL-Agar-Platten (Fraatz *et al.*, 2014) oder ME-Agar-Platten gehalten.

#### 2.2.3.1 Vorkultur

Für die Vorkultur wurde ein Quadrat mit einer Kantenlänge von 0,5 cm am Rand der Wuchszone der zu mindestens 80% bewachsenen Platte ausgestochen, in einen Erlenmeyerkolben überführt (40% Mediumvolumen, v/v) und anschließend mittels Ultra Turrax bei 10.000 rpm für 30 s homogenisiert. Als Vorkulturmedium wurde entweder Malzextrakt-Pepton-Medium oder SNL genutzt. Die Pilzkulturen wuchsen bei 24 °C und 150 rpm auf einem Orbitalschüttler in der Dunkelheit für, in der Regel, 6 Tage (SNL) oder 4 Tage (MEP).

### 2.2.3.2 Hauptkultur

Für die Hauptkultur wurde das entsprechende Medium mit 10% (v/v) der homogenisierten Vorkultur (2.2.3.1) (10.000 rpm, 30 s) in einem Erlenmeyerkolben (40% Kulturmedium, v/v) inokuliert. Die Kultur wuchs unter den o. g. Bedingungen für bis zu 10 Tage.

## 2.3 Kultivierung von monokaryotischen Stämmen von PSA als *Food Grade Material*

In Kooperation mit den Projektpartnern (JUB und Argentinien) sollte das fermentierte Substrat (2.1.5) zur Futterergänzung von Fischen in Argentinien eingesetzt werden. Dafür erfolgte die Fermentation durch ausgewählte Mk des PSA, soweit nicht anders angegeben, in *Food Grade* Qualität.

### 2.3.1 Submerse Kultivierung im Schüttelkolben

Als Organismus für die Kultivierung wurde zunächst Mk 74 des PSA ausgewählt. Von einer zu 80% bewachsenen SNL-Plattenkultur (2.2.3) wurden Vorkulturen im 500 mL Erlenmeyerkolben angelegt. Nach Inkubation dieser (24 °C, 150 rpm, Dunkelheit) für 8 d erfolgte eine Homogenisierung (1 min), das Vereinen der Ansätze und die Inokulation der Hauptkultur im 2 L Erlenmeyerkolben (2.2.3.2). Für diesen Ansatz wurde CSSM<sub>1</sub> entsprechend Tabelle 25 verwendet. Aufgrund begrenzter Verfügbarkeiten wurde jedoch auch CSS<sub>2</sub> in gleicher Menge (17,4 g L<sup>-1</sup>) bei unveränderter Zusammensetzung des restlichen Mediums eingesetzt. An Tag 5 der Kultivierung (24 °C, 150 rpm, Dunkelheit) wurden die festen Bestandteile von der Kulturbrühe getrennt, indem sie über einem Nyonsieb abgossen wurden. Die Biomasse wurde mit Trinkwasser gewaschen, bei -20 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Dieses Material wurde den Projektpartnern in Argentinien als Studienmaterial zur Verfügung gestellt. Weitere Ansätze unter gleicher Vorgehensweise wurden unter Verwendung von CSSM<sub>2</sub> und CSSM<sub>3</sub> (Verwendung von 1 und 5 L Erlenmeyerkolben) (Tabelle 25) fermentiert, wobei die Biomasse aus CSSM<sub>2</sub> vorwiegend Verwendung in der grundanalytischen Charakterisierung, d. h. in der Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl, der Bestimmung des Gesamtfettes, der Fettsäureverteilung, der Elementaranalyse und der Aminosäureanalytik fand. Die Biomasse, welche aus CSSM<sub>3</sub> generiert wurde, wurde in der Hauptsache den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Um den Vergleich zu den Fermentationen in den Bioreaktoren zu haben, wurden parallel entsprechende Ansätze auch im 250 mL-Schüttelkolben gefahren. Dabei wurde CSSM<sub>4</sub> genutzt (Tabelle 25), wobei auch hier, wie bei der Maßstabsvergrößerung, der berechnete Substratanteil bei gleichzeitiger Erhöhung des Glucose-Anteils auf 6,65 g L<sup>-1</sup> auf 5% gesenkt wurde. Desgleichen wurde Mk 37 verwendet.

### 2.3.2 Maßstabsvergrößerung im 7,5-L-Bioreaktor

Für die weitere Maßstabsvergrößerung erfolgte die Fermentation in einem 7,5-L-Bioreaktor (Labfors 3, Infors, Einsbach). Hierfür wurde PSA Mk 37 verwendet, da dieser sich auch als geeigneter Kandidat für die Aromastoffgenese herausstellte. Abweichend vom Vorgehen bei den Hauptkulturen im Schüttelkolben wurde der pH-Wert sowohl vor dem Autoklavieren auf pH 6,0 (4 bzw. 6 M NaOH-Lösung) eingestellt als auch anschließend auf diesem pH-Wert nachreguliert, da der pH-Wert durch den Sterilisationsvorgang und das enthaltene *Citrus*-Substrat deutlich abgesenkt wurde. Für diesen Ansatz wurde CSSM<sub>4</sub> (Tabelle 25) verwendet, wobei jedoch im Verlauf des Optimierungsprozesses der Substratanteil auf 5% gesenkt und der Glucose-Anteil dementsprechend auf 6,65 g L<sup>-1</sup> erhöht wurde. Das Gesamtmediumvolumen im Bioreaktor betrug 4 L und es wurde standardmäßig mit 10% der SNL-Vorkultur inokuliert. Die Fermentation wurde bei einer Rührergeschwindigkeit (Schrägblattrührer) von 200 rpm, 24 °C und einer Belüftungsrate von 0,3 *vessel volume per minute* (vvm) Druckluft (sterilfiltriert, PTFE Membranfilter, 0,2 µm, Midisart 2000, Sartorius) für 10 Tage durchgeführt. Die Ernte des Pilzmyzels erfolgte entsprechend der in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Vorgehensweise.

### 2.3.3 Maßstabsvergrößerung im 150-L-Bioreaktor

Die Fermentation im Pilotmaßstab wurde in einem 150-L-Bioreaktor (Biostat D 100, B. Braun International, Melsungen) mit 80 L Nährmedium durchgeführt.

Als Hauptkulturmedium wurde die zuvor in Abschnitt 2.3.3 beschriebene Medienzusammensetzung gewählt. Nach dem Sterilisationsvorgang wurde die Glucoselösung zugepumpt, der pH-Wert auf 6,0 angepasst (6 M NaOH-Lösung) und anschließend inokuliert. Um den Prozess industrienäher zu gestalten, wurde das Inokulum in Vergleich zur Standardvorgehensweise auf 5% reduziert. Dafür wurde die Vorkultur von PSA Mk 37 zweistufig angelegt, d.h. es wurde mit dem Maßstab des 250 mL Erlenmeyerkolbens (2.2.3.1) begonnen und von diesem ausgehend eine weitere Vorkultur im 1-L-Maßstab angelegt (ebenfalls in SNL für 6 d).

Die Kultivierung erfolgte bei 200 rpm, einer Belüftungsrate von 2,0 L min<sup>-1</sup> und 24 °C für 10 Tage. Das Fermentationsprodukt wurde auf die in Abschnitt 2.3.1 beschriebene Weise geerntet, lyophilisiert und den argentinischen Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Charakterisierung von Substraten, Medien und Fermentationsprodukten

### 2.4.1 Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay

Die Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes der erhaltenen Substrate (2.1.5) erfolgte mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay (Chaplin & Kennedy, 1994). Ca. 10 mg der lyophilisierten Probe wurden in ein 2 mL *SafeSeal Tube* eingewogen, mit 2 mL 2 M Salzsäure versetzt und für 2 h bei 100 °C, 700 U min<sup>-1</sup> mit Hilfe eines Thermoschüttlers (DITABIS, Pforzheim) partiell hydrolysiert. Für die weitere Aufarbeitung wurden die Proben 1:10 verdünnt eingesetzt. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und membranfiltriert. Eisgekühltes Orcinol wurde in 96%iger Schwefelsäure gelöst (2 g L<sup>-1</sup>). Davon wurden 800 µL in *SafeSeal Tubes* vorgelegt und jeweils 200 µL Probe/Standard/Blindwert dazugegeben. Nach kurzem Mischen mittels Vibrationsmischer wurde dieser Ansatz bei 80°C für 15 min erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur (RT) (auf Eis) abgekühlt und die Extinktionen (E) bei 420 nm photometrisch vermessen. Zur Berechnung des Gehaltes (GKH) wurde eine Kalibriergerade von Glucose-Monohydrat erstellt (Tabelle 27; Abbildung A 1, beispielhafte Darstellung für die Berechnung von CSS<sub>3</sub>).

**Tabelle 27: Geradengleichungen von Glucose-Monohydrat aus Orcinol-Schwefelsäure-Assay zur Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes (GKH) der eingesetzten Citrus-Nebenströme**

<i>Citrus side stream</i>	Geradengleichung aus Kalibriergerade	Regressionskoeffizient R <sup>2</sup>
1	$E = 0,0294 [\text{mL } \mu\text{g}^{-1}] * \text{GKH} [\mu\text{g mL}^{-1}] - 0,0270$	0,9976
2	$E = 0,0443 [\text{mL } \mu\text{g}^{-1}] * \text{GKH} [\mu\text{g mL}^{-1}] - 0,0386$	0,9999
3	$E = 0,0351 [\text{mL } \mu\text{g}^{-1}] * \text{GKH} [\mu\text{g mL}^{-1}] - 0,0513$	0,9958
4	$E = 0,0315 [\text{mL } \mu\text{g}^{-1}] * \text{GKH} [\mu\text{g mL}^{-1}] - 0,0059$	0,9975

### 2.4.2 Bestimmung des Restfeuchtegehaltes

Für die Berechnung verschiedener Nährstoffgehalte der Substrate, Medien und Fermentationsprodukte wurde die Restfeuchte mittels Infrarot-Feuchtebestimmer erfasst.

Es wurden mindestens 0,2 g des jeweiligen Produktes eingesetzt und eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 2.4.3 Bestimmung des Stickstoffgehaltes mittels Kjeldahl

Für die lyophilisierten Fermentationsprodukte aus Substrat 2 und 3 (2.3.1) sowie für Substrat 4 (2.1.5) und die resultierenden lyophilisierten Fermentationsprodukte aus den Schüttelkolben bzw. Bioreaktoren (2.3.2 und 2.3.3) wurde der Stickstoffgehalt mittels Kjeldahl bestimmt. Dafür wurden

jeweils 0,5 g – 1 g Probenmaterial eingewogen und in einen entsprechenden Aufschlusskolben überführt. Pro Ansatz wurden 2 Katalysatortabletten sowie 25 mL Schwefelsäure (98%) zugegeben. Mittels der Turbotherm-Apparatur wurden die Proben aufgeschlossen (Tabelle 28). Je nach Probe war nach Durchlauf des angegebenen Temperaturprogramms das Material noch nicht vollständig aufgeschlossen, was sich in der ausbleibenden Blaufärbung zeigte. In diesem Fall wurde die Dauer der vollen Leistung bis zum vollständigen Aufschluss ausgedehnt. Nach Abkühlen erfolgte die Wasserdampfdestillation (Tabelle 29) und anschließend die Titration mit 0,1 M Salzsäure. Parallel zu den Proben wurden Blindwerte ohne Probenmaterial mitgeführt.

**Tabelle 28: Heizprogramm der Turbotherm-Aufschlussapparatur**

Stufe	Leistung [%]	Dauer [min]
1	100	5
2	0	5
3	100	5
4	0	5
5	100	5
6	0	5
7	65	120

**Tabelle 29: Destillationsprogramm der Destillationsapparatur Vapodest 450**

Parameter	Wert
Zugabe H <sub>2</sub> O [mL]	90
Zugabe NaOH [mL]	80
Reaktionszeit [s]	0
Destillationszeit [s]	240
Dampfleistung [%]	100
Zugabe H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	80
Probenabsaugung [s]	30

Der Gehalt an Stickstoff in der Probe, analysiert mittels Kjeldahl ( $N_K$ ) berechnete sich nach Formel (1).

$$N_K [g (100 g TM)^{-1}] = \frac{(V - V_b) * 1,4007}{E * 10} \quad (1)$$

mit:	$N_K$	Stickstoffgehalt nach Kjeldahl [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
	V:	Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 M) für die Probe [mL]
	$V_b$ :	Verbrauch an Salzsäure-Maßlösung (0,1 M) für den Blindwert [mL]
	1,4007:	1 mL Salzsäure-Maßlösung entspricht 1,4007 mg Stickstoff
	E:	Einwaage der Probe [g TM]
	10:	Umrechnungsfaktor auf g (100 g) <sup>-1</sup>

#### 2.4.4 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

Die Bestimmung der Aminosäuren (AS) erfolgte in Anlehnung an (*Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln: VO (EG) Nr. 152/2009, 2009*) (ausgenommen Tryptophan (Trp)). Trp wurde mit einer für diese Aminosäure spezifischen Methode analysiert.

Die Analyse der Aminosäurezusammensetzung wurde mit einer Einwaage von bis zu 100 mg für die Substrate, für die Medien mit Substratzusatz und für die daraus resultierenden Fermentationsprodukte durchgeführt.

Für die Erfassung aller proteinogenen Aminosäuren waren drei verschiedene Aufarbeitungen notwendig. So wurden Cystein (Cys) und Methionin (Met) nach Oxidation und anschließender saurer Hydrolyse als Cysteinsäure und Methioninsulfon bestimmt (2.4.4.2). Zur Bestimmung von TRP ist eine alkalische Hydrolyse notwendig (2.4.4.3). Alle anderen Aminosäuren wurden nach Aufschluss mittels saurer Hydrolyse erfasst (2.4.4.1).

Zunächst wurden verschiedene Lösungen, welche im Verlauf der Aufarbeitung benötigt wurden, hergestellt (Tabelle 30).

**Tabelle 30: Lösungen für die Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung der Aminosäuren**

Lösung	Zusammensetzung
Phenolische Ameisensäure	Ameisensäure (98-100%) 889 g
	Reinstwasser 111 mL
	Phenol 4,73 g

## Fortsetzung Tabelle 30

Lösung	Zusammensetzung
<b>Oxidationslösung (pro Probe)</b> <b>(Perameisensäure – Phenollösung)</b>	Wasserstoffperoxid (30%) 0,05 mL  Phenolische Ameisensäure 0,45 mL
	Beide Lösungen wurden in einem kleinen Becherglas miteinander vermischt und bei RT für 1 h zur Ausbildung von Perameisensäure stehengelassen. Anschließend wurde diese über einem Eiswasserbad abgekühlt, für 15 min stehen gelassen und dann sofort verwendet.
<b>Hydrolysereagenz</b> <b>(6 M HCl mit Phenol 1 g L<sup>-1</sup>)</b>	Salzsäure (36-37%) 492 mL  Phenol 1 g
	In einem 1 L-Maßkolben wurde etwas Reinstwasser vorgelegt. Anschließend wurde Salzsäure und Phenol zugegeben und ad Marke mit Reinstwasser aufgefüllt.
<b>Citratpuffer</b> <b>(0,12 M; pH 2,2)</b>	Tri-Natriumcitrat Dihydrat 11 g  Zitronensäure 6 g  Thiodiglycol 14 mL  Salzsäure (32%) 12 mL  Phenol 2 g
	Alle Komponenten wurden in einem 1 L-Maßkolben miteinander vermischt und Reinstwasser hinzugegeben. Nach Einstellung des pH-Wertes mit NaOH/HCl wurde ad Marke mit Reinstwasser aufgefüllt.
<b>Phenolische NaOH</b> <b>(5 M NaOH mit 0,1% Phenol)</b>	Natriumhydroxid 200 g  Phenol 1 g
	In einem 1 L-Maßkolben wurde Natriumhydroxid in Reinstwasser vorgelöst. Anschließend wurde Phenol hinzugegeben und bis zur Marke aufgefüllt.

#### 2.4.4.1 Aufarbeitung für die Bestimmung des Gehaltes an Gesamtaminosäuren

Für die Bestimmung der Gesamtaminosäuren wurde eine saure Hydrolyse durchgeführt. Zunächst wurde die Probe in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL Hydrolyselösung (Tabelle 30) versetzt. Nach Hydrolyse der Probe für 24 h bei 110 °C (leicht geöffneter Deckel während der 1. Stunde) wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Bevor der pH abschließend auf 2,2 mit 1 M und 7,5 M NaOH-Lösung eingestellt wurde, wurden 1,5 mL der 7,5 M NaOH-Lösung hinzugegeben. Die aufgeschlossene Probe wurde quantitativ in einen 20 mL-Maßkolben überführt und mit Citratpuffer (Tabelle 30) ad Marke aufgefüllt bevor nach Spritzenfiltration ein Aliquot für die Chromatographie (2.4.4.4) eingesetzt wurde.

#### 2.4.4.2 Aufarbeitung für die Bestimmung des Gehaltes an Cystein & Methionin

Die Probe wurde in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und auf Eiswasser gestellt, um sie abzukühlen. Anschließend wurde 0,5 mL der Oxidationslösung (Tabelle 30) hinzugegeben und beide Komponenten gut miteinander vermischt. Der Ansatz wurde für 16 h bei 4 °C auf Eis inkubiert und zur Zerstörung des überschüssigen Oxidationsreagenz mit Natriumdisulfit (0,084 g) versetzt. Im nächsten Schritt wurde wie in Abschnitt 2.4.4.1 beschrieben mit der Zugabe des Hydrolysereagenz (Tabelle 30) und der nachfolgenden Vorgehensweise fortgefahren.

#### 2.4.4.3 Aufarbeitung für die Bestimmung des Gehaltes an Tryptophan

Für die Bestimmung des Tryptophangehaltes wurde die Probe mittels basischer Hydrolyse aufgearbeitet. Zunächst wurde die Probe in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 2,5 mL phenolischer NaOH-Lösung (Tabelle 30) versetzt. Nach der Reaktionszeit von 24 h bei 110 °C (wobei die Deckel in der 1. Stunde leicht geöffnet waren) wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Bevor der pH auf 2,2 mit 1 M und 3,75 M HCl-Lösung eingestellt wurde, wurde 1 mL 0,5 M Phosphorsäure zum Hydrolysat gegeben. Im Anschluss wurde die Probelösung in einen 20 mL-Messkolben überführt, mit Citratpuffer ad Marke aufgefüllt (Tabelle 30) und nach Spritzenfiltration für die Chromatographie (2.4.4.4) eingesetzt.

#### 2.4.4.4 Chromatographie zur Bestimmung der Aminosäuren

Die instrumentelle Analyse der in den Abschnitt 2.4.4.1, 2.4.4.2 und 2.4.4.3 aufgearbeiteten Proben erfolgte mit einem Aminosäureanalysator an einer Kationenaustauschsäule und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin anhand zweier verschiedener Methoden. Mithilfe der Methode I (AS-Methode I, Tabelle 31 und Tabelle 32) wurde das Gesamtaminosäureprofil aufgenommen, wobei die Auswertung mit Ausnahme von Prolin bei 570 nm erfolgte: Prolin wurde bei

440 nm ausgewertet. Bei der Detektion war außerdem zu berücksichtigen, dass Asparagin (Asp) und Glutamin (Glu) als entsprechende Säuren erfasst wurden. Die Quantifizierung dieser Gesamtaminosäuren erfolgte durch eine Einpunktkalibrierung eines kommerziell erhältlichen Standards ( $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$ , Ausnahme Cystin  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), welcher 1:10 mit Citratpuffer (Tabelle 30) verdünnt wurde. Mithilfe einer weiteren Methode (AS-Methode II, Tabelle 31 und Tabelle 32) wurde ausschließlich Tryptophan bestimmt, wobei die Quantifizierung anhand einer L-Tryptophan-Standardlösung [ $1 \mu\text{mol mL}^{-1}$  in  $0,1 \text{ M HCl}$  mit  $0,1\%$  Phenol, 1:20 mit Citratpuffer (Tabelle 30) verdünnt] erfolgte.

**Tabelle 31: chromatographische Parameter zur Bestimmung der Aminosäuren (AS)**

Modul/Parameter	Bezeichnung
<b>System</b>	Aminosäureanalysator S433
<b>Trennsäule</b>	Kationentrennsäule LCA K13/Na, für erweitertes Hydrolysat-Programm, $4,6 \times 175 \text{ mm}$ , SYKAM
<b>Filtersäule</b>	Ammoniakfiltersäule LCA K04/Na für Protein-Hydrolysat, $4,6 \times 100 \text{ mm}$ , SYKAM
<b>Eluent A</b>	Natrium-Citrat Puffer, $0,12 \text{ N}$
<b>Eluent B</b>	Natrium-Citrat Puffer, $0,20 \text{ N}$
<b>Regenerierlösung (RL)</b>	$0,5 \text{ M NaOH}$ mit $0,68 \text{ mM EDTA}$
<b>Aminoreagenz (AR)</b>	Ninhydrin, $0,1 \text{ M}$ in Methanol
<b>Flussrate</b>	
<b>Eluenten &amp; RL</b>	$0,45 \text{ mL min}^{-1}$
<b>AR</b>	$0,25 \text{ mL min}^{-1}$
<b>Modus</b>	
<b>Eluenten &amp; RL</b>	Gradient (Tabelle 32)
<b>AR</b>	isokratisch
<b>Säulenofentemperatur</b>	
<b>AS-Methode I</b>	$49 \text{ °C}$ (5 min), auf $56 \text{ °C}$ (in 5 min), $56 \text{ °C}$ (13 min), auf $74 \text{ °C}$ (in 5 min), $74 \text{ °C}$ (6 min), auf $50 \text{ °C}$ (in 5 min)
<b>AS-Methode II</b>	$74 \text{ °C}$
<b>Reaktortemperatur</b>	$130 \text{ °C}$
<b>Injektionsvolumen</b>	$50 \mu\text{L}$
<b>Detektor</b>	UV/VIS-Detektor

Fortsetzung Tabelle 31

Modul/Parameter	Bezeichnung
Wellenlängen AS-Methode I	440 nm & 570 nm
Wellenlängen AS-Methode II	570 nm
Software	Chromstar, Version 7

Tabelle 32: Gradienten der Aminosäureanalyse (AS)-Methoden I &amp; II

Gradient AS-Methode I				Gradient AS-Methode II			
Zeit [min]	Eluent & RL [%]			Zeit [min]	Eluent & RL [%]		
	A	B	RL		A	B	RL
0-5 min	100	0	0	0-5	30	70	0
11	95	5	0	7	10	90	0
13	80	20	0	15	0	100	0
25	70	30	0	20	0	100	0
29	30	70	0	20,1	0	0	100
31	20	80	0	23	0	0	100
33	10	90	0	23,1	30	70	0
41	0	100	0	32	30	70	0
49	0	100	0				
49,1	0	0	100				
52	0	0	100				
52,1	100	0	0				
65	100	0	0				

Anhand der sich ergebenden Analysendaten wurde der Gehalt der jeweiligen Aminosäure  $G_{AS}$  in der entsprechenden Probe nach Formel (2) berechnet.

$$G_{AS} [g (100 g TM)^{-1}] = \frac{c * M * V * 100}{E * 10^9} \quad (2)$$

mit:  $G_{AS}$ : Gehalt der jeweiligen AS [ $g (100 g TM)^{-1}$ ]  
 c: Konzentration der jeweiligen AS [ $nmol mL^{-1}$ ]  
 M: molare Masse der jeweiligen AS [ $g mol^{-1}$ ]  
 V: Volumen [mL]; hier: 20 mL  
 E: Einwaage [g TM]

- 100: Umrechnungsfaktor auf g (100 g TM)<sup>-1</sup>  
 10<sup>9</sup>: Umrechnung von nmol auf mol

Die Summe aller einzelnen G<sub>AS</sub> ergab den Gesamtproteingehalt, der jedoch nicht berücksichtigt, dass die Aminosäuren als Protein vorliegen. Da bei der Bildung einer Peptidbindung ein Molekül Wasser abgespalten wird, wurde diese Molekülmasse von der jeder Aminosäure abgezogen (proteingebundene Aminosäuren).

Die Berechnung des Stickstoffanteils der jeweiligen Aminosäure N<sub>AS</sub> erfolgte anhand von Formel (3). Summiert über alle Aminosäuren ergab sich daraus der Gesamtstickstoffgehalt aus der Aminosäureanalyse N<sub>ASA</sub>.

$$N_{AS} [g (100 g TM)^{-1}] = \frac{\text{Anteil N an M} * G_{AS}}{100} \quad (3)$$

- mit: N<sub>AS</sub>: Stickstoffanteil der jeweiligen AS [g (100 g TM)<sup>-1</sup>]  
 Anteil N an M: Stickstoffanteil an der molaren Masse der jeweiligen AS [%]  
 G<sub>AS</sub>: Gehalt der jeweiligen AS [g (100 g TM)<sup>-1</sup>]  
 100: Umrechnungsfaktor %

#### 2.4.5 Berechnung der Proteingehalte und -qualitäten

Die Summe aller einzelnen Aminosäuregehalte G<sub>AS</sub> ergab den Gesamtproteingehalt, der jedoch nur berücksichtigt, dass die AS frei vorliegen. Da es bei der Bildung einer Peptidbindung zur Abspaltung von einem Molekül Wasser kommt, wurde diese Molekülmasse von der jeder AS abgezogen (proteingebundene Aminosäuren). Der entsprechende Gehalt wird als *Amino Acid Residue* AS<sub>res</sub> bezeichnet.

##### 2.4.5.1 Berechnung des Rohproteingehaltes

Allgemein wird der Rohproteingehalt (RHP) mithilfe eines Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktors (F) berechnet. Dieser Umrechnungsfaktor ist substanzabhängig, da er aus den in den AS enthaltenem Stickstoff resultiert. Somit wurde aus der Aminosäureanalyse und dem sich daraus ergebenden Gesamtproteinstickstoffgehalt N<sub>ASA</sub> ein probenspezifischer Umrechnungsfaktor F berechnet (Formel (4)).

$$F = \frac{\sum AS_{res} [g (100 g TM)^{-1}]}{N_{ASA} [g (100 g TM)^{-1}]} \quad (4)$$

mit:	F:	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
	$\sum AS_{res}$ :	Summe aller proteingebundenen AS [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
	$N_{ASA}$ :	Gesamtproteinstickstoffgehalt, aus der Aminosäureanalyse resultierend [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]

Der Rohproteingehalt nach Kjeldahl (RHP) berechnet sich nach Formel (5)(10).

$$RHP [g (100 g TM)^{-1}] = N_K [g (100 g TM)^{-1}] * F \quad (5)$$

mit:	RHP:	Rohproteingehalt nach Kjeldahl [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
	$N_K$ :	Stickstoffgehalt, aus der Kjeldahl-Analyse resultierend [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ] (Formel (1))
	F:	Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor

#### 2.4.5.2 Berechnung des Reinproteingehaltes

Bei der Berechnung des Rohproteingehaltes wird der Gesamtstickstoff ausschließlich auf Proteine zurückgeführt. Allerdings werden dabei andere Stickstoffquellen, wie beispielsweise Chitin bei Pilzen, nicht berücksichtigt. Damit täuscht der Rohproteingehalt einen höheren Proteingehalt vor, da der Stickstoff aus nicht-proteinogenen Quellen mit einberechnet wird. Um diesen Wert zu korrigieren wird der netto Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor ( $F_{net}$ , Formel (6)) herangezogen und damit der Reinproteingehalt berechnet.

$$F_{net} = \frac{\sum AS_{res} [g (100 g TM)^{-1}]}{N_K [g (100 g TM)^{-1}]} \quad (6)$$

mit:	$F_{net}$ :	netto Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor
	$\sum AS_{res}$ :	Summe aller proteingebundenen AS [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
	$N_K$ :	Stickstoffgehalt, aus der Kjeldahl-Analyse resultierend [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ] (Formel (1))

### 2.4.5.3 Berechnung des *Amino Acid Score (AAS)* & *Chemical Score (CS)*

Für die Beurteilung der Proteinqualitäten wurden verschiedene Werte berechnet, darunter der *Amino Acid Score (AAS)* (Formel (7)) und daraus resultierende *Chemical Score (CS)* (Formel (8)).

Als Referenzprotein wurde hier die von der *Food and Agriculture of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO)* festgelegte Zusammensetzung herangezogen (Tabelle 33) (Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization, 1973).

**Tabelle 33: Zusammensetzung des von der FAO/WHO festgelegten Referenzproteins**

Aminosäure	Gehalt im Referenzprotein [%]
Isoleucin	4,0
Leucin	7,0
Lysin	5,5
Methionin & Cystein	3,5
Phenylalanin & Tyrosin	6,0
Threonin	4,0
Tryptophan	1,0
Valin	5,0

$$AAS = \frac{AS [mg] \text{ in Testprotein [1g]}}{AS [mg] \text{ in Referenzprotein[1g]}} \times 100 \quad (7)$$

mit: AAS: *Amino Acid Score*  
 AS in Testprotein: Aminosäure [mg] in 1 g Testprotein  
 AS in Referenzprotein: Aminosäure [mg] in 1 g Referenzprotein (Tabelle 33)

$$CS = AAS * 100 \quad (8)$$

mit: CS: *Chemical Score*  
 AAS: *Amino Acid Score* (Formel (7))

Aus dem niedrigsten Wert des CS ergibt sich die limitierende AS.

#### 2.4.5.4 Berechnung des essentiellen Aminosäureindex (EAAI) und der biologischen Wertigkeit (BW)

In die Berechnung der biologischen Wertigkeit (BW) fließt der essentielle Aminosäureindex (EAAI) ein, der sich aus Formel (9) ergibt. CS-Werte über 100 wurden auf 100 gesetzt.

$$EAAI = \sqrt{CS_{ILE} * CS_{LEU} * CS_{LYS} * CS_{MET\&CYS} * CS_{PHE\&TYR} * CS_{THR} * CS_{TRP} * CS_{VAL}} \quad (9)$$

mit: EAAI: essentieller Aminosäureindex  
CS: Chemical Score (Formel (8))

Für die Berechnung der biologischen Wertigkeit (BW) (Formel (10)) fand die Näherung nach Oser Anwendung (Oser, 1959).

$$BW = (1,09 * EAAI) - 11,7 \quad (10)$$

mit: BW: biologische Wertigkeit  
EAAI: essentieller Aminosäureindex (Formel (9))

#### 2.4.6 Elementaranalyse

Die Elementaranalyse zur Bestimmung der Kohlenstoff-, Stickstoff- und Wasserstoffgehalte wurde in der Abteilung „Zentrale Analytik“ des Instituts für Organische Chemie an der JLU durchgeführt.

#### 2.4.7 Bestimmung des Fettgehaltes

Das lyophilisierte Fermentationsprodukt (2.3.1) wurde nach Mörsern in Extraktionshülsen eingewogen und mit Glaswolle bedeckt. Anschließend wurde die Extraktion der Lipide mit Petrolether (160 mL, niedrig siedend) mithilfe einer Soxtherm®-Apparatur (Tabelle 34) durchgeführt. In den Extraktionsbechern befanden sich Siedesteine.

**Tabelle 34: Extraktionsparameter der Soxtherm®-Apparatur**

Parameter	Wert	Parameter	Wert
T-Klasse	200 °C	Absenkeintervall	4 min
Extraktionstemperatur	150 °C	Absenkimpuls	2 s

Fortsetzung Tabelle 34

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Kochphase	30 min	Abdestillieren AB	3x Intervall
Abdestillieren AA	6x Intervall	Abdestillieren AC	5 min
Extraktionszeit	90 min	Programmdauer	2 h 41 min

Das überschüssige Lösungsmittel wurde unter Stickstoff entfernt und die Extraktionsbecher mit dem enthaltenen Fett bis zur Gewichtskonstanz bei 105 °C getrocknet. Der Rückstand wurde mit 2 mL Isooctan versetzt und in Braunglasgefäße überführt, welche bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert wurden.

#### 2.4.8 Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung

Zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung wurde dem Fettextrakt (2.4.7) 0,1 mL methanolische Kaliumhydroxidlösung (2 M) zugegeben und kräftig geschüttelt. Nachdem die Lösung für 2 min stehen gelassen wurde, wurde sie mit 2 mL gesättigter Natriumchloridlösung versetzt und erneut geschüttelt. Die organische Phase wurde vorsichtig abgenommen und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, bevor sie der gaschromatographischen Analyse unterzogen wurde (Tabelle 35). Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe eines parallel gemessenen Fettsäuremethylester-Standards.

Tabelle 35: GC-FID-Parameter zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung

Gaschromatograph	GC-FID
Trennsäule	HP-INNOWax
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), auf 240 °C mit 5 °C min <sup>-1</sup> (12 min)
Trägergas	H <sub>2</sub> (5.0), 2,0 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
Injektor & Probenaufgabe	split/splitless-Inlet
Injektionsvolumen	1 µL
Splitverhältnis	10:1
Injektortemperatur	250 °C
<b>FID</b>	
Heater	250 °C
H <sub>2</sub> Flussrate	40 mL min <sup>-1</sup>
synthetische Luft Flussrate	400 mL min <sup>-1</sup>
make-up-Gas	N <sub>2</sub> (25 mL min <sup>-1</sup> )

Zusätzlich erfolgte die gaschromatographische Analyse mit massenspektrometrischer Detektion (Tabelle 48, mit Änderung des Temperaturprogramms: 40°C (3 min), mit 3°C min<sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min); Splitverhältnis 100:1), woraufhin eine vorläufige Identifizierung anhand des Massenspektrums mit Abgleich der *National Institute of Standards and Technology* (NIST) MS Datenbank 2011/2014 von zusätzlichen Fettsäuremethylestern erfolgte.

## 2.5 Screening

### 2.5.1 Screening der Oberflächenkulturen

Für die Oberflächenkulturen wurden Petrischalen mit CSSM<sub>1</sub> (Tabelle 25) vorbereitet, denen 15 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar zugefügt wurde. Ein Myzelstück einer zu 80% bewachsenen SNL-Plattenkultur der beiden dikaryotischen und aller 60 monokaryotischen Stämme wurde mittels Korkbohrer ausgestochen und auf die CSSM<sub>1</sub>-Agarplatte transferiert. Die Kulturen wurden bei 24 °C in der Dunkelheit inkubiert. Ab Tag 5 bzw. wenn die Platte zu mindestens 60% bewachsen war, wurde die Kultur sensorisch analysiert bis zu einem 90%-igem Wachstum und anschließend für weitere 5 Tage.

### 2.5.2 Screening mittels GC-MS

Parallel zu dem unter 2.5.1 durchgeführten Oberflächenscreening mit CSS supplementiertem Agar wurden alle 60 Mk und die beiden Dk submers in SNL (2.2.1) kultiviert (2.2.3). Sobald die jeweilige Kultur voll bewachsen war (in der Regel nach 3 bzw. 4 Tagen) wurde unter sterilen Bedingungen eine Probe der Kulturbrühe gezogen. Mittels Zentrifugation (3500 g, 10 min, 4 °C) wurden Myzel und Überstand voneinander getrennt und anschließend 4 mL des Überstandes in ein 20 mL *headspace*-Vial überführt. Die Probe wurde bei -20 °C bis zur Extraktion gelagert.

Die Extraktion erfolgte automatisiert mittels *headspace - solid phase microextraction* (HS-SPME) unter Verwendung einer Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen- (PDMS/DVB) Faser nachdem die Proben bei RT aufgetaut wurden. Die Proben wurden bei 40 °C extrahiert (Tabelle 36, Methode I). Abweichend davon wurden die Proben der Kulturen von Mk 5, 127, 129, 132, 201, 229, 233 und 234 bei RT extrahiert (Tabelle 36, Methode II).

**Tabelle 36: Parameter der HS-SPME Extraktion**

	Methode I	Methode II
<b>Inkubationszeit</b>	10 min	10 min
<b>Extraktion</b>		
<b>Temperatur</b>	40 °C	RT °C
<b>Dauer</b>	25 min	25 min
<b>Agitator</b>		
<b>On time</b>	60 s	60 s
<b>Off time</b>	1 s	1 s
<b>Speed</b>	250 rpm	250 rpm
<b>Fiber bakeout</b>		

**Fortsetzung Tabelle 36**

	<b>Methode I</b>	<b>Methode II</b>
<b>Temperatur</b>	250 °C	250 °C
<b>Dauer vor der Injektion</b>	5 min	5 min
<b>Dauer nach der Injektion</b>	10 min	10 min

Direkt im Anschluss wurden die Proben gaschromatographisch analysiert. Mit Ausnahme von Mk 5, 127, 129, 132, 201, 229, 233 und 234, wurden alle anderen Proben mittels GC-MS/MS-O gemessen (Tabelle 37).

**Tabelle 37: gaschromatographische Parameter zur Analyse der Screening Proben**

<b>Gaschromatograph</b>	GC-MS/MS-O	GC-MS I
<b>Trennsäule</b>		VF-WAXms
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), auf 240 °C mit 5 °C min <sup>-1</sup> , 240 °C (12 min)	
<b>Trägergas</b>	He (5.0), 1,56 mL min <sup>-1</sup> (konstant)	He (5.0), 1,2 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Injektor &amp; Probenaufgabe</b>	<i>split/splitless</i> -Inlet	
<b>Modus</b>	<i>splitless</i>	
<b>Injektortemperatur</b>	250 °C	
<b>Desorptionszeit</b>	60 s	
<b>Splitterplatte</b>	<i>split</i> 1:1 (MS:ODP)	
<b>MS-Parameter</b>		
<b>Ionisierungsenergie</b>	70 eV	
<b>Temperaturen</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol(e): 150 °C, Transferline: 250 °C	
<b>scan Massenbereich</b>	<i>m/z</i> 33-300	

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Masshunter Workstation Software (Version B. 07.00 / Build 7.0.457.0) anhand ausgewählter *Quantifier*-Ionen bzw. *Qualifier*-Ionen (Tabelle 38).

**Tabelle 38: Auswerteparameter der Chromatogramme der SNL-Proben des Screenings**

<b>Bezeichnung</b>	<b>CAS#</b>	<b>Quantifier</b>	<b>Qualifier 1</b>	<b>Qualifier 2</b>
		<b>m/z</b>	<b>m/z</b>	<b>m/z</b>
<b>3,6-Dimethyl- 2,3,3a,4,5,7a- hexahydrobenzofuran I &amp; II (Dilletter I &amp; II)</b>	70786-44-6	137	91	109
<b>3,9-Epoxy-<i>p</i>-mentha- 1,8(10)-dien (EMD)</b>		135	122	150
<b><i>p</i>-Anisaldehyd</b>	123-11-5	135	77	107
<b>(<i>E</i>)-Nerolidol</b>	40716-66-3	161	69	107

Zusätzlich wurde das jeweilige Geruchsprofil beschrieben.

Zur Verifikation der Entwicklung des Aromaprofils über mehrere Kulturtage und der Reproduzierbarkeit wurden Mk 37 und Mk 93 beispielhaft in vier nacheinander folgenden Ansätzen mit jeweiligen Doppelbestimmungen bis mindestens Kulturtag 6 kultiviert. Daraus wurden Proben genommen, welche, wie zuvor beschrieben, extrahiert und gaschromatographisch analysiert wurden.

13 monokaryotische Stämme der ersten Generation sowie acht Stämme der zweiten Generation und die entsprechenden Dikaryoten (Tabelle 39) wurden ebenfalls nach submerser Kultivierung in CSS-Medium (CSSM<sub>1</sub>, Tabelle 25) mittels HS-SPME-GC-MS (Tabelle 36, Tabelle 37) untersucht. Dabei wurde entsprechend der in diesem Abschnitt für die SNL-Kulturen beschriebenen Art und Weise vorgegangen. Die gaschromatographische Analyse der Stämme Dk, Mk 1, Mk 15, Mk 27, Mk 37, Mk 78, Mk 82, Mk 93, Mk 100, Dk 3174, Mk 101, Mk 115, Mk 124 erfolgte mit Hilfe des GC-MS/MS-O-Systems (Tabelle 36 Methode I, Tabelle 37, mit Änderung des Messmodus auf ein Splitverhältnis von 10:1 oder 20:1). Die Stämme Mk 49, Mk 57, Mk 74, Mk 117, Mk 119, Mk 126, Mk 216, Mk 226 wurden mit Hilfe des GC-MS I analysiert (Tabelle 36 Methode II, Tabelle 37 mit Änderung des Messmodus auf ein Splitverhältnis von 10:1 oder 20:1).

**Tabelle 39: Ausgewählte Stämme für das Screening in submerser Kultivierung im Citrus side stream Medium (CSSM<sub>1</sub>)**

1. Generation (Dk)			2. Generation (Dk 3174)		
Mk 1	Mk 49	Mk 82	Mk 101	Mk 119	Mk 216
Mk 5	Mk 57	Mk 90	Mk 115	Mk 124	Mk 226
Mk 15	Mk 74	Mk 93	Mk 117	Mk 126	
Mk 27	Mk 78	Mk 100			
Mk 37					

Für die Auswertung der Chromatogramme wurde ebenfalls Masshunter Workstation Software (Version B. 07.00 / Build 7.0.457.0) genutzt, wobei z. T. andere Substanzen als für das SNL-Screening herangezogen wurden (Tabelle 40).

**Tabelle 40: Auswerteparameter der Chromatogramme der CSSM-Proben des Screenings**

Bezeichnung	CAS#	Quantifier m/z	Qualifier 1 m/z	Qualifier 2 m/z
<b>(R)-Limonen</b>	5989-27-5	68	93	136
<b>3,6-Dimethyl- 2,3,3a,4,5,7a- hexahydrobenzofuran I &amp; II (Dilletter I &amp; II)</b>	70786-44-6	137	91	109
<b>p-Anisaldehyd</b>	123-11-5	135	77	107
<b>4-Chlor-3- methoxybenzaldehyd</b>	13726-16-4	169	99	63

## 2.6 Extraktionsvergleich & sensorische Analyse submerser Kulturen

### 2.6.1 Kulturführung & Probenahme

Die Vorkulturen von PSA Dk sowie Mk 37, 74, 93 und 124 wurden in SNL gezogen und ein Inokulum von 10% in das Hauptkulturmedium (2.2.3.2) überführt. Die Kulturen wurden als Duplikate mit CSSM<sub>1</sub> (Tabelle 25) in 250 mL Erlenmeyerkolben (40% Kulturmedium, v/v) angelegt. An Kulturtag 4 erfolgte eine sterile Probenahme, indem dem jeweiligen Kolben 10 mL der Kulturbrühe entnommen wurden. Das Myzel wurde durch Zentrifugation (3.500 g, 10 min, 4 °C) vom Überstand getrennt und jeweils 4 mL in 20 mL-*headspace* Vials für die Extraktion überführt. Die Proben wurden bis zur Extraktion bei -20 °C gelagert. Die restliche Kulturbrühe wurde mit jeweils 10% Natriumchlorid (w/v) versetzt und bis zur Flüssig/Flüssig-Extraktion bei -4 °C gelagert.

### 2.6.2 *Headspace-solid phase microextraction* (HS-SPME)

Die Proben von PSA Dk sowie Mk 37, 74 und 93 (2.6.1) wurden bei RT aufgetaut, mittels HS-SPME extrahiert (Tabelle 36, Methode II) und direkt mittels gaschromatographischer Analyse untersucht (Tabelle 41).

**Tabelle 41: GC-MS-Parameter zur Analyse der Extraktionsvergleichsproben (HS-SPME)**

<b>Gaschromatograph</b>	GC-MS I
<b>Trennsäule</b>	VF-WAXms
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), auf 240 °C mit 5 °C min <sup>-1</sup> , 240 °C (12 min)
<b>Trägergas</b>	He (5.0), 1,2 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Injektor &amp; Probenaufgabe</b>	<i>split/splitless</i> -Inlet
<b>Splitverhältnis</b>	50:1
<b>Injektortemperatur</b>	250 °C
<b>Desorptionszeit</b>	60 s
<b>MS-Parameter</b>	
<b>Ionisierungsenergie</b>	70 eV
<b>Temperaturen</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupole: 150 °C, Transferline: 250 °C
<b>scan Massenbereich</b>	<i>m/z</i> 33-300

### 2.6.3 *Direct immersion-stir bar sorptive extraction* (DI-SBSE)

Nach Auftauen der Proben PSA Dk sowie Mk 37, 74 und 93 (2.6.1) erfolgte die Zugabe von 40 µL einer *m*-Anisaldehyd-Lösung, welche als interner Standard diente (Endkonzentration 30 ng mL<sup>-1</sup>). Dazu

wurde eine entsprechende Stammlösung einer Konzentration von  $1,6 \text{ mg mL}^{-1}$  in Acetonitril angelegt, welche 1:500 mit Reinstwasser verdünnt wurde ( $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Bevor die Extraktion mittels Twister® durchgeführt wurde, wurden diese unter den folgenden Bedingungen konditioniert: Starttemperatur:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (20 min) auf  $280 \text{ }^\circ\text{C}$  mit  $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ ,  $280 \text{ }^\circ\text{C}$  (480 min), Standbytemperatur  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Anschließend wurden die Twister® (PDMS) in den Kulturüberstand gegeben und für 1 h bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1000 rpm gerührt. Anschließend erfolgte die gaschromatographische Analyse (Tabelle 42).

Vor bzw. nach Verwendung wurden die Twister im Tube Conditioner TC 2 konditioniert, beginnend bei einer Temperatur von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , die für 20 min gehalten wurde. Die Temperatur wurde anschließend mit  $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  bis auf  $280 \text{ }^\circ\text{C}$  angehoben bei welcher sie für 480 min gehalten wurde. Im Standby-Modus lag die Temperatur bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabelle 42: GC-MS/MS-O Parameter mit TDU und Kaltaufgabesystem der Extraktionsvergleichsproben (DI-SBSE)**

<b>Gaschromatograph</b>	GC-MS/MS-O
<b>Trennsäule</b>	VF-WAXms
<b>Temperaturprogramm</b>	$40 \text{ }^\circ\text{C}$ (3 min), auf $240 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , $240 \text{ }^\circ\text{C}$ (12 min)
<b>Trärgas &amp; Flussrate</b>	He (5.0), $1,56 \text{ mL min}^{-1}$ (konstant)
<b>Thermodesorptionseinheit (TDU)</b>	
<b>Modus</b>	<i>splitless</i>
<b>Temperaturprogramm</b>	$40 \text{ }^\circ\text{C}$ (0,5 min), $120 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ auf $250 \text{ }^\circ\text{C}$ (8 min)
<b>Transferline</b>	<i>fixed</i> ( $250 \text{ }^\circ\text{C}$ )
<b>sample mode</b>	<i>retain tube - standby cooling</i>
<b>Septumpülung</b>	$3 \text{ mL min}^{-1}$
<b>Kaltaufgabesystem (KAS)</b>	
<b>Modus</b>	<i>split</i> (50:1)
<b>Liner</b>	Glaswolle
<b>Temperaturprogramm</b>	$-100 \text{ }^\circ\text{C}$ (1,0 min), $12 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ auf $250 \text{ }^\circ\text{C}$ (5 min)
<b>Splitterplatte</b>	<i>split</i> 1:1 (Massenspektrometer: <i>olfactory detection port</i> )
<b>Massenspektrometer</b>	
<b>Ionisierungsenergie</b>	70 eV
<b>Ionenquelle</b>	Ionenquelle: $230 \text{ }^\circ\text{C}$ , Quadrupole: $150 \text{ }^\circ\text{C}$ , Transferline: $250 \text{ }^\circ\text{C}$
<b>scan in q1</b>	<i>m/z</i> 33-300

**Fortsetzung Tabelle 42**

<b>olfactory detection port (ODP)</b>	
<b>Transferline</b>	250 °C
<b>Mischkammer</b>	150 °C
<b>make up Gas</b>	Stickstoff

#### 2.6.4 Flüssig/Flüssig-Extraktion, *solvent assisted flavor evaporation (SAFE)* und sensorische Analyse

Für die Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE) wurden die Kulturen, welche wie unter 2.6.1 beschrieben vorbereitet wurden, eingesetzt. Die jeweilige Kulturbrühe wurde nach Erwärmen auf RT mit jeweils 50 µL einer *m*-Anisaldehyd-Stammlösung (0,74 mg mL<sup>-1</sup> *n*-Heptan) bzw. 50 µL einer Hept-1-en-3-ol-Stammlösung (0,56 mg mL<sup>-1</sup> *n*-Heptan) und 40 mL destilliertem *n*-Pentan/Diethylether (P/D, 1:1,12, v/v) gemischt. Die LLE wurde mit Hilfe des Magnetrührers für 30 min durchgeführt. Anschließend wurde die organische Phase von der wässrigen Phase mittels Zentrifugation (3.500 *g*, 15 min, 4 °C) getrennt. Der Extraktions- und Separationsschritt wurde zweimal wiederholt, bevor die organischen Phasen vereint wurden. Anschließend erfolgte die Trennung der flüchtigen Verbindungen von den nicht-flüchtigen mittels *solvent assisted flavor evaporation (SAFE)* bevor der gereinigte organische Extrakt über Natriumsulfat getrocknet und mittels Vigreux-Kolonnen auf ca. 1,5 mL konzentriert wurde. Dieses gereinigte Destillat wurde für die gaschromatographische Analyse eingesetzt (2.7.2).

Ein Aliquot (5 µL) eines jeden SAFE-Destillates der vier ausgewählten Monokaryoten und des Dikaryoten wurde entnommen und das Lösungsmittel entfernt. Die Rückstände wurden in Propan-1,2-diol (1,5 mL) aufgenommen und als Riechstifte einem Sensorikpanel (n = 16) zur Verfügung gestellt. Jede Probe wurde anhand von 10 vorgegebenen Attributen (Zitrus, buttrig, anisartig, Vanille, Waldmeister, holzig, fruchtig, krautig, blumig und süßlich) hinsichtlich der Intensität (0 = nicht wahrnehmbar bis 5 = stark wahrnehmbar) beurteilt. Außerdem wurden die Panelisten nach dem Gesamtgeruchseindruck der jeweiligen Probe gefragt („---“ = sehr unangenehm bis „+++“ = sehr angenehm).

## 2.7 Aromaextraktverdünnungsanalyse & Substanzidentifizierung

### 2.7.1 Aromextraktverdünnungsanalyse (AEVA)

Die Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVA) wurde mit dem SAFE-Destillat des Mk 37 durchgeführt. Es wurde schrittweise 1+1 (v/v) mit P/D verdünnt und anschließend mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektor-Olfaktometrie (GC-FID-O, Tabelle 43) durch 3 Panelisten analysiert bis am *olfactory detection port* (ODP) kein Geruchseindruck mehr wahrnehmbar war. Wenn der Geruchseindruck durch alle Panelisten wahrnehmbar war, wurde der Median der jeweiligen *flavor dilution* (FD)-Faktoren gebildet. Anderenfalls wurde der Mittelwert angegeben. Lag dieser zwischen zwei FD-Faktoren fiel die Entscheidung auf den unteren Wert.

**Tabelle 43: GC-FID-O Parameter zur Aromaextraktverdünnungsanalyse**

<b>Gaschromatograph</b>	GC-FID-O
<b>Trennsäule</b>	VF-WAXms
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), auf 240 °C mit 5 °C min <sup>-1</sup> (12 min)
<b>Trägergas</b>	H <sub>2</sub> (5.0), 2,0 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Injektor &amp; Probenaufgabe</b>	<i>cool-on-column</i>
<b>Injektionsvolumen</b>	1 µL
<b>FID</b>	
<b>Heater</b>	250 °C
<b>H<sub>2</sub> Flussrate</b>	40 mL min <sup>-1</sup>
<b>synthetische Luft Flussrate</b>	400 mL min <sup>-1</sup>
<b>make-up-Gas</b>	N <sub>2</sub> (25 mL min <sup>-1</sup> )
<b>ODP</b>	
<b>Transferline</b>	250 °C
<b>Mischkammer</b>	150 °C

### 2.7.2 Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen

Zur Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen wurde das LLE/SAFE-Destillat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie unter Verwendung sowohl einer polaren (Tabelle 44) als auch einer nicht-polaren Säule (Tabelle 45) analysiert. Das Massenspektrum und die Retentionsindices (RI), welche nach van den Dool und Kratz berechnet wurden (Formel (11)) (van den Dool & Dec. Kratz, 1963), wurden mit authentischen Standards, veröffentlichten Daten und der NIST MS Datenbank 2011 abgeglichen. Außerdem wurden die erhaltenen Geruchseindrücke ebenfalls mit veröffentlichten Daten und authentischen Standards verglichen.

**Tabelle 44: GC-MS/MS-O-Parameter zur Analyse der SAFE-Destillate (polare Trennsäule)**

<b>Gaschromatograph</b>	GC-MS/MS-O
<b>Trennsäule</b>	VF-WAXms
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), auf 240 °C mit 5 °C min <sup>-1</sup> , 240 °C (12 min)
<b>Trägergas &amp; Flussrate</b>	Helium, 1,56 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Injektor &amp; Probenaufgabe</b>	<i>split/splitless</i> -Inlet
<b>Probenvolumen</b>	1 µL
<b>Injektortemperatur</b>	250 °C
<b>Splitverhältnis</b>	20:1
<b>Splitterplatte</b>	<i>split</i> 1:1 (Massenspektrometer: <i>olfactory detection port</i> )
<b>Massenspektrometer</b>	
<b>Ionisierungsenergie</b>	70 eV
<b>Temperaturen Ionenquelle</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupole: 150 °C, Transferline: 250 °C
<b><i>scan in q1</i></b>	<i>m/z</i> 33-300
<b><i>solvent delay</i></b>	4 min
<b><i>olfactory detection port</i> (ODP)</b>	
<b>Transferline</b>	250 °C
<b>Mischkammer</b>	150 °C
<b><i>Make up Gas</i></b>	Stickstoff

**Tabelle 45: GC-MS-Parameter zur Analyse der SAFE-Destillate (unpolare Trennsäule)**

<b>Gaschromatograph</b>	GC-MS I
<b>Trennsäule</b>	DB-5ms
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), auf 300 °C mit 5 °C min <sup>-1</sup> , 300 °C (10 min)
<b>Trägergas &amp; Flussrate</b>	Helium, 1,2 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Injektor &amp; Probenaufgabe</b>	<i>split/splitless</i> -Inlet
<b>Probenvolumen</b>	1 µL
<b>Injektortemperatur</b>	250 °C
<b>Splitverhältnis</b>	20:1
<b>Massenspektrometer</b>	
<b>Ionisierungsenergie</b>	70 eV
<b>Temperaturen Ionenquelle</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Transferline: 250 °C

## Fortsetzung Tabelle 45

<b>scan</b>	<i>m/z</i> 33-300
<b>solvent delay</b>	3,5 min

$$RI = 100 * n + 100 * \frac{t_R(\text{Analyt}) - t_R(C_n)}{t_R(C_{n+1}) - t_R(C_n)} \quad (11)$$

mit:	RI:	Retentionsindex
	n:	Anzahl der Kohlenstoffatome des vor dem Analyten eluierenden Alkans
	$t_R(\text{Analyt})$ :	Retentionszeit des Analyten
	$t_R(C_n)$ :	Retentionszeit des vor dem Analyten eluierenden Alkans
	$t_R(C_{n+1})$ :	Retentionszeit des nach dem Analyten eluierenden Alkans

## 2.7.3 Strukturaufklärung von 2-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon (2-HPP)

Zur Identifizierung der Substanz 2-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon (2-HPP) wurde Mk 37 in CSSM<sub>1</sub> kultiviert (2.6.1). Die Kulturbrühe wurde flüssig/flüssig extrahiert (2.6.4), wobei der Maßstab auf 500 mL Erlenmeyerkolben vergrößert wurde. Die Ernte der Kultur erfolgte an Tag 8. Nach Konzentrierung mittels Vigreux-Kolonnen wurde der Extrakt durch Säulenchromatographie vorfraktioniert, beginnend mit *n*-Pentan und schrittweiser Erhöhung des Diethylether-Anteils (98/2, 80/20, 50/50, 30/70, 0/100, v/v). Nach Einengung der Fraktionen an der Vigreux-Kolonnen auf ca. 1,5 mL wurde die Fraktion, welche die Zielsubstanz enthielt, mittels präparativer HPLC (Tabelle 17, Präparatives System II) gereinigt.

Die Struktur der Zielsubstanz wurde über die Bestimmung der exakten Masse mittels *electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry* (ESI-TOF-MS, Tabelle 46) und *nuclear magnetic resonance* (NMR) Spektroskopie aufgeklärt.

Tabelle 46: Parameter zur Bestimmung der exakten Masse mittels ESI-TOF-MS

<b>ESI-TOF-MS System</b>	AB Sciex TripleTOF 5600+ (Darmstadt)
<b>Probenaufgabe</b>	Direktinfusion, 10 µL min <sup>-1</sup>
<b>Ionisierung</b>	
<i>nebulizer gas</i>	15 psi
<i>auxiliary gas</i>	15 psi
<i>curtain gas</i>	25 psi
<i>ion spray voltage floating</i>	5500 V

**Fortsetzung Tabelle 46**

<b>Massenspektrometer</b>	
<b>Kalibrierung</b>	Natriumformiatlösung
<b>scan Massenbereich</b>	100 - 2000 Da
<b>Software</b>	Analyst TF 1.7.1 PeakView 2.2 Software (AB Sciex)

Die verschiedenen NMR-Experimente [ $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT 135,  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear single-quantum correlation (HSQC), heteronuclear multi-bond correlation (HMBC)] wurden an Bruker Avance II 400 MHz und Bruker Avance III 400 MHz HD-Systemen (Rheinstetten) durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde  $\text{CDCl}_3$  verwendet.

Zusätzlich wurde die Verbindung auf ihr Enantiomerenverhältnis mittels chiraler HPLC (Tabelle 16, Analytisches System II, Chiralpak® IC) untersucht.

Außerdem wurde chemoenzymatisch ein 2-HPP-Standard nach Nakamura *et al.* (1996) durch Reduktion von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandion (Diketon) mit Bäckerhefe hergestellt. Dafür wurden 2 g kommerziell erhältlicher Bäckerhefe mit 20 mL Umsetzungspuffer (2.10.1) gemischt und bei 24 °C und 150 rpm für 65 min vorinkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot (1,5 mL) der Hefesuspension zu 5 mg des Diketons gegeben. Die Inkubation erfolgte in Braunglasvials (4 mL) mittels Rotationsschüttler (40 rpm) bei 30 °C für 150 min. Anschließend wurden die Proben mit 2 mL P/D auf dem Rotationsschüttler bei 40 rpm, 30 °C für 10 min extrahiert, gefolgt von Zentrifugation (3.500 g, 10 min, 4 °C). Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und mittels GC-MS/MS-O analysiert (Tabelle 44; Splitverhältnis 10:1).

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgte durch Messung des hergestellten Standards nach Aufreinigung über präparative HPLC (Tabelle 17, Präparatives System II; 1,6 mg in 1 mL Acetonitril) mittels Polarimeter bei 589 nm und RT.

## 2.8 Aromastoffgenese im Kulturverlauf & Quantifizierung von *p*-Anisaldehyd

### 2.8.1 Aromastoffgenese im Kulturverlauf

Für PSA Mk 37 wurde die Aromastoffgenese über einen Kulturzeitraum von 10 Tagen analysiert. Dafür wurden die Vorkulturen in SNL angelegt (2.2.3.1) und die Hauptkulturen in 100 mL Erlenmeyerkolben (40 mL Medium) mit CSSM<sub>1</sub>, wobei für jeden Kulturtag (Tag 0 bis Tag 10) 2 separate Kolben angesetzt wurden. Am jeweiligen Erntetag wurden jeweils 10% Natriumchlorid (w/v) zur Kulturbrühe gegeben und diese bis zur Extraktion bei 4 °C gelagert. Für die Aromaanalyse wurden die Proben mit jeweils 20 µL einer *m*-Anisaldehyd-Stammlösung (0,74 mg mL<sup>-1</sup> *n*-Heptan) bzw. 20 µL einer Hept-1-en-3-ol-Stammlösung (0,56 mg mL<sup>-1</sup> *n*-Heptan) und 16 mL destilliertem *n*-Pentan/Diethylether (P/D, 1:1,12, v/v) gemischt. Die Flüssig/Flüssig-Extraktion wurde mit Hilfe des Magnetrührers für 30 min durchgeführt. Anschließend wurde die organische Phase von der wässrigen Phase mittels Zentrifugation (3.500 g, 15 min, 4 °C) getrennt. Die Extraktions- und Separationsschritte wurden zweimal wiederholt, die organischen Phasen vereint und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde der jeweilige Extrakt an einer Vigreux-Kolonnen (Wasserbadtemperatur: 43 °C) auf ca. 1,5 mL eingeeengt und im Anschluss gaschromatographisch analysiert (Tabelle 44).

### 2.8.2 Stabilisotopenverdünnungsanalyse von *p*-Anisaldehyd

Die Kulturen für die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) wurden auf gleiche Weise wie für die AEVA hergestellt (s. Abschnitt 2.7.1). Anstelle von CSS wurde außerdem L-Tyrosin (33 mM) als Substrat unter Einsatz von 15 g L<sup>-1</sup> Glucose im Medium genutzt.

Die Kulturen wurden als Triplikate hergestellt. An Tag 4, 6 und 8 wurde ein Aliquot von 2 mL unter sterilen Bedingungen entnommen. In Abhängigkeit des zu erwarteten *p*-Anisaldehyd-Gehaltes wurden verschiedenen Mengen an [7-<sup>13</sup>C]-*p*-Anisaldehyd-Stammlösung (1 mg mL<sup>-1</sup>) zugegeben (Tabelle 47).

**Tabelle 47: Zugabe der [7-<sup>13</sup>C]-*p*-Anisaldehyd-Stammlösung in Abhängigkeit des Substrates und Kulturtages**

Substrat	Kulturtag 4			Kulturtag 6			Kulturtag 8		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
	Volumen [µL]								
CSS <sub>2</sub> <sup>a</sup>	10	10	10	200	200	100	300	150	200
CSS <sub>3</sub> <sup>a</sup>	100	100	100	140	140	100	120	120	80
L-Tyrosin	20	20	30	80	120	100	100	150	80

<sup>a</sup>CSS: *Citrus side stream*

Anschließend wurden 2 mL P/D zugegeben und die Mischung homogenisiert (Vortex, 30 s), gefolgt von Extraktion (10 min, 40 rpm, 24 °C) und Zentrifugation (3.500 *g*, 10 min, 4 °C). Diese Schritte wurden einmal wiederholt, die organischen Phasen vereint und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Ein Aliquot von 500 µL des Flüssig/Flüssig-Extraktes wurde mit 50 µL der internen Standardlösung (*m*-Anisaldehyd, 1 mg mL<sup>-1</sup>) versetzt und mittels GC-MS (Tabelle 48) analysiert.

**Tabelle 48: GC-MS-Parameter zur Quantifizierung von *p*-Anisaldehyd mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA)**

<b>Gaschromatograph</b>	GC-MS II
<b>Trennsäule</b>	VF-WAXms
<b>Temperaturprogramm</b>	40 °C (3 min), auf 240 °C mit 5 °C min <sup>-1</sup> , 240 °C (12 min)
<b>Trägergas &amp; Flussrate</b>	Helium, 1,2 mL min <sup>-1</sup> (konstant)
<b>Injektor &amp; Probenaufgabe</b>	<i>split/splitless</i> -Inlet
<b>Probenvolumen</b>	1 µL
<b>Injektortemperatur</b>	250 °C
<b>Splitverhältnis</b>	30:1
<b>Massenspektrometer</b>	
<b>Ionisierungsenergie</b>	70 eV
<b>Temperaturen Ionenquelle</b>	Ionenquelle: 230 °C, Quadrupol: 150 °C, Transferline: 250 °C
<b>scan</b>	<i>m/z</i> 33-300

## 2.9 Induktion der Aromastoffbildung durch Präkursoren

### 2.9.1 Optimierung der Medien zur Aminosäuresupplementierung

Als Vorversuch für die Aminosäuresupplementationen wurden verschiedene Stickstoffquellen und Konzentrationen an L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) getestet. Die Zusammensetzung des Grundmediums orientierte sich an der Studie von Fraatz *et al.* (2014). Das Experiment wurde zweistufig angelegt, wobei in der ersten Stufe Natriumaspargat (Asp) und Ammoniumnitrat als zusätzliche Stickstoffquellen zum Einsatz kamen, während in der zweiten Stufe auch Hefeextrakt genutzt wurde. Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurde in der zweiten Stufe jeweils ein Blindwert ohne Inokulierung des Mediums mitgeführt. Die Kulturführung folgte dem generellen Vorgehen (2.2.3), wobei als Kultivierungsmaßstab 100 mL Erlenmeyerkolben gewählt wurde.

In jeden Kolben wurde 40 mL Grundmedium gegeben (Tabelle 49) und zusätzlich die jeweiligen Supplemente, deren Einfluss untersucht werden sollte (Tabelle 50/Tabelle 51).

**Tabelle 49: Zusammensetzung des Grundmediums zur Aminosäuresupplementierung**

Komponente	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
D-Glucose-Monohydrat	15
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5
	Konzentration [mL L <sup>-1</sup> ]
Spurenelement-Lösung (Tabelle 22)	1

**Tabelle 50: Konzentrationen der Supplemente zur Medienoptimierung in Stufe 1**

	Ammoniumnitrat [g L <sup>-1</sup> ]	Natriumaspargat [g L <sup>-1</sup> ]	Phenylalanin [g L <sup>-1</sup> ] ([mM])	Tyrosin [g L <sup>-1</sup> ] ([mM])
komplett	2,4	6,25		
Asp		2,5		
Phe A <sub>1</sub>			6,5 (39)	
Phe B <sub>1</sub>		2,5	3,75 (23)	
Phe C <sub>1</sub>		2,5	1,88 (11)	
Phe D <sub>1</sub>		2,5	0,94 (6)	
Tyr A <sub>1</sub>				6 (33)
Tyr B <sub>1</sub>		2,5		3 (16)

**Fortsetzung Tabelle 50**

	Ammoniumnitrat [g L <sup>-1</sup> ]	Natriumaspartat [g L <sup>-1</sup> ]	Phenylalanin [g L <sup>-1</sup> ] ([mM])	Tyrosin [g L <sup>-1</sup> ] ([mM])
Tyr C <sub>1</sub>		2,5		1,5 (8)
Tyr D <sub>1</sub>		2,5		0,75 (4)

**Tabelle 51: Konzentrationen der Supplemente zur Medienoptimierung in Stufe 2**

	Hefeextrakt [g L <sup>-1</sup> ]	Ammoniumnitrat [g L <sup>-1</sup> ]	Natriumaspartat [g L <sup>-1</sup> ]	Phenylalanin [g L <sup>-1</sup> ] ([mM])	Tyrosin [g L <sup>-1</sup> ] ([mM])
Hefe	0,3				
Asp A		2,4	2,5		
Asp B		2,4	6,25		
Phe A <sub>2</sub>		2,4	2,5	1,88 (11)	
Phe B <sub>2</sub>		2,4	6,25	1,88 (11)	
Phe C <sub>2</sub>	0,3			1,88 (11)	
Tyr A <sub>2</sub>		2,4	2,5		6 (33)
Tyr B <sub>2</sub>		2,4	6,25		6 (33)
Tyr C <sub>2</sub>	0,3				6 (33)

Die Umsetzungen wurden in der ersten Stufe mit PSA Dk durchgeführt, während in der zweiten Stufe Mk 74 genutzt wurde.

Beide Experimenteile wurden sensorisch begleitet und anhand markanter Geruchseindrücke Probenahmen durchgeführt. Die Probenahme erfolgte an Kulturtag 4 und 7 für den ersten Experimentteil sowie an den Tagen 4 bis 6 während des zweiten Teils. Diese Proben wurden mittels HS-SPME (Tabelle 36 Methode II) extrahiert und gaschromatographisch analysiert (Tabelle 41 jedoch *splitless*).

### 2.9.2 Vergleich von statischer Kultivierung gegen Schüttelkultivierung unter Zusatz von L-Phenylalanin und L-Tyrosin

Für den Vergleich zwischen statischer und der standardmäßig angewandten Schüttelkultivierung (2.2.3) wurde der Ansatz mit Supplementierung der Aminosäuren Tyr und Phe im Maßstab von 100 mL Erlenmeyerkolben gewählt (Medium entsprechend Tabelle 26). Die Aminosäuresupplemente wurden in diesem Fall jedoch erst nach drei Tagen der Kultivierung zugesetzt und anschließend weitere vier

Tage im Fall der Schüttelkultivierung und 42 Tage im Fall der statischen Kultivierung geführt. Im Anschluss erfolgte die Flüssig/Flüssig-Extraktion (2.6.4) und Analyse mittels GC-MS (GC-MS I, Tabelle 37, mit Änderung der Temperaturrampe auf  $20\text{ °C min}^{-1}$  und einem Splitverhältnis von 50:1).

### 2.9.3 Stabilisotopensupplementierung von L-Tyrosin

Die Tyrosin-Supplementationsstudien wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben durchgeführt (40 mL Füllvolumen + 10% SNL-Inokulum) entsprechend Abschnitt 2.2.3, jedoch wurde L-2-Amino-3-([3,5- $^2\text{H}$ ]-4-hydroxyphenyl)-propansäure (33 mM) anstelle des nicht-stabilisotopenmarkierten L-Tyrosins eingesetzt. Die Kulturen (Dk, Mk 37) wurden an Tag 6 geerntet, flüssig/flüssig extrahiert (2.6.4) und mittels GC-MS (Tabelle 48, Splitverhältnis 100:1) analysiert.

## 2.10 Biotransformationsstudien

### 2.10.1 Zusammensetzung des Puffers

Für die Biotransformationsstudien wurde ein 50 mM Phosphatpuffer mit pH 7,0 gewählt (Tabelle 52).

**Tabelle 52: Zusammensetzung des Umsetzungspuffers (50 mM, pH 7,0)**

Komponente	Konzentration
Dikaliumhydrogenphosphat/Kaliumdihydrogenphosphat	50 mM
Thiamindiphosphat	2 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	20 mM
DMSO	20 %

### 2.10.2 Reaktionsansätze

Für die Charakterisierung der Reaktion zur Bildung des  $\alpha$ -Hydroxyketons wurden verschiedene Parameter getestet (Tabelle 53). Zunächst wurde Myzellyophilisat verschiedener PSA-Stämme (Dk, Mk 37, Mk 57 und Mk 93) generiert, indem diese sowohl in SNL (SNL-Plattenkultur, SNL-Vorkultur) als auch in MEP (ME-Plattenkultur, MEP-Vorkultur) kultiviert wurden. Nach der Ernte (SNL, 5 Tage, MEP, 3 Tage) wurde das Myzel vom Überstand getrennt, indem über einen Büchner-Trichter filtriert wurde. Das Myzel wurde mit Natriumchlorid-Lösung (0,9% w/v) gewaschen und anschließend lyophilisiert. Nach vollständiger Trocknung wurde es bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zu 50 mg des Lyophilisats wurden Substrat und Phosphatpuffer (Tabelle 52) gegeben, sodass das Gesamtvolumen 1,5 mL betrug. Dieser Ansatz wurde bei 40 rpm mittels Überkopfschüttler inkubiert und anschließend mit 2 mL P/D unter Zusatz von 100  $\mu$ L des internen Standards (IS, *m*-Anisaldehyd, 0,6 mM) flüssig/flüssig für 10 min bei 40 rpm extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen und nach Trocknen über Natriumsulfat gaschromatographisch (Tabelle 48, Splitverhältnis 30:1) analysiert.

Da verschiedene Enzyme die Bildung von Acyloinen katalysieren können, wurde neben dem aromatischen Aldehyd einerseits Acetaldehyd und andererseits Pyruvat als Reaktionspartner eingesetzt (Dünnwald *et al.*, 2000; Neuser *et al.*, 2000b; Demir *et al.*, 2002).

**Tabelle 53: Parameter zur Untersuchung der Einflüsse auf die Bildung von 2-HPP**

Einflussparameter	Myzellyophilisat	Konzentration [mM]			Inkubationsdauer [h]	Inkubationstemperatur [°C]
		Pyruvat	Acetaldehyd	p-Anisaldehyd		
<b>Kultivierungsmedium für Pilzlyophilisat</b>	MEP/SNL	2,5	6	0,5	24	30
<b>Variabilität Stämme</b>	PSA- Dk, Mk 37, Mk 57, Mk 93 (MEP)	2,5	n. a.	0,5	24	30
<b>Inkubationszeit</b>	MEP	2,5	n. a.	0,5	4 / 8 / 16 / 24	24
<b>Inkubationstemperatur</b>	MEP	2,5	n. a.	0,5	24	18 / 24 / 30
<b>Substratkonzentration Pyruvat</b>	MEP	0,25/0,5 1/2,5/5 10/25/50 100/250/ 500 1000/2500	n. a.	0,5	24	30
<b>Substratkonzentration Acetaldehyd</b>	MEP	n. a.	0,25/0,5 1/2,5/5 10/25/50 100/250/500 1000/2500	0,5	24	30
<b>Substratkonzentration p-Anisaldehyd</b>	MEP	2,5	n. a.	0,25/0,5/2,5 5 /25/50 250	24	30

n. a. nicht angewendet

Neben der gaschromatographischen Analyse erfolgte auch eine Analyse der Umsetzungen von *p*-Anisaldehyd mit Pyruvat durch PSA mittels HPLC-PDA (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Photodiodenarray-Detektion) (Tabelle 16, Tabelle 54). Dafür wurde das Lösungsmittel der Extrakte unter einem Stickstoffstrom verflüchtigt und der Rückstand in ACN aufgenommen.

**Tabelle 54: Parameter der HPLC-PDA Analyse von Natriumpyruvat-Anisaldehyd-Umsetzungslösungen**

<b>Säule</b>	Nucleosil C18 + Vorsäule
<b>Eluent A</b>	Wasser (70%)
<b>Eluent B</b>	Acetonitril (30%)
<b>Modus</b>	isokratisch

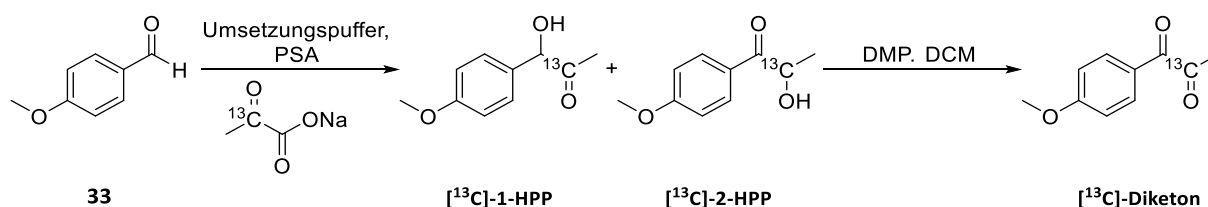
**Fortsetzung Tabelle 54**

<b>Flussrate</b>	1 mL min <sup>-1</sup>
<b>Lauflänge</b>	14 min
<b>Injektionsvolumen</b>	50 µL
<b>Detektionswellenlängen</b>	265 nm; 274 nm; 280 nm; 295 nm

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte im Fall von *p*-Anisaldehyd, *m*-Anisaldehyd (IST) und 2-HPP über Abgleich der Retentionszeit und des UV-Spektrums mit entsprechenden Standards. Aufgrund eines fehlenden 1-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-2-propanon (1-HPP)-Standards wurde die Zuordnung auf Basis der Ähnlichkeit des UV-Spektrums zu 2-HPP getroffen.

### 2.10.3 Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,[2-<sup>13</sup>C]-propandion & [2-<sup>13</sup>C]-HPP

Die Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,[2-<sup>13</sup>C]-propandion wurde chemoenzymatisch in 2 Schritten ausgehend von *p*-Anisaldehyd (50 mM) und <sup>13</sup>C<sub>2</sub>-Natriumpyruvat (25 mM) durchgeführt, welche zunächst durch lyophilisiertes PSA-Myzel (MEP, Dk) zu den [<sup>13</sup>C]-substituierten- $\alpha$ -Hydroxyketonen in Phosphatpuffer (2.10.1) umgesetzt wurden (Gleichung 1).



**Gleichung 1: Synthese von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,[2-<sup>13</sup>C]-propandion (<sup>13</sup>C-Diketon) durch Umsetzung von *p*-Anisaldehyd mit [2-<sup>13</sup>C]-Natriumpyruvat zu den substituierten  $\alpha$ -Hydroxyketonen und anschließender Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan (DMP) in Dichlormethan (DCM) zum Endprodukt**

Der Reaktionsansatz von 20 parallel angesetzten Proben wurde inkubiert, das Tautomerengpaar des [<sup>13</sup>C]-substituierten- $\alpha$ -Hydroxyketons wurde extrahiert und nach dem Trocknen (2.10.2) mittels GC-MS (Tabelle 48, Splitverhältnis 30:1) analysiert.

Nach Entfernen des Lösungsmittels über eine Vigreux-Kolonnen, wurden 75 mL Dichlormethan und 1,8 g Dess-Martin-Periodinan zu dem Produkt gegeben und für 2 h bei RT gerührt (Dess & Martin, 1983; Speicher *et al.*, 1996). Anschließend wurde das Diketon schrittweise abgetrennt. Dafür wurden jeweils 30 mL des Reaktionsgemisches mit 60 mL 1 M Natriumhydroxidlösung und 150 mL P/D (1:1,12, v/v)

mittels Scheidetrichter extrahiert. Nach Trennung und Waschen wurden die organischen Phasen vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend mittels Vigreux-Kolonne entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC (Tabelle 17, Präparatives System I) gereinigt.

Anschließend wurde die gaschromatographische Reinheit bestimmt (Tabelle 44; Temperaturrampe anstelle 5 °C auf 20 °C geändert, *splitless*).

Die Reduktion des substituierten Diketons zu [<sup>13</sup>C]-2-HPP durch lyophilisiertes PSA Mk 37 Myzel (MEP) wurde analog zum in Abschnitt 2.7.3 beschriebenen Vorgehen durchgeführt. Anstelle der dort eingesetzten Bäckerhefe wurde hier das erwähnte Pilzmyzel eingesetzt.

### 2.11 Abschätzung der Geruchsschwelle von 2-HPP

Die Abschätzung der Geruchsschwelle von 2-HPP erfolgte nach Ullrich und Grosch unter Verwendung von (*E*)-Dec-2-enal mit einer Geruchsschwelle in Luft von 2,7 ng L<sup>-1</sup> als internem Standard (Teranishi *et al.*, 1974; Ullrich & Grosch, 1987). Die Mischung des isolierten 2-HPP und des internen Standards wurde schrittweise 1 + 1 (v/v) mit Acetonitril verdünnt und mittels GC-FID-O (Tabelle 43; geändertes Temperaturprogramm: 40 °C (3 min), Temperaturanstieg auf 200 °C (8 min) mit 5 °C min<sup>-1</sup>, Temperaturanstieg auf 240 °C (7 min) mit 20 °C min<sup>-1</sup>; abweichende Temperaturen: ODP *Transferline*, 300 °C; Mischkammer 200 °C) durch 3 Panelisten (1 weiblich, 2 männlich) analysiert. Die ordnungsgemäße Verdünnung der Stammlösung wurde überprüft indem der log<sub>2</sub> der Peakflächen des internen Standards, der Zielsubstanz ebenso wie des 1-HPP und des Diketons gegen den Verdünnungsfaktors aufgetragen wurden (Abbildung A 2).

Zur Beurteilung der allgemeinen geruchlichen Wahrnehmung wurde zudem eine gaschromatographisch-olfaktorische Analyse mit identischen Parametern durch 12 Panelisten durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

Der überwiegende Teil der Ergebnisse wurde bereits in dem im Juni 2021 veröffentlichten Projekt-Schlussbericht (Förderkennzeichen: 031B0307B) dargestellt.

#### 3.1 Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes der Substrate und Berechnung der Medienzusammensetzung

Als Hauptsubstrat für die Fermentation wurden Nebenströme der *Citrus*-verarbeitenden Industrie genutzt. Aufgrund unterschiedlicher Umweltgegebenheiten und auch verschiedener Prozessierungsschritte sind die Nährstoffgehalte solcher Nebenprodukte z.T. sehr verschieden. Um den Einsatz der 4 unterschiedlichen CSS-Substrate vergleichbar zu machen, wurde der Gesamtkohlenhydratgehalt (GKH) als entscheidender Kultivierungsparameter ausgewählt. Dieser wurde mittels Orcinol-Schwefelsäure-Assay (2.4.1) für jeden Nebenstrom abgeschätzt.

Nach Fraatz *et al.* (2014) verbraucht PSA in den ersten vier Wachstumstagen ungefähr  $15 \text{ g L}^{-1}$  an Glucose. Standardmäßig wurden dem CSSM  $3 \text{ g L}^{-1}$  Glucose-Monohydrat zugegeben. Die verbleibenden  $12 \text{ g L}^{-1}$  wurden unter Berücksichtigung der Trockenmasse über den jeweiligen Nebenstrom abgedeckt (Tabelle 55).

**Tabelle 55: Gesamtkohlenhydratgehalte der Substrate und deren eingesetzten Anteile im jeweiligen Medium**

Substrat	GKH		Anteil im Medium
	Konzentration [g (100 g) <sup>-1</sup> ]	Konzentration [g 100 g TM <sup>-1</sup> ]	Konzentration [g L <sup>-1</sup> ]
CSS <sub>1</sub>	69,0 ± 5,7	85,1 ± 6,4	17,4
CSS <sub>2</sub>	30,7 ± 3,8	37,1 ± 4,8	39,1
CSS <sub>3</sub>	81,8 ± 0,7	91,2 ± 0,8	14,7
CSS <sub>4</sub>	16,7 ± 0,8	90,6 ± 4,2	71,8

Der Gehalt an Gesamtkohlenhydraten, ausgedrückt als Glucose-Monohydrat, unterschied sich in den Substraten 1, 3 und 4 nicht sehr deutlich voneinander, wobei die Gehalte (bezogen auf die Trockenmasse) der beiden Orangensubstrate (CSS<sub>3</sub> und CSS<sub>4</sub>) sehr dicht beieinander lagen. Auffällig war jedoch der geringere GKH des CSS<sub>2</sub>-Substrates, der weniger als die Hälfte des CSS<sub>1</sub> betrug, wobei es sich dabei um zwei Chargen des gleichen Verarbeiters handelte. Dies hatte zur Folge, dass ungefähr

die doppelte Menge im Medium eingesetzt werden musste, um einen vergleichbaren Kohlenhydratanteil zu gewährleisten.

## 3.2 Kultivierung von monokaryotischen PSA-Stämmen als *Food Grade Material*

### 3.2.1 Maßstabsvergrößerung

Für die Anschlussnutzung des Fermentationsproduktes als Fischfuttersupplement wurde das Kulturvolumen im ersten Schritt im 2-L-Schüttelkolben auf 800 mL vergrößert (2.3.1). Aus insgesamt 12 L CSSM wurden 121 g lyophilisiertes Material gewonnen, was ca. 10 g pro L Medium entspricht. Der Ansatz aus CSSM<sub>3</sub> lieferte 139 g lyophilisierte Biomasse aus 15,2 L Medium, was ca. 9 g pro L Medium ergibt.

Im nächsten Schritt wurde der Fermentationsprozess auf den 7,5-L-Bioreaktor-Maßstab übertragen und die Prozessparameter angepasst (2.3.2). Da sich im Verlauf der weiteren Arbeiten zur Aromastoffgenese PSA Mk 37 als am besten geeigneter Kandidat herausstellte, wurde im Bioreaktor von Mk 74 auf Mk 37 umgestellt. Außerdem wurde in diesem Schritt auf CSSM<sub>4</sub> gewechselt, da den Projektpartnern vor allem Seitenströme der orangenverarbeitenden Industrie zur Verfügung stand und so eine bessere Vergleichbarkeit mit dem vor Ort vorhandenen Substrat gegeben war. Während des Optimierungsprozesses wurde außerdem der Substratanteil im Medium im Vergleich zum ursprünglich berechneten Gehalt reduziert, da sich der Terpenanteil negativ auf das Wachstum des Pilzes auswirkte. Schließlich erfolgte die Übertragung des Prozesses in den Pilotmaßstab im 150-L-Bioreaktor (2.3.3).

### 3.2.2 Charakterisierung von Substrat, Medium und Fermentationsprodukten

#### 3.2.2.1 Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl, des Gesamtlipidgehaltes und der Fettsäureverteilung

Für die Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl (2.4.3), des Gesamtlipidgehaltes (2.4.7) und der Fettsäurezusammensetzung (Tabelle A 1) wurde das im *Food Grade* Labor hergestellte Fermentationsprodukt des CSSM PSA Mk 74 gewählt (2.3.1, Tabelle 56 und Tabelle 57).

**Tabelle 56: Gehalt an Stickstoff & Gesamtlipiden im lyophilisierten Fermentationsprodukt CSSM PSA Mk 74**

Parameter	Gehalt [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
Stickstoff	3,16 ± 0,04
Gesamtlipide	2,11 ± 0,02

**Tabelle 57: Fettsäureverteilung im lyophilisierten Fermentationsprodukt CSSM PSA Mk 74**

	Fettsäure	Anteil [%]
<b>C16:0</b>	Palmitinsäure	15,2
<b>C18:0</b>	Stearinsäure	6,0
<b>C18:1</b>	Ölsäure	17,6
<b>C18:2</b>	Linolsäure	47,3
<b>C18:3</b>	$\alpha$ -Linolensäure	4,7
<b>C24:0<sup>a</sup></b>	<i>n</i> -Tetracosansäure	2,3

<sup>a</sup>vorläufig identifiziert durch Vergleich der aufgenommenen Massenspektren mit der NIST 2011/2014 Datenbank (MS)

Bei der Analyse der Fettsäure wurden außerdem noch zwei weitere Substanzen (ca. 7%) detektiert, welche keiner der Fettsäuren des Standardmixes zugeordnet werden konnten.

### 3.2.3 Elementaranalyse

Um einen Überblick über die Hauptnährstoffe zu erhalten und deren Entwicklung über die Maßstabsvergrößerung beurteilen zu können, wurden die Substrate (2.1.5), die jeweiligen Medien (Tabelle 25) und die Fermentationsprodukte (2.3.1,2.3.2,2.3.3) mittels Elementaranalyse untersucht (Tabelle 58).

**Tabelle 58: Ergebnisse der Elementaranalyse für die Substrate, die daraus hergestellten Medien sowie der Fermentationsprodukte**

		Stickstoff [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	Kohlenstoff [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	Wasserstoff [g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
<b>Substrat</b>	CSS <sub>1</sub>	1,5 ± 0,1	51,5 ± 0,0	7,4 ± 0,0
	CSS <sub>3</sub>	0,9 ± 0,0	47,6 ± 0,1	7,0 ± 0,0
	CSS <sub>4</sub>	1,0 ± 0,0	47,1 ± 0,0	7,1 ± 0,0
<b>Medium</b>	CSSM <sub>1</sub>	1,2 ± 0,1	44,9 ± 0,1	7,0 ± 0,0
	CSSM <sub>3</sub>	0,7 ± 0,0	42,2 ± 0,1	6,7 ± 0,0
	CSSM <sub>4</sub> 5%	1,0 ± 0,0	42,8 ± 0,0	7,2 ± 0,0
<b>Fermentationsprodukt</b>	CSSM PSA Mk 74, Kolben	3,1 ± 0,0	46,5 ± 0,1	7,0 ± 0,0
	CSSM <sub>3</sub> PSA Mk 74, Kolben	2,4 ± 0,0	46,8 ± 0,1	6,8 ± 0,0

Fortsetzung Tabelle 58

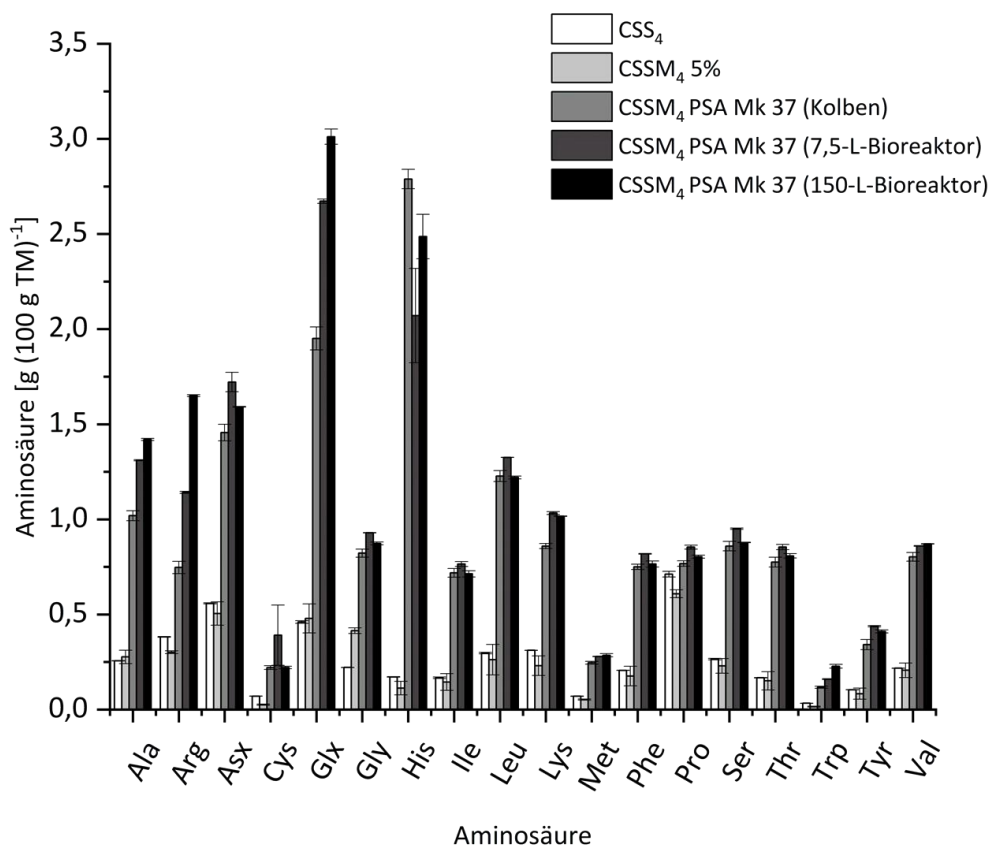
		Stickstoff	Kohlenstoff	Wasserstoff
		[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]
<b>Fermentationsprodukt</b>	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37, Kolben	3,1 ± 0,0	48,4 ± 0,0	7,5 ± 0,0
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37, 7,5 L Bioreaktor	3,4 ± 0,2	45,8 ± 0,3	6,7 ± 0,2
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37, 150 L Bioreaktor	4,3 ± 0,3	45,6 ± 0,1	7,0 ± 0,1

Vom Substrat hin zum Fermentationsprodukt war in allen Fällen eine ungefähre Verdopplung des Stickstoffgehaltes zu sehen. Bei CSSM<sub>4</sub> wurde der ursprüngliche Gehalt bis hin zum 150-L-Bioreaktor sogar mehr als vervierfacht. Der Kohlenstoffgehalt sank im Verlauf des Prozesses leicht und der Anteil an Wasserstoff blieb ungefähr konstant.

### 3.2.4 Aminosäureanalytik

#### 3.2.4.1 Aminosäureprofile im Verlauf der Maßstabsvergrößerung

Für die spätere Beurteilung der Proteinqualität auch im Hinblick auf den gewünschten Einsatz als Fischfuttersupplement wurde das Aminosäureprofil aller Fermentationsstufen untersucht. Dies erfolgte einerseits für die Kultivierung mit dem von der Zitrone stammenden Material (Abbildung A 3) als auch prozessbegleitend für die Fermentation des CSS<sub>4</sub> bis zum 150-L-Bioreaktor (Abbildung 3, Abbildung A 4). Da für die Projektpartner das Material aus der Orange von größerer Relevanz war, soll hier nur auf diese Ergebnisse eingegangen werden.



**Abbildung 3: Aminosäureprofile im Verlauf der Maßstabsvergrößerung vom Substrat über Medium bis hin zu den Fermentationsprodukten**

Mit 15,2% des Gesamtaminosäuregehaltes war Prolin die im Substrat anteilmäßig bedeutendste Aminosäure, gefolgt von Aspartat/Asparaginsäure (11,9%) und Glutamat/Glutaminsäure (9,9%). In den Fermentationsprodukten war dann Histidin eine der Hauptaminosäuren. Neben diesen Aminosäuren spielte auch Arginin eine Rolle, welches im Myzel aus dem 150-L-Fermenter anteilmäßig leicht vor Aspartat/Asparaginsäure lag.

### 3.2.4.2 Gesamtaminosäuregehalte der Substrate/Medien

Aus den aufgenommenen Aminosäureprofilen ließen sich die  $G_{AS}$  sowie  $AS_{res}$  der eingesetzten Substrate und Medien berechnen (Tabelle 59).

**Tabelle 59: Gesamtaminosäuregehalte und residuale Aminosäuregehalte der Substrate und Medien**

		CSS <sub>1</sub>	CSSM	CSS <sub>4</sub>	CSSM <sub>4</sub>
<b>G<sub>AS</sub></b>	[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	5,81 ± 0,0	4,84 ± 0,0	4,67 ± 0,0	4,28 ± 0,0
<b>AS<sub>res</sub></b>	[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	4,99 ± 0,0	4,16 ± 0,0	4,0 ± 0,0	3,64 ± 0,0

### 3.2.4.3 Gesamtaminosäuregehalte, Kjeldahlfaktoren und Proteingehalte der Fermentationsprodukte

Für alle im Laufe der Arbeit hergestellten Fermentationsprodukte, die für die Projektpartner bestimmt waren, wurde das Aminosäureprofil aufgenommen und mit Ausnahme von CSSM<sub>4</sub> PSA Mk 37 (Kolben) auch der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt, woraus sich verschiedene Parameter berechnen ließen (Tabelle 60).

**Tabelle 60: Gesamtaminosäuregehalte, Kjeldahlfaktoren und Proteingehalte verschiedener Fermentationsprodukte**

		CSSM Mk 74	PSA Mk 74	CSSM <sub>3</sub> Mk 74	PSA Mk 37 (Kolben)	CSSM <sub>4</sub> Mk 37 (7,5 L Bioreaktor)	PSA Mk 37 (150 L Bioreaktor)
<b>G<sub>AS</sub></b>	[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	16,32 ± 0,0	11,09 ± 0,01	16,47 ± 0,0	18,58 ± 0,0	19,25 ± 0,0	
<b>AS<sub>res</sub></b>	[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	14,00 ± 0,01	9,52 ± 0,01	14,16 ± 0,0	15,96 ± 0,0	16,58 ± 0,0	
<b>F</b>		5,64 ± 0,01	5,70 ± 0,01	5,51 ± 0,01	5,71 ± 0,05	5,45 ± 0,03	
<b>F<sub>net</sub></b>		4,63 ± 0,03	4,43 ± 0,13	n. b.	4,51 ± 0,12	3,92 ± 0,0	
<b>RHP (F)</b>	[g (100 g TM) <sup>-1</sup> ]	17,06 ± 0,26	12,25 ± 0,08	n. b.	20,21 ± 0,28	23,06 ± 0,74	
<b>Reinprotein (F<sub>net</sub>)</b>		14,01 ± 0,28	9,52 ± 0,33	n. b.	15,96 ± 0,50	16,58 ± 0,44	

n. b. nicht bestimmt

Von den untersuchten Produkten fiel insbesondere das fermentierte Material CSSM<sub>3</sub> auf, da der Gesamtaminosäuregehalt, der residuale Gesamtaminosäuregehalt sowie die Proteingehalte deutlich geringer waren als bei den anderen Produkten. Durch die Maßstabsvergrößerung und Optimierung des Prozesses wurde eine Erhöhung des Gesamtaminosäuregehaltes und des Proteinanteils bei gleichzeitig relativ konstant gebliebenen Kjeldahlfaktoren erreicht.

### 3.2.4.4 Berechnung verschiedener Merkmale im Zusammenhang mit der Proteinqualität

Um die Proteinqualität der verschiedenen Fermentationsstufen beurteilen zu können, wurden verschiedene Größen berechnet (2.4.5, Tabelle 61).

**Tabelle 61: Daten zur Beurteilung der Proteinqualität der verschiedenen Fermentationsstufen von CSSM<sub>4</sub> PSA Mk 37**

		Ile	Leu	Lys	Met & Cys	Phe & Tyr	Thr	Trp	Val	
<b>Anteil AS an G<sub>AS</sub> [%]</b>	CSS <sub>4</sub>	3,58 ±	6,35 ±	6,67 ±	3,01 ±	6,65 ±	3,58 ±	0,71 ±	4,66 ±	
		0,09	0,07	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,02	
	CSSM <sub>4</sub> 5%	3,31 ±	5,98 ±	5,32 ±	1,88 ±	5,98 ±	3,45 ±	0,37 ±	4,79 ±	
		0,58	1,06	0,48	0,40	1,07	0,66	0,11	0,25	
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (Kolben)	4,36 ±	7,45 ±	5,22 ±	2,83 ±	6,63 ±	4,70 ±	0,71 ±	4,88 ±	
		0,02	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,01	0,00	
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (7,5 L Bioreaktor)	4,12 ±	7,14 ±	5,56 ±	3,59 ±	6,77 ±	4,60 ±	0,86 ±	4,63 ±	
		0,17	0,19	0,10	0,75	0,15	0,19	0,04	0,11	
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (150 L Bioreaktor)	3,70 ±	6,34 ±	5,28 ±	2,63 ±	6,11 ±	4,20 ±	1,18 ±	4,52 ±	
		0,08	0,04	0,01	0,08	0,12	0,06	0,05	0,00	
	<b>AAS</b>	CSS <sub>4</sub>	0,89 ±	0,91 ±	1,21 ±	0,86 ±	1,11 ±	0,90 ±	0,71 ±	0,93 ±
			0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
CSSM <sub>4</sub> 5%		0,83 ±	0,85 ±	0,97 ±	0,54 ±	0,99 ±	0,86 ±	0,37 ±	0,96 ±	
		0,15	0,15	0,09	0,11	0,18	0,16	0,11	0,05	
CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (Kolben)		1,09 ±	1,06 ±	0,95 ±	0,81 ±	1,10 ±	1,18 ±	0,71 ±	0,98 ±	
		0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	

AS Aminosäure; G<sub>AS</sub> Gesamtaminosäuregehalt; AAS Amino Acid Score; CS Chemical Score

Fortsetzung Tabelle 61

		Ile	Leu	Lys	Met & Cys	Phe & Tyr	Thr	Trp	Val
<b>AAS</b>	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (7,5 L Bioreaktor)	1,03 ± 0,04	1,02 ± 0,03	1,01 ± 0,02	1,03 ± 0,22	1,13 ± 0,02	1,15 ± 0,05	0,86 ± 0,04	0,93 ± 0,02
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (150 L Bioreaktor)	0,93 ± 0,02	0,91 ± 0,01	0,96 ± 0,00	0,75 ± 0,02	1,02 ± 0,02	1,05 ± 0,01	1,18 ± 0,05	0,91 ± 0,00
<b>CS</b>	CSS <sub>4</sub>	89 ± 2	91 ± 1	121 ± 0	<b>86 ± 1</b>	111 ± 0	90 ± 0	<b>71 ± 0</b>	93 ± 0
	CSSM <sub>4</sub> 5%	83 ± 15	85 ± 15	97 ± 9	<b>54 ± 11</b>	99 ± 18	86 ± 16	<b>37 ± 11</b>	96 ± 5
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (Kolben)	109 ± 0	106 ± 0	95 ± 1	<b>81 ± 1</b>	110 ± 1	118 ± 1	<b>71 ± 1</b>	98 ± 0
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (7,5 L Bioreaktor)	103 ± 4	102 ± 3	101 ± 2	103 ± 22	113 ± 2	115 ± 5	<b>86 ± 4</b>	<b>93 ± 2</b>
	CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (150 L Bioreaktor)	93 ± 2	91 ± 1	96 ± 0	<b>75 ± 2</b>	102 ± 2	105 ± 1	118 ± 5	<b>90 ± 0</b>

AS Aminosäure; G<sub>AS</sub> Gesamtaminosäuregehalt; AAS *Amino Acid Score*; CS *Chemical Score*

Im Substrat und im gewonnenen Pilzmyzel im Schüttelkolben waren Tryptophan sowie Cystein und Methionin die limitierenden Aminosäuren. Während im Fermentationsprodukt aus der ersten Maßstabsvergrößerung die limitierenden Aminosäuren Tryptophan und Valin waren, wurde im Pilotmaßstab Tryptophan durch Cystein und Methionin abgelöst. Die biologische Wertigkeit (BW) wurde vom verwendeten Substrat bis hin zur Fermentation im 150-L-Bioreaktor von 87 leicht auf 89 gesteigert (Tabelle 62).

**Tabelle 62: Essential Amino Acid Index (EAAI) und biologische Wertigkeit (BW) der verschiedenen Fermentationsstufen des Substrates CSSM<sub>4</sub> mit PSA Mk 37**

	EAAI	BW
CSS <sub>4</sub>	90 ± 0	87 ± 0
CSSM <sub>4</sub> 5%	73 ± 2	68 ± 2
CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (Kolben)	92 ± 0	89 ± 0
CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (7,5 L Bioreaktor)	96 ± 0	93 ± 0
CSSM <sub>4</sub> PSA Mk 37 (150 L Bioreaktor)	93 ± 1	89 ± 1

### 3.3 Screening von monokaryotischen Stämmen des PSA

#### 3.3.1 Screening in Oberflächenkulturen

Um Unterschiede in der Aromabildung zwischen Di- und Monokaryoten zu untersuchen, wurden diese als Oberflächenkulturen auf mit CSSM<sub>1</sub> enthaltenden Agarplatten gezogen. Sobald der Agar mit Myzel bedeckt war, war in der Regel ein Anis-, Marzipan- und Vanille-ähnlicher Geruch wahrnehmbar. Einige Stämme wiesen zudem einen waldmeisterartigen, krautigen Geruch auf und rochen nach Tonkabohne. Zwischen den einzelnen Stämmen gab es außerdem Intensitätsunterschiede. Bei einigen wenigen Stämmen kam es auch zu muffigen und unangenehmen Geruchseindrücken. Dementsprechend wurden alle Stämme in 4 Geruchskategorien eingeteilt (Tabelle 63).

**Tabelle 63: Einteilung der PSA-Stämme in Geruchskategorien nach Oberflächenskultivierung in Citrus-supplementiertem Medium; 1: muffig, unangenehm, 2: PSA-typisch, jedoch schwach und z. T. mit Fehlnoten, 3: PSA-typisch, 4: waldmeisterartig, Cumarin, krautig und z. T. süßlich; Dk: Dikaryot, Mk: Monokaryot.**

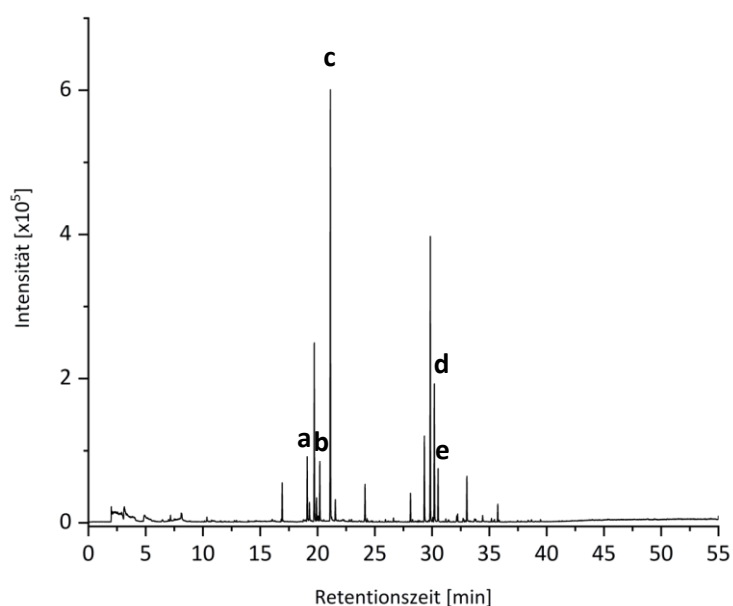
Kategorie 1	Kategorie 2		Kategorie 3	Kategorie 4
Mk 106	Dk 69	Mk 93	Mk 13	Mk 37
Mk 125	Mk 1	Mk 96	Mk 19	Mk 41
Mk 209	Mk 2	Dk 3174	Mk 28	Mk 49
Mk 214	Mk 5	Mk 107	Mk 33	Mk 57
Mk 232	Mk 15	Mk 108	Mk 34	Mk 55
Mk 233	Mk 27	Mk 115	Mk 38	Mk 74
	Mk 31	Mk 119	Mk 90	Mk 117
	Mk 32	Mk 129	Mk 100	Mk 124
	Mk 45	Mk 132	Mk 101	Mk 126
	Mk 60	Mk 203	Mk 103	Mk 216
	Mk 70	Mk 217	Mk 113	Mk 229
	Mk 78	Mk 223	Mk 127	
	Mk 82	Mk 226	Mk 201	
	Mk 85	Mk 228	Mk 219	
	Mk 88		Mk 225	
			Mk 234	

Der überwiegende Anteil der Stämme wurde der 2. Kategorie zugeordnet, da sie als nicht besonders intensiv wahrgenommen wurden oder der angenehme Geruch an nur wenigen Kulturtagen wahrnehmbar war. Unter den Stämmen der 4. Kategorie stach Mk 37 deutlich heraus, da sein

harmonischer Geruch mit Noten der Tonkabohne sowie herb-süßlichen Eindrücken über viele Kulturtage hinweg wahrnehmbar war.

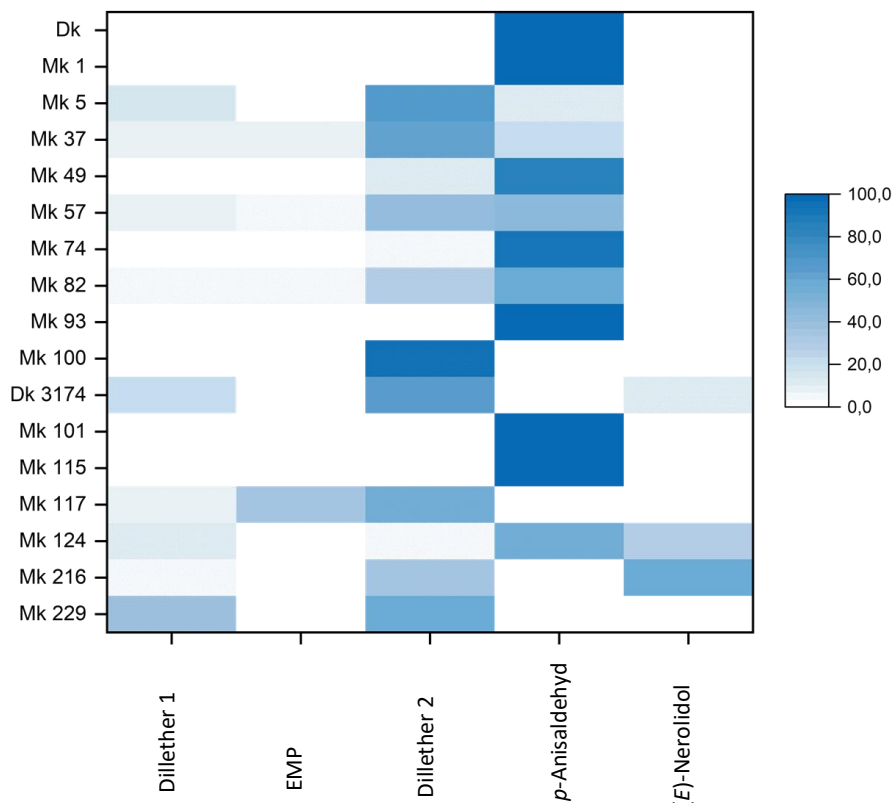
### 3.3.2 Screening in SNL-Submerskultur

Zum besseren Vergleich der Pilze in einem für deren Kultivierung weit verbreiteten Medium, dem SNL-Medium, wurden alle Stämme entsprechend angezogen und aromaanalytisch untersucht (2.5.2). Die entsprechenden Chromatogramme wiesen über alle Pilzstämme hinweg ca. 60 geruchsaktive Substanzen auf (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** GC-MS-Chromatogramm des Kulturüberstandes (Tag 3) von SNL PSA Mk 37, extrahiert mittels HS-SPME; a: Dillether 1, b: 3,9-Epoxy-*p*-mentha-1,8-(10)-dien (EMD), c: Dillether 2, d: *p*-Anisaldehyd, e: (*E*)-Nerolidol.

In nahezu allen Pilzen wurden die folgenden fünf Verbindungen detektiert: Dillether 1 (a) und Dillether 2 (c), 3,9-Epoxy-*p*-mentha-1,8-(10)-dien (EMD) (b), *p*-Anisaldehyd (d) und (*E*)-Nerolidol (e). Zur Veranschaulichung wurden die Peakflächen dieser Substanzen summiert und auf 100% gesetzt (Abbildung 5, Abbildung A 5, Abbildung A 6)

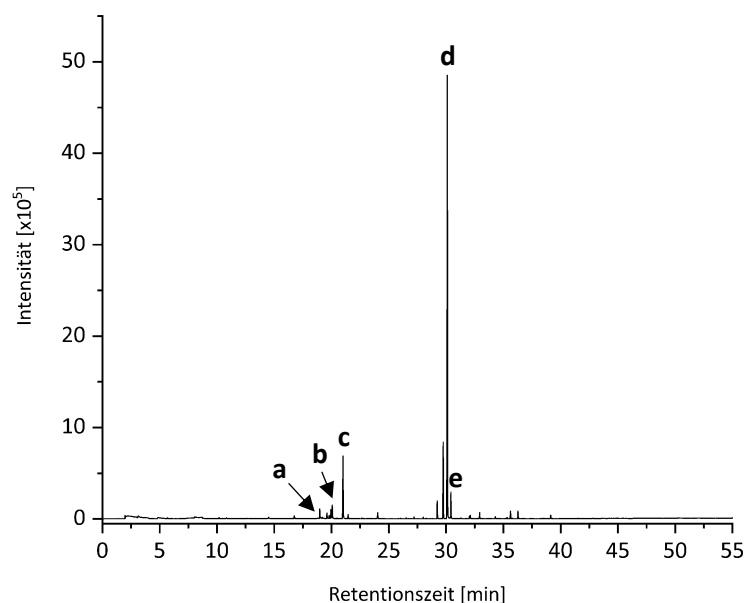


**Abbildung 5: ausgewählte geruchsaktive Substanzen in SNL-Kulturüberständen verschiedener PSA Dikaryoten (Dk) und Monokaryoten (Mk)**

Die meisten Chromatogramme der untersuchten Pilze wurden durch den nach Anis und Waldmeister riechenden Aromastoff *p*-Anisaldehyd dominiert (Abbildung 6).

Die Pilze der zweiten Generation (Dk 3174, Mk 101-234) wurden hauptsächlich durch den zweiten Dillether geprägt und in nur wenigen Fällen (z.B. Mk 101 und Mk 115) war *p*-Anisaldehyd vorherrschend. In den Mks der ersten Generation dagegen waren die Vertreter Mk 5 und Mk 100 eher untypisch. Dies spiegelte sich auch in den Geruchseindrücken wider. Mk 100 wurde als buttrig, nach Vanille riechend und schokoladig beschrieben. Dabei bezieht sich das Attribut „schokoladig“ im Wesentlichen auf den herben Eindruck einer Zartbitterschokolade. Für PSA typische Noten, wie anisartig, nach Marzipan trafen für diese Pilze eher nicht zu.

Neben den genannten Verbindungen wurden auch Substanzen wie Limonen, Benzaldehyd oder 1-Octen-3-ol, je nach Kultur, detektiert.

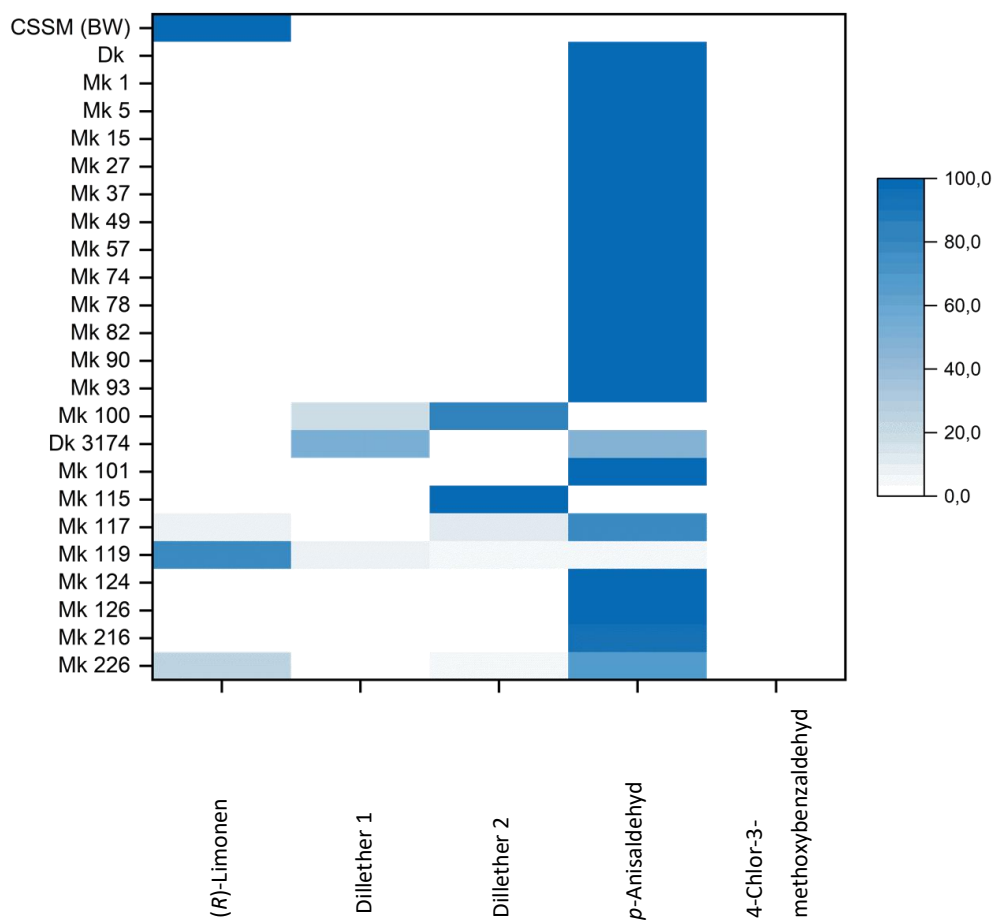


**Abbildung 6:** GC-MS-Chromatogramm des Kulturüberstandes (Tag 3) von SNL PSA Mk 49 extrahiert mittels HS-SPME; a: Dillether 1, b: 3,9-Epoxy-p-mentha-1,8-(10)-dien (EMD), c: Dillether 2, d: p-Anisaldehyd, e: (E)-Nerolidol.

Anhand der Analyse des Aromaprofils über mehrere Kulturtage und auch über verschiedene Kultivierungsansätze zweier Beispiele (Mk 37 und Mk 93) wurde die weitgehende Stabilität und Reproduzierbarkeit der Fermentationen durch die Mk gezeigt (Tabelle A 2, Tabelle A 3).

### 3.3.3 Screening in CSS-Submerskultur

Für interessante Vertreter der monokaryotischen Stämme der ersten und zweiten Generation wurden Flüssigkulturen mit CSS-Substrat als Hauptkohlenstoffquelle angelegt, die anhand des HS-SPME-Screenings der SNL-Submerskulturen und des Oberflächenscreenings auf CSSM-Agar ausgewählt wurden. Exemplarisch wurden die Peakflächen von fünf identifizierten, strukturell unterschiedlichen Verbindungen summiert, auf 100% normiert und die jeweiligen relativen Peakflächen dargestellt. Limonen wurde dabei als Vertreter für *Citrus*-Monoterpene ausgewählt, die Dillether für Monoterpen-Ether, p-Anisaldehyd für die Methoxybenzaldehydderivate und 4-Chlor-3-methoxybenzaldehyd als halogenierte Verbindung, welche charakteristisch für Basidiomycota ist (Beck *et al.*, 1996). Neben weiteren typischen *Citrus*-Komponenten wie beispielsweise  $\gamma$ -Terpinen oder  $\alpha$ -Terpineol wurden vor allem arylische Substanzen detektiert.



**Abbildung 7: ausgewählte volatile Substanzen in CSS-Kulturüberständen verschiedener PSA Di- und Monokaryoten im Vergleich zum Medium (CSSM BW)(Kulturtag 4)**

Im Medium (CSSM) wurde nach vier Inkubationstagen innerhalb der ausgewählten Substanzen ausschließlich Limonen detektiert. Dies war in den Di- und Monokaryoten in den meisten Fällen kaum oder gar nicht vorhanden.

Mit Ausnahme von einigen wenigen Monokaryoten (Mk 100, Mk 115, Mk 119), dominierte in allen anderen ausgewählten Stämmen *p*-Anisaldehyd.

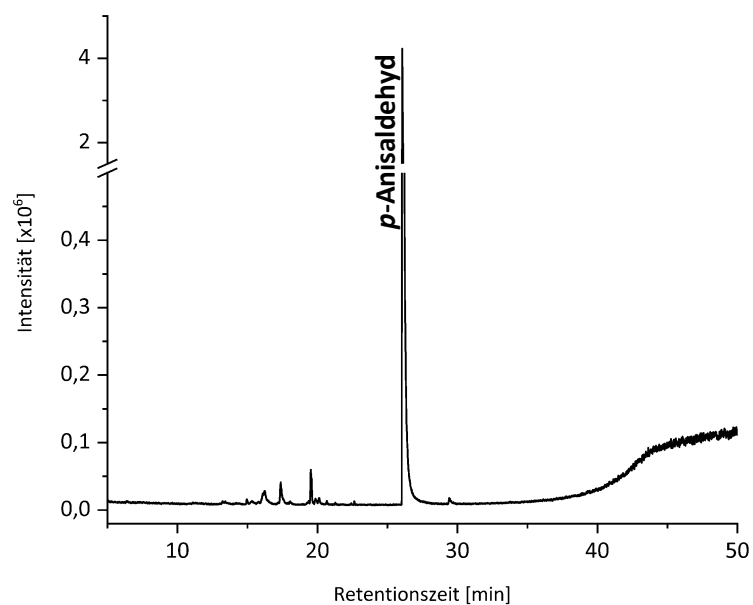
Mk 100 und Mk 115 waren geprägt von den Dillethern, insbesondere von Dill ether 2, während Mk 119 Limonen aus dem Substrat kaum umzusetzen schien. Insgesamt zeigte sich eine deutlich größere Variabilität in der zweiten Generation als in der ersten Generation.

### 3.4 Extraktionsvergleich & sensorische Analyse submerser Kulturen

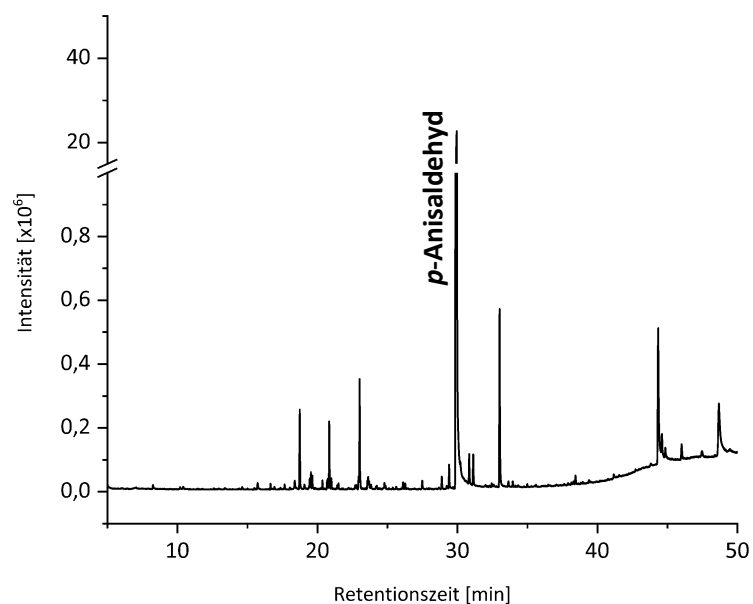
#### 3.4.1 Vergleich der Extraktionstechniken HS-SPME, DI-SBSE & LLE/SAFE

Um die am besten geeignete Technik für die zu untersuchenden Fermentationsprodukte zu identifizieren, wurden 3 Techniken vergleichend an jeweils der gleichen Kultur getestet. Dargestellt wurden hier die Ergebnisse des Mk 37 in CSSM<sub>1</sub>.

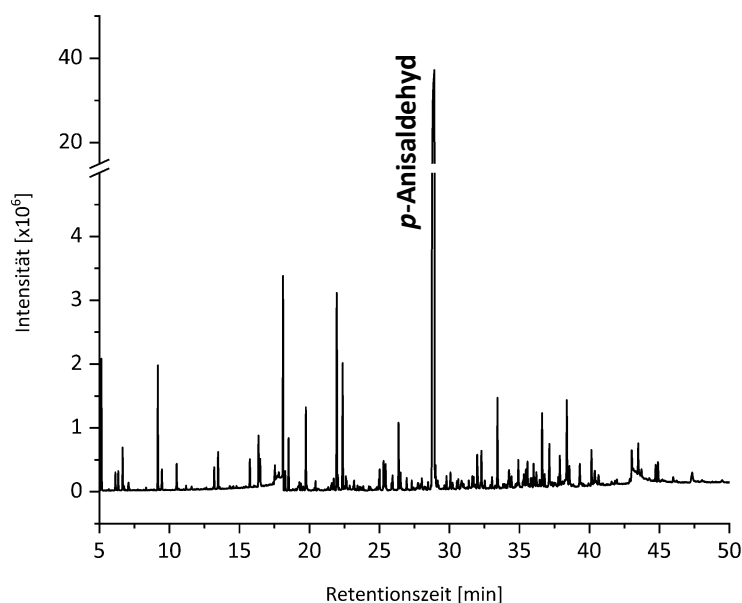
Mittels HS-SPME war eine lösungsmittelfreie, automatisierte Extraktion der volatilen Verbindungen im Kulturüberstand möglich. Durch die einfache Handhabung war es die geeignetste Methode für das in Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3 beschriebene Screening. Auffällig war jedoch die Diskriminierung von schwererflüchtigen Verbindungen (Abbildung 8). Zur Erfassung dieses Bereichs wurde die DI-SBSE ergänzend ausgewählt (Abbildung 9). Diese Methode war sehr sensitiv, wobei sich jedoch auch herausstellte, dass sich *p*-Anisaldehyd als dominierender Aromastoff nicht vollständig von den Twistern desorbieren ließ. Als Alternative wurde auf die herkömmliche Methode der LLE in Verbindung mit der SAFE zurückgegriffen. Dadurch wurde sowohl der leichtflüchtige Anteil der geruchsaktiven Substanzen als auch der schwererflüchtige Anteil erfasst (Abbildung 10).



**Abbildung 8:** GC-MS-Chromatogrammausschnitt von CSSM<sub>1</sub> PSA Mk 37 extrahiert mittels HS-SPME (Split 20:1)



**Abbildung 9:** GC-MS-Chromatogrammausschnitt von CSSM<sub>1</sub> PSA Mk 37 extrahiert mittels DI-SBSE (Split 50:1)

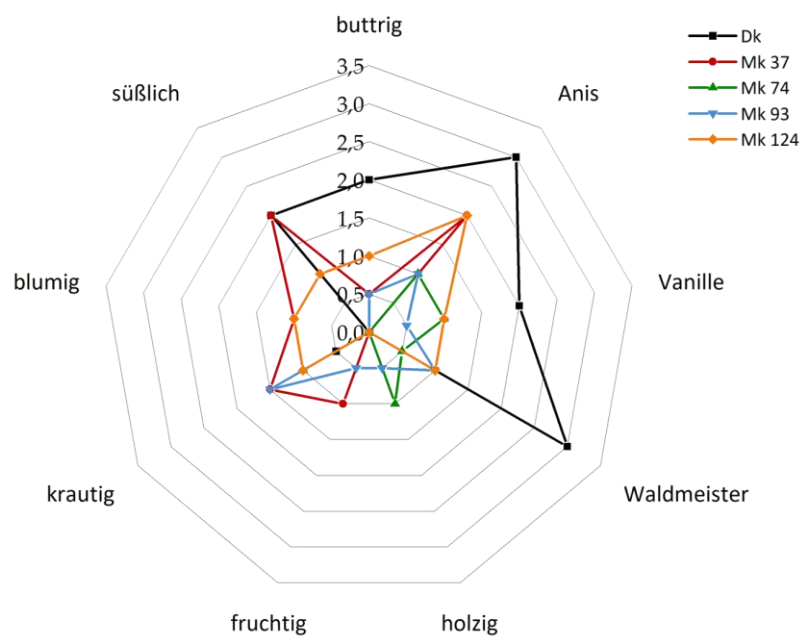


**Abbildung 10: GC-MS-Chromatogrammausschnitt von CSSM<sub>1</sub> PSA Mk 37 extrahiert mittels LLE/SAFE (Split 20:1)**

### 3.4.2 Sensorische Analyse

Um den Gesamtgeruchseindruck der submersen Kulturen beurteilen zu können, wurden die LLE/SAFE-Destillate sensorisch analysiert (2.6.4). Dabei ergab sich ein detaillierteres Bild der Unterschiede zwischen den untersuchten PSA-Stämmen (Abbildung 11). Da die Intensität für den Deskriptor „Zitrus“ in allen Kulturen  $\leq 0,5$  war, wurde dieser nicht dargestellt.

Die am stärksten ausgeprägten Noten, an Waldmeister, Anis, Butter und Vanille erinnernd, wurden durch den Dikaryoten hervorgerufen. Allerdings wurde bei dem Aromaextrakt dieser Kultur „fruchtig“ und „krautig“ kaum wahrgenommen. Das Aroma des Mk 74 wurde neben den Anis- und Vanillenoten auch als holzig beschrieben. Dieses Attribut wurde in abgeschwächter Form nur für Mk 93 verwendet. Ein insgesamt besonders ansprechendes Aromaprofil wurde bei Kulturen von Mk 37 wahrgenommen, sodass dieser Stamm, wie sich bereits auch in den zuvor beschriebenen Analysen zeigte, für die im weiteren Verlauf der Arbeit getätigten Experimente, ausgewählt wurde.



**Abbildung 11: Sensorische Eindrücke von LLE/SAFE Proben von CSSM<sub>1</sub> Kulturen eines dikaryotischen Stammes (Dk) und verschiedener monokaryotischer Stämme (Mk)**

### 3.5 Aromaextraktverdünnungsanalyse & Substanzidentifizierung

Um die Hauptaromastoffe der SAFE-Destillate zu identifizieren, wurde die AEVA mit Mk 37 durchgeführt (2.7.1 und 2.7.2). Mit Hilfe dieser Methode wurden am ODP Geruchseindrücke mit einem  $FD \geq 64$  für 48 Verbindungen erhalten (Tabelle 64). Die Identifizierung der Substanzen erfolgte im Wesentlichen durch den Vergleich der aufgenommenen Massenspektren mit der NIST 2011 Datenbank (MS), der Bestätigung der Massenspektren und Retentionsindices auf einer polaren und einer unpolaren Säule mit authentischen Standards (STD) (Tabelle A 4), sofern erhältlich und dem Vergleich des erhaltenen Geruchseindruck mit Literatur und authentischem Standard (O). Da für die beiden Dill ether-Isomere keine authentischen Standards erhältlich waren, wurde ein in der Arbeitsgruppe hergestellter Extrakt aus Lindenblütenhonig für die Identifizierung genutzt. Die Struktur der Verbindung **48** wurde mittels NMR und HRMS nach Isolierung dieser Substanz aufgeklärt.

Zahlreiche Monoterpene und Terpenalkohole, die typischerweise in *Citrus*früchten vorkommen wurden detektiert (Moshonas *et al.*, 1972; Choi *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2014; Cannon *et al.*, 2015; Guneser & Yilmaz, 2017). Die Isomere  $\alpha$ -Pinen und  $\beta$ -Pinen (**1**, FD 128; **4**, FD 512) wurden neben Sabinen (**5**, FD 2048), (*R*)-Limonen (**6**, FD 256) und *p*-Cymen (**8**, FD 8192) gefunden. Außerdem wurden Terpinen-4-ol (**21**, FD 1024), das entsprechende Isomer  $\alpha$ -Terpineol (**25**, FD 16.384) sowie die „blumig“ und „fruchtig“ riechende Verbindung Linalool (**19**, FD 2048) detektiert. Alle diese Verbindungen wurden auch im *Citrus*-supplementierten Medium, welches zur Kultivierung des PSA Mk 37 verwendet wurde, identifiziert.

Andere für *Citrus*früchte beschriebene Aromaverbindungen, wie *p*-Cymen-8-ol (**29**, FD 512) und die beiden Monoterpenketone Dihydrocarvon (**22**, FD 1024) und Piperiton (**26**, FD 64), kamen nicht im verwendeten Substrat vor (Moshonas *et al.*, 1972; Cannon *et al.*, 2015).

**Tabelle 64: Ergebnisse der Aromaextraktverdünnungsanalyse von CSSM<sub>1</sub> PSA Mk 37 extrahiert mittels LLE/SAFE**

#	RI		Verbindung	Erhaltener Geruchseindruck	FD Faktor
	VF-WAXms	DB-5 ms			
<b>1</b>	1016	930	$\alpha$ -Pinen	krautig, süßlich, terpenartig	128
<b>2</b>	1036	< 800	2-Methylbut-3-en-2-ol	krautig	2048
<b>3</b>	1062		n. i. <sup>3</sup>	süßlich, fruchtig	128
<b>4</b>	1102	974	$\beta$ -Pinen	krautig, grün, säuerlich	512
<b>5</b>	1120	970	Sabinen	terpenartig, krautig, muffig	2048
<b>6</b>	1197	1027	( <i>R</i> )-Limonen	Zitrus, frisch	256

Fortsetzung Tabelle 64

#	RI		Verbindung	Erhaltener Geruchseindruck	FD Faktor
	VF- WAXms	DB-5 ms			
7	1209		2-Methyl- <i>n</i> -butanol	grün, süßlich	512
8	1268	1023	<i>p</i> -Cymen	Zitrus, frisch, terpenartig	8192
9 <sup>1</sup>	1296		n. i.	grün, krautig	512
10 <sup>1</sup>	1340		n. i.	minzig, süßlich	512
11	1345	913	Anisol	blumig, süßlich	1024
12	1355	878	Hept-1-en-3-ol (IS)	grün, würzig	256
13 <sup>1,2</sup>	1375		n. i.	Zitrus, krautig	16.384
14 <sup>1,2</sup>	1424		n. i.	muffig, terpenartig	256
15 <sup>2</sup>	1448	1131	( <i>Z</i> )-Limonenoxid	blumig, süßlich	1024
16	1469	1085	( <i>Z</i> )-Linalooloxid (furanoid)	Zitrus, krautig, süßlich	64
17	1510	1184	3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a- hexahydrobenzofuran (Dillether)-isomer	grün, Zitrus, süßlich	32.768
18	1530	958	Benzaldehyd	süßlich	1024
19	1550	1098	Linalool	blumig, fruchtig	2048
20	1593	1229	3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a- hexahydrobenzofuran (Dillether)-isomer	minzig, Zitrus	128
21	1601	1179	Terpinen-4-ol	terpenartig, grün	1024
22	1608	1196	Dihydrocarvon		
23	1630		n. i.	blumig, frisch	32.768
24	1634	1148	n. i.	krautig	8192
25	1697	1193	$\alpha$ -Terpineol	grün, krautig, blumig	16.384
26	1729	1255	Piperiton	Zitrus, blumig, minzig	64
27 <sup>2</sup>	1763	1182	<i>p</i> -Methylacetophenon	süßlich	2048
28	1782		n. i.	grün, fettig	2048
29	1850	1185	<i>p</i> -Cymen-8-ol	süßlich, blumig, Zitrus	512
30	1881		n. i.	blumig, süßlich, grün	1024
31	1908	1196	<i>m</i> -Anisaldehyd (IS)	blumig, süßlich	512
32	1988		n. i.	grün, süßlich Waldmeister	512

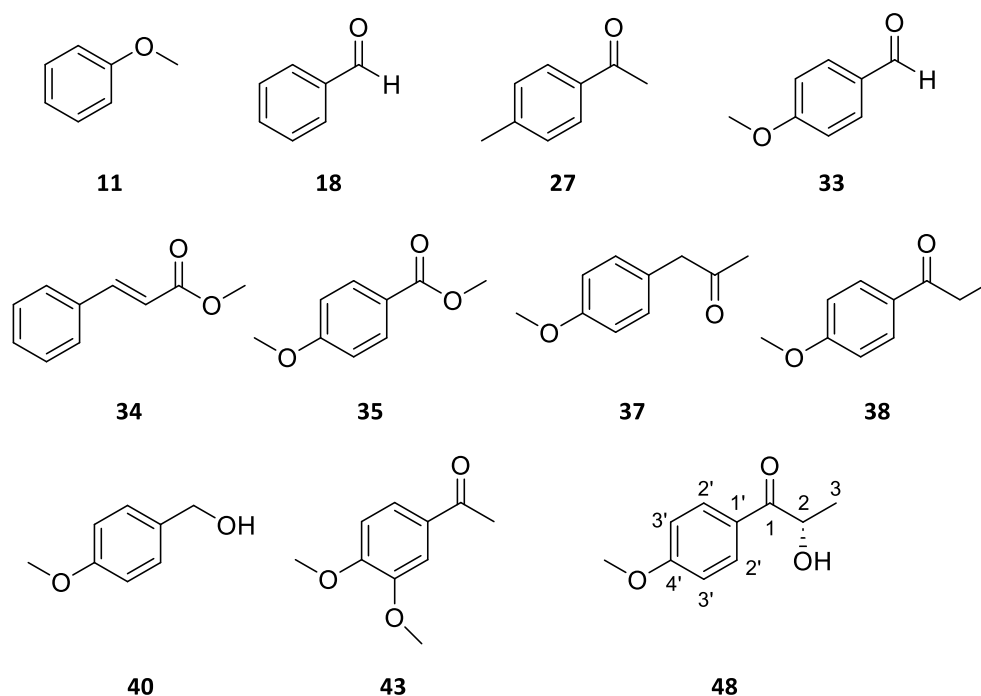
Fortsetzung Tabelle 64

#	RI		Verbindung	Erhaltener Geruchseindruck	FD Faktor
	VF-WAXms	DB-5 ms			
<b>33</b>	2034	1265	<i>p</i> -Anisaldehyd	Anis, süßlich Waldmeister	262.144
<b>34</b>	2080	1382	( <i>E</i> )-Methylcinnamat	balsamisch, süßlich	1024
<b>35</b>	2095	1371	Methyl- <i>p</i> -anisat	süßlich, krautig	4096
<b>36</b>	2121		n. i.	minzig, süßlich, Vanille	512
<b>37</b>	2155	1379	<i>p</i> -Methoxyphenylaceton	grün, holzig, würzig	512
<b>38</b>	2211	1447	<i>p</i> -Methoxypropiophenon	süßlich, fruchtig, grün	1024
<b>39</b>	2240	1449	3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(3 <i>H</i> )-on (Weinlacton)-isomer	süßlich, fruchtig, grün	2048
<b>40</b>	2276	1281	<i>p</i> -Methoxybenzylalkohol	süßlich, krautig	512
<b>41</b>	2298		n. i.	blumig, wachsig, süßlich	16.384
<b>42</b>	2350	1524	n. i.	blumig, süßlich, krautig	65.536
<b>43</b>	2400	1474	3,4-Dimethoxybenzaldehyd	süßlich, Waldmeister	8192
<b>44</b>	2427		n.i.	süßlich, fruchtig	256
<b>45</b>	2461		n.i.	blumig, Vanille, krautig	128
<b>46</b>	2508		n. i.	krautig, würzig, blumig	16.384
<b>47</b>	2540		n. i.	fruchtig, krautig, süßlich	1024
<b>48</b>	2571	1549	2-HPP	krautig, süßlich	512

<sup>1</sup> RI des erhaltenen Geruchseindruck berechnet; <sup>2</sup> Geruchsintensitäten können durch eine coeluiierende Verbindung verstärkt sein; <sup>3</sup> nicht identifiziert (n. i.)

Eine Verbindung mit einem relativ hohen FD-Faktor war der bityklische monoterpene Dillether 1 (**17**, FD 32.768), während das Isomer Dillether 2 einen deutlich niedrigeren FD-Faktor (**20**, FD 128) zeigte.

Mit 12 Verbindungen war eine weitere große Gruppe die der aromatischen Strukturen (Abbildung 12). *p*-Anisaldehyd (**33**) mit einem FD Faktor von 262.144 wies einen süßlichen Geruch mit Noten nach Anis und Waldmeister auf.



**Abbildung 12: Strukturen aromatischer Verbindungen in CSSM PSA Mk 37 identifiziert, Anisol (11), Benzaldehyd (18), p-Methylacetophenon (27), p-Anisaldehyd (33), (E)-Methylcinnamat (34), Methyl-p-anisat (35), p-Methoxyphenylacetone (37), p-Methoxypropiofenone, p-Methoxybenzylalkohol (40), 3,4-Dimethoxybenzaldehyd (43), 2-HPP (48)**

Eine weitere zu dieser Gruppe zählende Verbindung war die letzte wahrgenommene Substanz (**48**, FD 512), welche durch die Panelisten als krautig und süßlich riechend beschrieben wurde. Auffällig war die Ähnlichkeit des Massenspektrums mit dem des *p*-Anisaldehyds. Beide Substanzen zeigten einen Basispeak bei  $m/z$  135 (Abbildung A 7 und Abbildung 16a).

Durch Vergleich mit der vorliegenden NIST Datenbank gab es keinen sinnvollen und eindeutigen Strukturvorschlag.

Nach Isolierung und entsprechenden Methoden der Strukturaufklärung wurde die Substanz als 2-Hydroxy-1-(4-methoxyphenyl)-1-propanon (2-HPP) identifiziert (Tabelle 65).

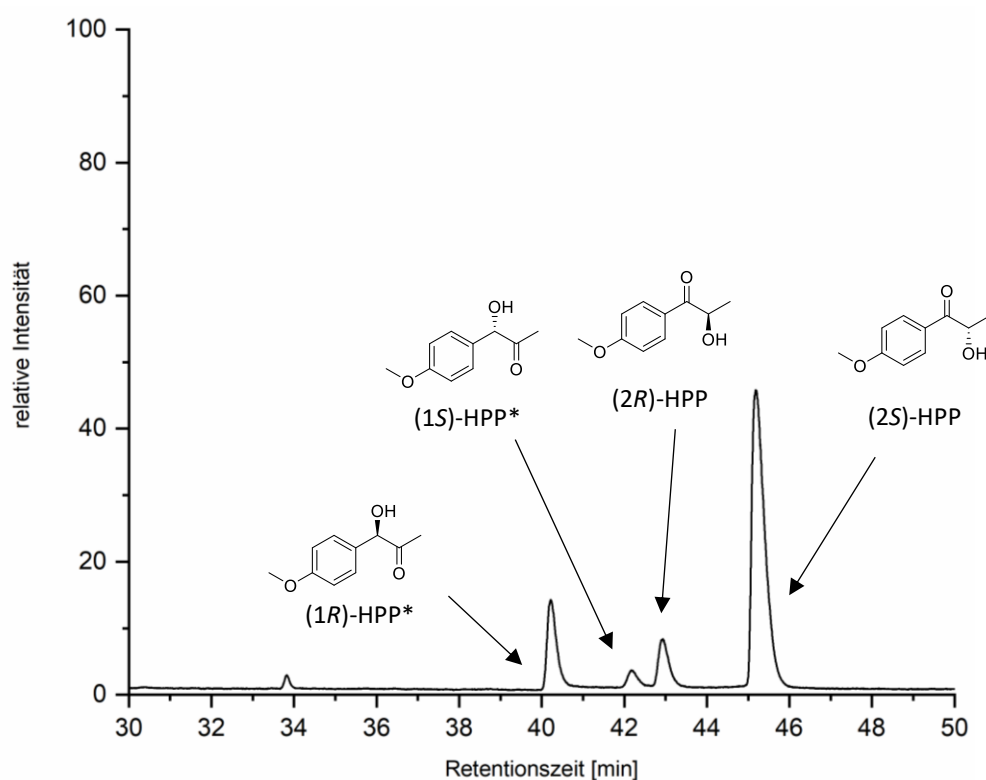
**Tabelle 65: Ergebnisse der Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie der Verbindung 48 (2-HPP)**

<sup>1</sup> H NMR (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	δ 1,44 [3 H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz, H-C(3)], 3,84 (1 H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz, -OH), 3,89 (3 H, <i>s</i> , - OMe), 5,11 [1 H, <i>q</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz, H-C(2)], 6,98 [1 H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,9 Hz, H-C(3')], 7,93 [1 H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0 Hz, H-C(2')]
<sup>13</sup> C NMR (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz)	δ 200,7 [C(1)], 164,2 [C(4')], 131,0 [2 C(2')], 126,1 [C(1')], 114,1 [2 C(3')], 68,9 [C(2)], 55,6 [C(OMe)], 22,7 [C(3)].

## Fortsetzung Tabelle 65

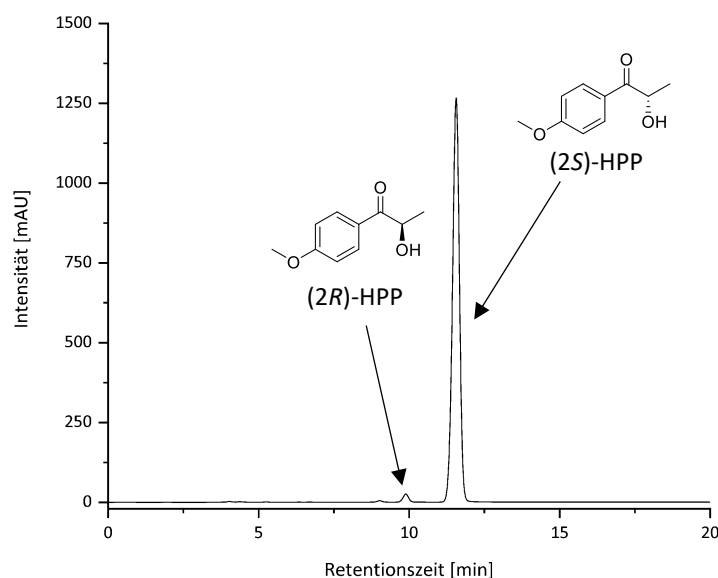
GC-MS (EI, 70 eV)	$m/z$ (%): 107 (6), 109 (4), 135 (100), 136 (11), 137 (19), 180 (3).
HRMS (ESI-TOF)	experimentell: 203,0673 Da; theoretisch: 203,0679 Da (-2,8 ppm Abweichung) $C_{10}H_{12}O_3Na^+$

Da es sich bei der aufgeklärten Struktur um ein chirales Molekül handelt, sollte das Enantiomerenverhältnis (er) bestimmt werden. Die Analyse mittels MDGC ergab ein Verhältnis von 89:11 (Abbildung 13). Die Zuordnung der Enantiomere des 1-HPP, welches Produkt einer Tautomerisierung sein kann, erfolgte anhand der Publikation von Honda *et al.* (1987).



**Abbildung 13:** Ausschnitt des MDGC-Chromatogramms von 2-HPP, isoliert aus CSSM<sub>1</sub> PSA Mk 37; \*vorläufig identifiziert

Vergleichend wurde auch die chirale Analyse mittels HPLC angewendet, welche in einem Enantiomerenverhältnis von 98,4:1,6 für die isolierte Substanz aus PSA resultierte (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Chromatogramm der chiralen HPLC-Analyse des 2-HPP-Isolats der Kultivierung CSSM<sub>1</sub> PSA Mk 37 (270 nm)**

2-HPP, welches parallel über die Bäckerhefe hergestellt wurde, wies bei letztgenannter Methode einen Enantiomerenverhältnis von 99,3:0,7 für das gleiche Enantiomer auf. Der bestimmte Drehwert von  $(-28,9 \pm 0,8)^\circ$  für die spezifische Rotation ließ nach Literaturabgleich die Schlussfolgerung auf das (S)-Enantiomer zu (Honda *et al.*, 1987).

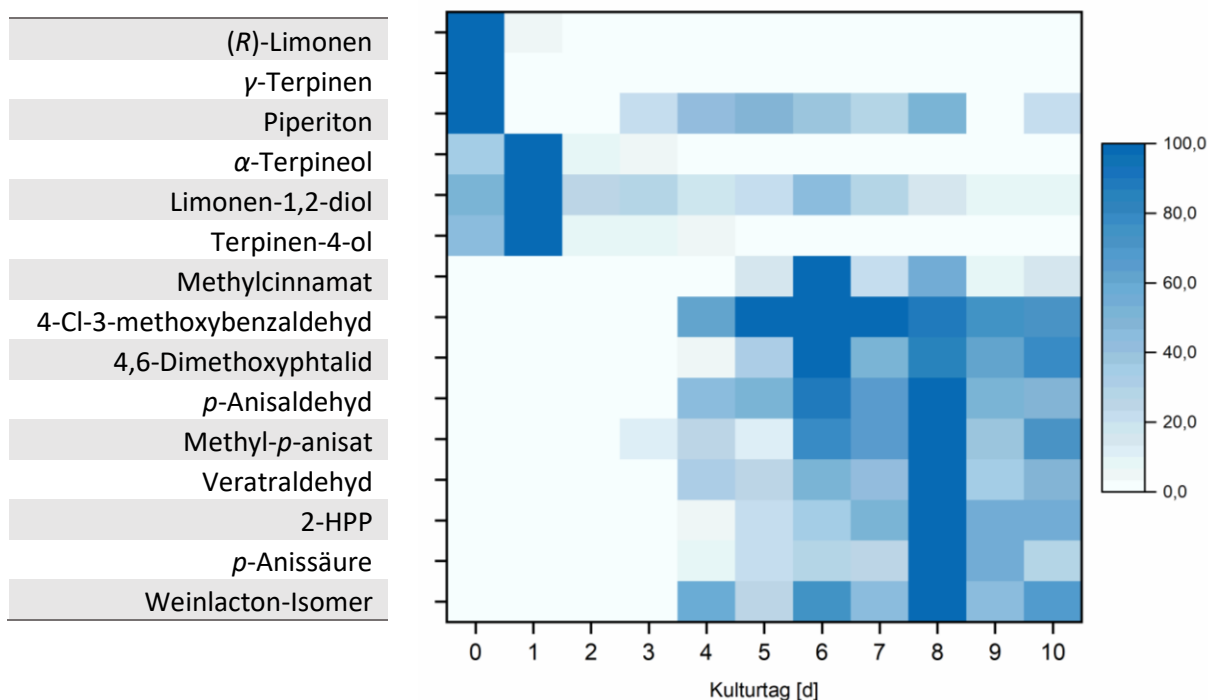
### 3.6 Geruchsschwelle von 2-HPP

Da es bisher nur wenige Studien zu den Geruchsqualitäten von Acyloinen gibt und eine Beschreibung des 2-HPP gar nicht erfolgte, wurden diese Daten hier erhoben. 2-HPP wurde durch das Panel als kokosnussartig, krautig und süßlich riechend beschrieben, wobei die Geruchsschwelle in Luft im Bereich von  $0,2 \text{ ng L}^{-1}$  bis  $2,4 \text{ ng L}^{-1}$  lag.

Bei Ausweitung des Panels zur allgemeinen Wahrnehmung dieser Verbindung war auffällig, dass ein Viertel der teilnehmenden den kokosartigen Geruch der Substanz kaum bis gar nicht wahrnehmen konnte.

### 3.7 Aromastoffe im Kulturverlauf

Anhand des Aromaprofils über einen Kulturzeitraum von 10 Tagen konnte gezeigt werden, wann Verbindungen ihr Maximum erreicht haben. Dafür wurden exemplarisch 15 Substanzen ausgewählt, die das Chromatogramm des Flüssigextraktes von PSA Mk 37 im CSSM prägten (Abbildung 15).



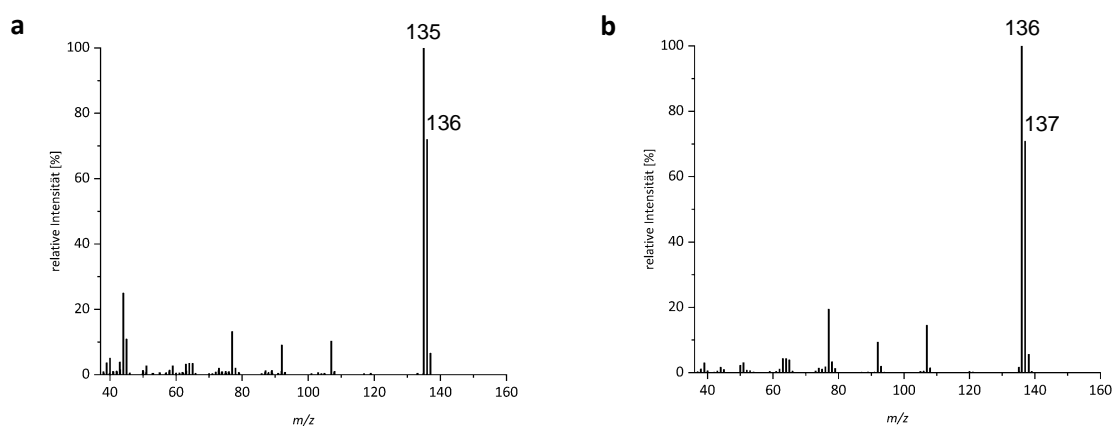
**Abbildung 15: Ausgewählte volatile Substanzen im Kulturverlauf des CSSM<sub>1</sub> PSA Mk 37 (LLE)**

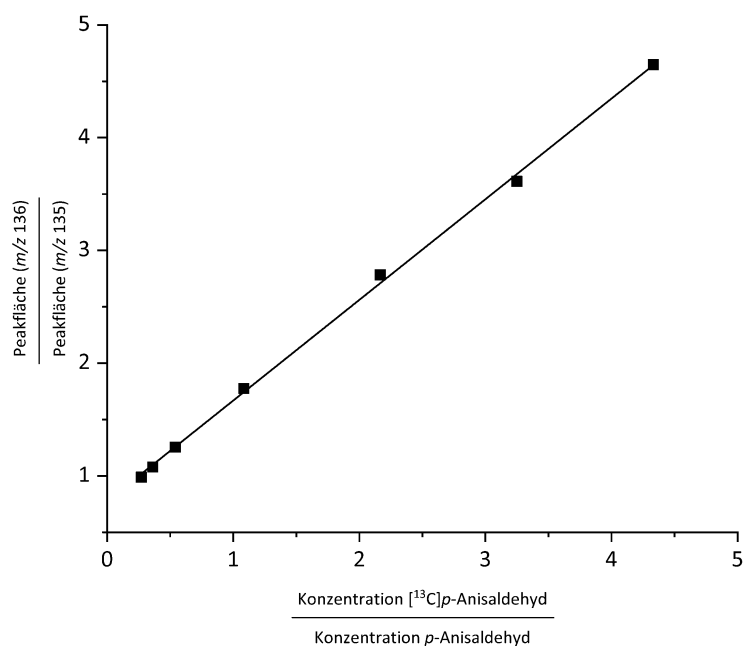
In den ersten Tagen spielten vor allem terpenoide Strukturen eine Rolle, die auf das eingesetzte Substrat zurückzuführen sind. Beginnend mit Tag 3 bzw. 4 nahmen die Peakflächen von aromatischen Substanzen zu. Die jeweiligen Maxima wurden zwischen den Kulturtagen 6 und 8 erreicht. Auch für das Weinlacton wurde die maximale Peakfläche am achten Kulturtag detektiert. 2-HPP zeigte an diesem Kulturtag den zweitintensivsten Peak im Chromatogramm nach *p*-Anisaldehyd.

### 3.8 Quantifizierung von *p*-Anisaldehyd durch Stabilisotopenverdünnungsanalyse

Aufgrund der Ergebnisse der AEVA wurde die Konzentration der Schlüsselaromaverbindung *p*-Anisaldehyd (**33**) in Kulturen von CSSM<sub>2</sub> PSA Mk 37 und CSSM<sub>3</sub> PSA Mk 37 an drei verschiedenen Kulturtagen (4, 6 und 8) bestimmt. Die Auswahl der Kulturtage erfolgte anhand der kinetischen Studie der Aromastoffe, die verdeutlichte, dass der Pilz große Peakflächen ab Tag 4 zeigte und diese ab Tag 8 wieder abnahmen (3.7).

Die Auswertung der SIVA erfolgte über den jeweiligen Basispeak, was in diesem Fall nicht dem Massenpeak entspricht, sondern [M-H<sup>+</sup>] bzw. [M<sup>\*</sup>-H<sup>+</sup>]. Für das nicht-substituierte *p*-Anisaldehyd bedeutet dies ein Masse/Ladungs-Verhältnis (*m/z*) von 135 und analog dazu *m/z* 136 mit einem Massenshift von +1 für die substituierte Verbindung (Abbildung 16).





**Abbildung 17: Kalibriergerade der Peakflächenverhältnisse definierter Mengen von [7-<sup>13</sup>C]-p-Anisaldehyd und p-Anisaldehyd in Abhängigkeit der entsprechenden Konzentrationsverhältnisse**

Daraus ergab sich die vollständige Geradengleichung

$$\frac{\text{Peakfläche (m/z 136)}}{\text{Peakfläche (m/z 135)}} = 0,8928 \frac{\text{Konzentration [}^{13}\text{C] p-Anisaldehyd}}{\text{Konzentration p-Anisaldehyd}} + 0,7754 \text{ mit } R^2 = 0,999.$$

Die sich ergebenden Konzentrationen des analysierten Benzaldehyd-Derivats umfassten in Abhängigkeit des Kulturtages und des eingesetzten Substrates einen Bereich von 9,2 mg L<sup>-1</sup> bis 160,3 mg L<sup>-1</sup> (Tabelle 66).

**Tabelle 66: Konzentration an p-Anisaldehyd in PSA Mk 37 Kulturen in Abhängigkeit des Substrats und des Kulturtages**

Substrat	Kulturtag 4	Kulturtag 6	Kulturtag 8
	Konzentration [mg L <sup>-1</sup> ]		
CSS <sub>2</sub>	9,2 ± 1,7	147,0 ± 31,8	160,3 ± 26,9
CSS <sub>3</sub>	73,2 ± 10,7	71,5 ± 8,0	71,4 ± 13,1

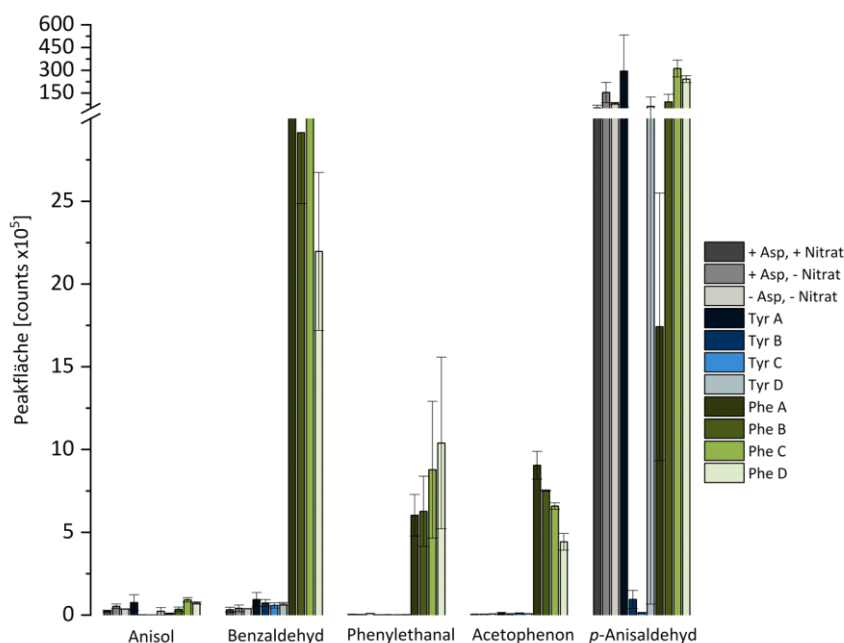
PSA Mk 37 hat in dem Medium CSSM<sub>2</sub> an Kulturtag 8 die höchsten Konzentrationen an p-Anisaldehyd gebildet. In dem Medium CSSM<sub>3</sub> war die Konzentration dieser arylischen Verbindung unter Berücksichtigung der Standardabweichung über den gewählten Kulturzeitraum nahezu konstant.

### 3.9 Induktion der Bildung von *p*-Anisaldehyd und 2-HPP

#### 3.9.1 Medienoptimierung für die Supplementation mit L-Phenylalanin & L-Tyrosin

Um die These, dass *p*-Anisaldehyd aus L-Phenylalanin und/oder L-Tyrosin gebildet wird, in Bezug auf PSA zu evaluieren, wurden Supplementierungsstudien mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser beiden Aminosäuren durchgeführt (2.9.1). Außerdem sollte der mögliche Einfluss von Natriumaspartat und Ammoniumnitrat auf das Aromaprofil des Pilzes untersucht werden.

Die sensorische Evaluierung der jeweiligen Kulturen führte zur Wahrnehmung eines süßlichen, Anisaldehyd-artigen Geruchs, insbesondere für die mit Tyrosin-supplementierten Kulturen unter anderem an Tag 7, woraufhin eine gaschromatographische Analyse erfolgte. In den resultierenden Chromatogrammen wurden vor allem Benzaldehyd-Derivate detektiert (Abbildung 18).

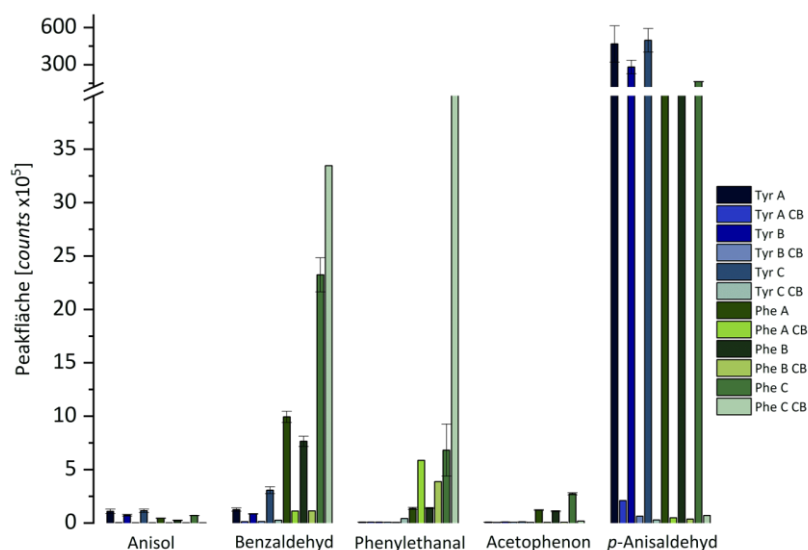


**Abbildung 18: Vergleich der Peakflächen an Hauptaromastoffen nach Supplementierung mit L-Tyrosin bzw. L-Phenylalanin zu Kulturen des PSA Dk (Kulturtag 7); L-Tyrosin-Konzentrationen: Tyr A 33 mM; Tyr B 17 mM + Asp; Tyr C 8 mM + Asp; Tyr D 4 mM + Asp; L-Phenylalanin-Konzentrationen: Phe A 39 mM; Phe B 23 mM + Asp; Phe C 11 mM + Asp; Phe D 8 mM + Asp**

Die Substanzen Benzaldehyd, Phenylethanal sowie Acetophenon wurden vorwiegend in den mit Phenylalanin supplementierten Kulturen detektiert. Dies spiegelte sich auch in den Geruchseindrücken wider, da bei diesen Proben deutliche blumige und rosenartige Noten wahrnehmbar waren. Bei den Fermentationen mit CSS-Medium wurden weder Phenylethanal noch Acetophenon identifiziert und Benzaldehyd mit vergleichsweise kleinen Peaks. Außerdem wurden diese Kulturen nicht mit dem Geruchsattribut „Rose“ belegt.

Beim Vergleich des Zusatzes von Natriumaspartat und Ammoniumnitrat wurde hinsichtlich der Intensität der fünf aufgeführten Aromastoffe kein deutlicher Unterschied festgestellt.

Aus den Analysen des Folgeexperiments zur Untersuchung des Einflusses von Hefeextrakt (jeweils Medium C) als alternative Stickstoffquelle zu Ammoniumnitrat (jeweils Medium A + B, verschiedene Konzentrationen an der jeweiligen Aminosäure) ging deutlich hervor, dass vordergründig Benzaldehyd und Phenylethanal weniger durch Biotransformation, sondern vielmehr auf chemischen Weg durch Zugabe von Phenylalanin gebildet wurden, insbesondere dann, wenn Hefeextrakt neben der Aminosäure als Stickstoffquelle diente (Abbildung 19).

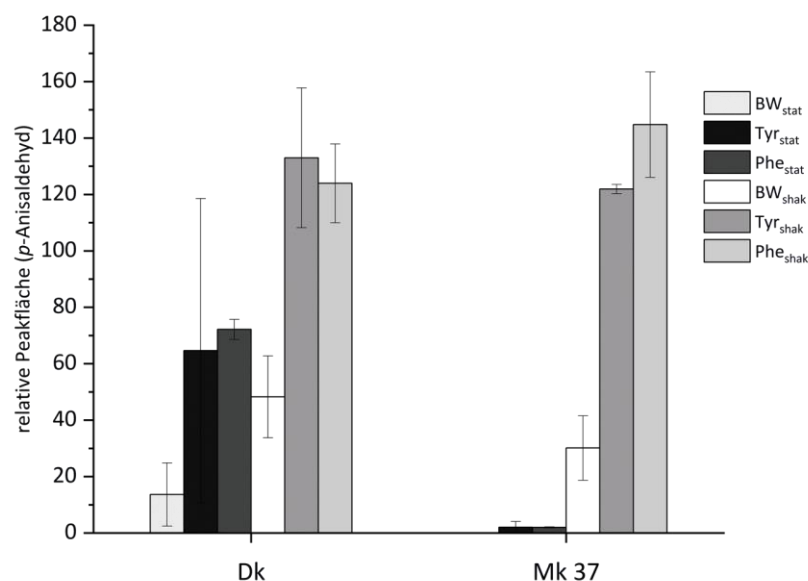


**Abbildung 19: Vergleich der Peakflächen an Hauptaromastoffen nach Supplementierung mit L-Tyrosin bzw. L-Phenylalanin zu Kulturen des PSA Mk 74 (Kulturtag 4); Tyr A: 14 mM Aspartat, 33 mM Tyr; Tyr B: 35 mM Aspartat, 33 mM Tyr; Tyr C: 0,3 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt, 33 mM Tyr; Phe A: 14 mM Aspartat, 11 mM Phe; Phe B: 35 mM Aspartat, 11 mM Phe; Phe C: 0,3 g L<sup>-1</sup> Hefeextrakt, 11 mM Phe; CB: chemischer Blindwert**

Acetophenon wurde durch PSA aus Phenylalanin gebildet und war bei den Supplementierungen mit L-Tyrosin kaum zu detektieren. Bei Letzteren waren dagegen die Intensitäten an p-Anisaldehyd etwas höher als unter Phenylalanin-Zusatz, wobei der Unterschied zwischen den Stickstoffquellen nicht deutlich ausfiel.

### 3.9.2 Vergleich von statischer Kultivierung gegen Schüttelkultivierung unter Zusatz von L-Phenylalanin & L-Tyrosin

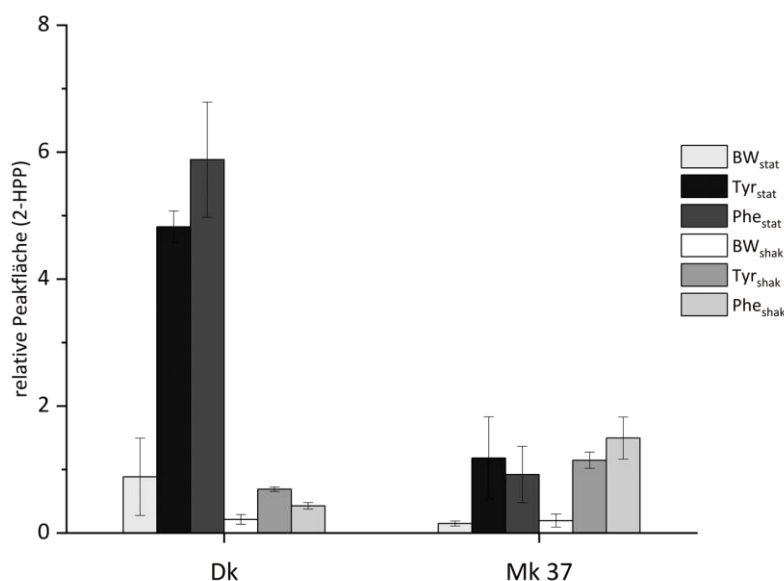
Da aus der Literatur bekannt war, dass eine statische Kultivierung die Bildung von Aromaverbindungen bei *P. ostreatus* stärker induziert als bei Schüttelkultivierung (Okamoto *et al.*, 2002), wurde dieser Parameter für die Umsetzung von L-Tyrosin (Tyr) und L-Phenylalanin (Phe) einander gegenübergestellt (2.9.2; Abbildung 20).



**Abbildung 20: Induktion der Bildung von p-Anisaldehyd durch PSA Dk und PSA Mk 37 unter Zusatz von L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) in statischer (stat) bzw. Schüttelkultivierung (shak)**

Die Bildung von *p*-Anisaldehyd durch PSA wurde für die gewählten Kultivierungszeitpunkte unter Schüttelinkubation deutlich stärker induziert als ohne. Dies wurde für die Supplementation beider Aminosäuren beobachtet, wobei die Schwankung der *p*-Anisaldehydkonzentration nach Supplementation mit Tyr im Dk unter statischen Bedingungen sehr groß war. Unter gleichen Bedingungen war *p*-Anisaldehyd, durch Mk 37 produziert, in vergleichsweise geringen Konzentrationen nachzuweisen. Im Zuge der Kultivierung fiel außerdem auf, dass bei der statischen Kultivierung des dikaryotischen Stammes ein Myzelteppich auf der Oberfläche der Kultur ausgebildet wurde, während bei Mk 37 keine Oberflächenkultur entstand.

Für die Bildung des 2-HPP, welches bei der Analyse ebenfalls detektiert wurde, ergab sich ein anderes Bild (Abbildung 21).



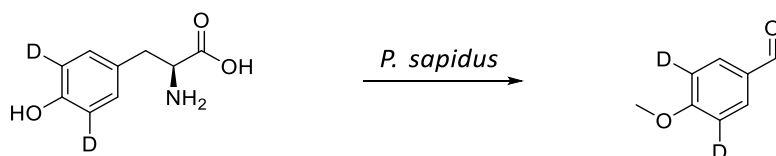
**Abbildung 21: Induktion der Bildung von 2-HPP durch PSA Dk und PSA Mk 37 unter Zusatz von L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) in statischer (stat) bzw. Schüttelkultivierung (shak)**

Das  $\alpha$ -Hydroxyketon wurde unter statischen Bedingungen stärker gebildet als unter Schüttelinkubation. Dies galt insbesondere für den Dk, während bei Mk 37 keine eindeutige Tendenz abzulesen war. Im Gegensatz zu den Kulturen aus der Schüttelinkubation war bei denen aus der statischen die Bildung von dem 2-HPP korrespondierenden Diketon sowie von 4-Chlor-3-methoxybenzaldehyd zu beobachten. Auch da bewirkte die Zugabe beider aromatischer Aminosäuren eine Konzentrationssteigerung, wobei der Effekt bei Tyr für das Diketon stärker war (Abbildung A 8).

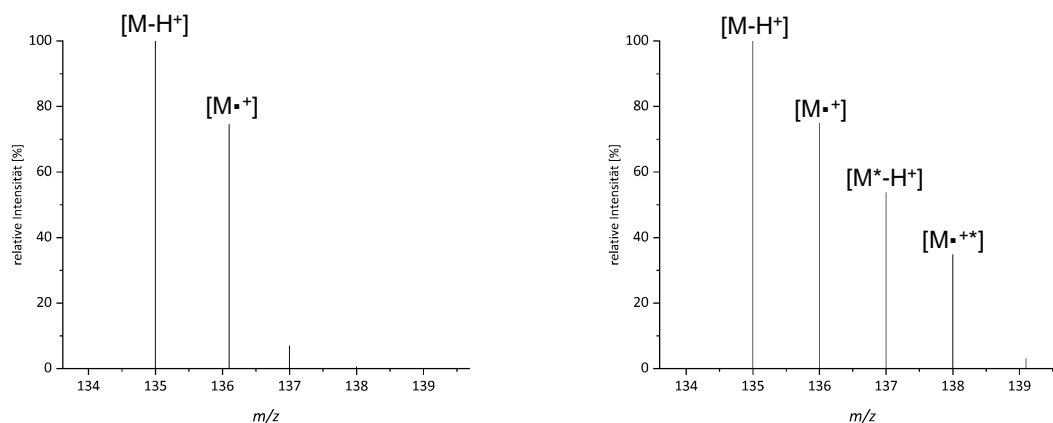
### 3.9.3 Stabilisotopensupplementierung von L- Tyrosin

Schlussfolgernd aus den Ergebnissen der Vorversuche zur Zugabe von L-Tyrosin, wurde die Konzentration an *p*-Anisaldehyd nach L-Tyrosinsupplementation in Kulturen von PSA Mk 37 mittels SIDA bestimmt (Tag 4, 6 und 8). Daraus ergaben sich Gehalte von  $(25,6 \pm 4,3) \text{ mg L}^{-1}$  an Tag 4, die bis zu Tag 8 auf  $(71,1 \pm 24,2) \text{ mg L}^{-1}$  anstieg, wobei an Tag 6 unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Gehalt auf dem gleichen Niveau lag.

Um die These der Biosynthese von *p*-Anisaldehyd aus L-Tyrosin zu stützen, wurde ein Supplementierungsexperiment mit deuteriertem Tyrosin durchgeführt. Wie erwartet, resultierte die Zugabe von L-2-Amino-3-([3,5- $^2\text{H}$ ]-4-hydroxyphenyl)-propansäure in einem Massenshift von +2 für Anisaldehyd ( $m/z$  138 für [3,5- $^2\text{H}$ ]-4-methoxybenzaldehyd) während der nicht-markierte Aldehyd ein Molekülion von  $m/z$  136 zeigte (Gleichung 2, Abbildung 22).

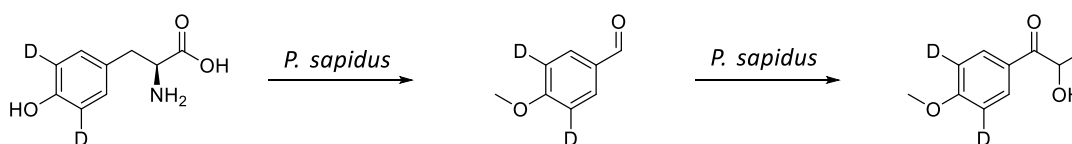


**Gleichung 2: Umsetzung von L-2-Amino-3-([3,5-<sup>2</sup>H]-4-hydroxyphenyl)-propansäure zu [3,5-<sup>2</sup>H]-4-methoxybenzaldehyd**

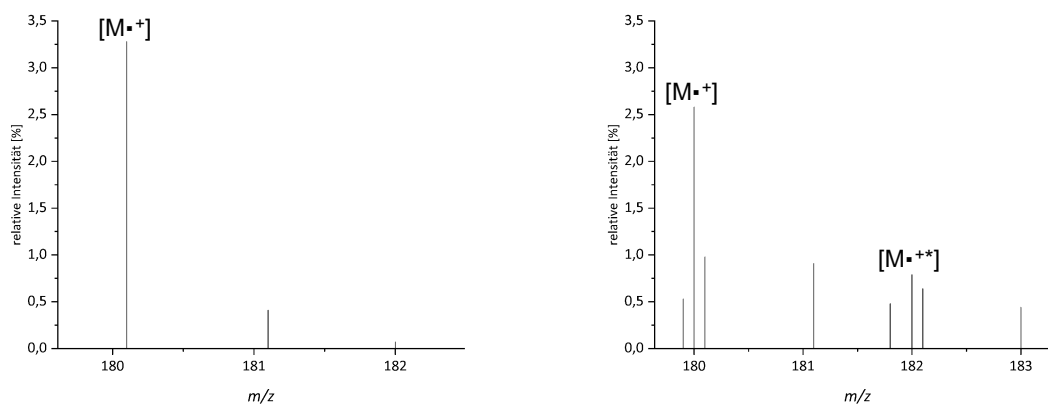


**Abbildung 22: Ausschnitt des Massenspektrums von p-Anisaldehyd (links) und [3,5-<sup>2</sup>H]-4-methoxybenzaldehyd (rechts) nach Umsetzung von L-2-Amino-3-([3,5-<sup>2</sup>H]-4-hydroxyphenyl)-propansäure mit PSA 69 Dk**

In dem Chromatogramm des Kulturextraktes wurde außerdem das substituierte 2-HPP nach der Zugabe des deuterierten Tyrosins identifiziert. Das gebildete nicht-markierte 2-HPP zeigte ein Molekülion von  $m/z$  180 mit einer relativen Intensität von 3% und bei  $m/z$  181 von <1%. Nach Supplementierung mit L-2-Amino-3-([3,5-<sup>2</sup>H]-4-hydroxyphenyl)-propansäure lag die relative Intensität von  $m/z$  180 bei 4%, von  $m/z$  181 bei 1%, von  $m/z$  182 bei 2% und von  $m/z$  183 bei <1% (Schema 1, Abbildung 23).



**Schema 1: Umsetzung von L-2-Amino-3-([3,5-<sup>2</sup>H]-4-hydroxyphenyl)-propansäure zu 2-Hydroxy-1-(4-methoxy-[3,5-<sup>2</sup>H]-phenyl)-1-propanon durch PSA**



**Abbildung 23: Ausschnitt des Massenspektrums von 2-HPP (links) und 2-Hydroxy-1-(4-methoxy-[3,5-2H]-phenyl)-1-propanon (rechts) nach Umsetzung von L-2-Amino-3-([3,5-<sup>2</sup>H]-4-hydroxyphenyl)-propansäure mit PSA 69 Dk**

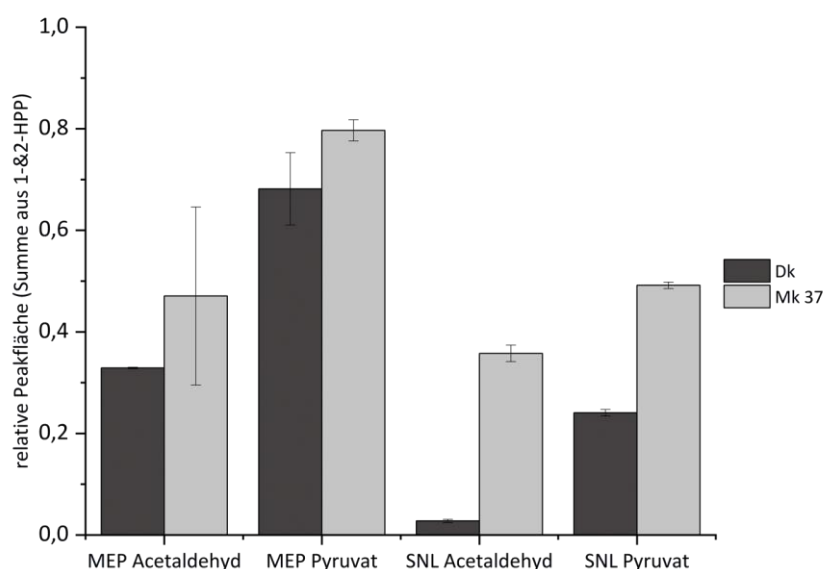
### 3.10 Biotransformationsstudien

Um mehr Informationen über die Biosynthese des 2-HPP zu erhalten, wurden Biotransformationsexperimente durchgeführt (2.10.2). Da zuvor gezeigt wurde, dass L-Tyrosin ein Präkursor von *p*-Anisaldehyd (**33**) und 2-HPP ist, wurde die Möglichkeit untersucht, dass der Aldehyd der direkte Vorläufer der letztgenannten Verbindung ist. Ein Enzym, welches die Reaktion von Aldehyden zu Acyloinen katalysiert, ist die PDC. Somit wurden **33** und Pyruvat als Substrate zu Lyophilisaten des PSA gegeben. Alternativ zu Pyruvat fungierte Acetaldehyd als C2-Donor.

Es ist bekannt, dass PDC die Bildung von 2-HPP und dessen korrespondierendem Tautomer 1-HPP katalysiert. Da bei den Untersuchungen mittels GC-MS, welche als Hauptanalysenmethode genutzt wurde, immer beide Verbindungen präsent waren, wurde die Summe beider Acyloine dargestellt.

#### 3.10.1 Umsetzungen in Abhängigkeit des Nährmediums

Zunächst wurde der Einfluss des verwendeten Nährmediums untersucht, indem Lyophilisat aus SNL-Kulturen mit dem aus MEP-Kulturen verglichen wurde. Außerdem wurde *p*-Anisaldehyd einerseits in Gegenwart von Natriumpyruvat und andererseits in Gegenwart von Acetaldehyd umgesetzt (Abbildung 24).



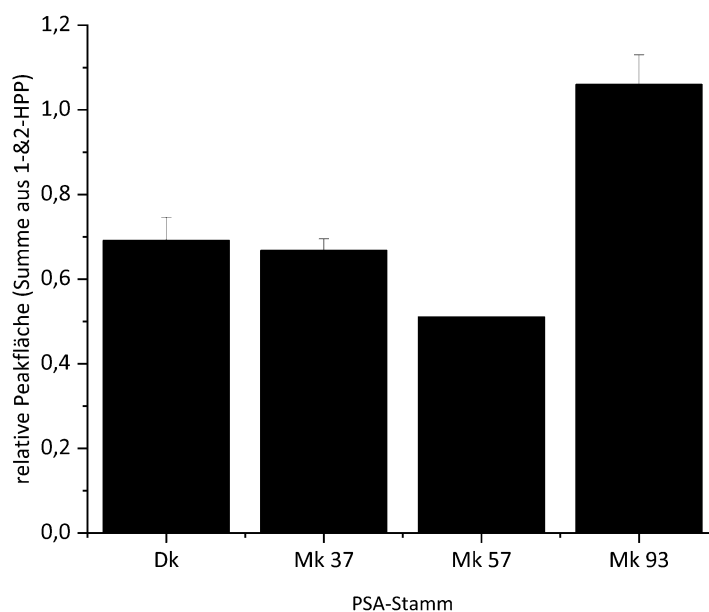
**Abbildung 24: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, *m*-Anisaldehyd) in Abhängigkeit des Nährmediums und des C2-Donors.**

Die Biotransformation mit Lyophilisat der MEP-Kulturen führte unabhängig vom eingesetzten Substrat zu größeren Peakflächen des Tautomerenspaars. Obwohl die eingesetzte Pyruvatkonzentration

geringer war, wurden bedeutend höhere Produktkonzentrationen detektiert. In allen Fällen zeigte Mk 37 die höheren Umsetzungen.

### 3.10.2 Umsetzungen mit verschiedenen Pilzstämmen

Um die Umsetzung von *p*-Anisaldehyd in Gegenwart von Natriumpyruvat verschiedener PSA-Stämme zu vergleichen, wurden beispielhaft Lyophilisate dreier Mk-Stämme und des entsprechenden parentalen Dk-Stammes eingesetzt (Tabelle 53, Abbildung 25).

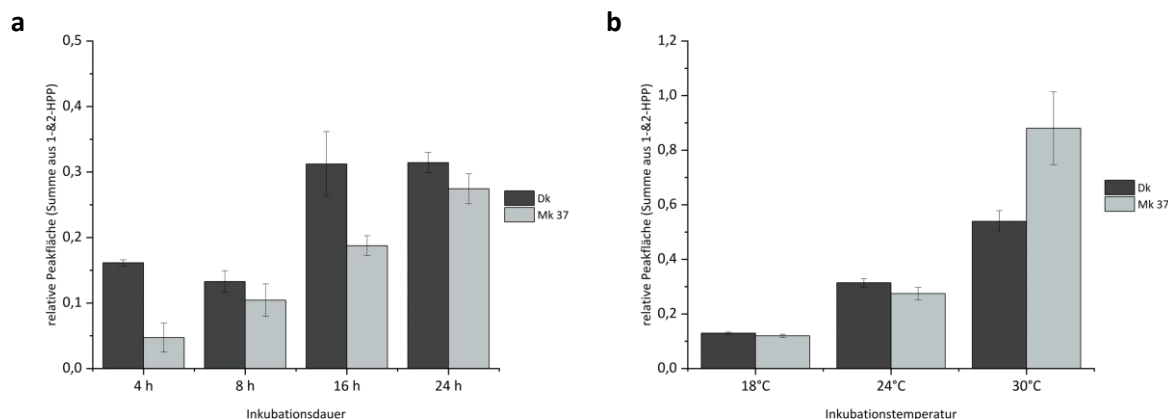


**Abbildung 25: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, *m*-Anisaldehyd) in Abhängigkeit des verwendeten PSA-Lyophilisates.**

Die beste Umsetzungsrate für die Bildung des Acyloins zeigte von den untersuchten Stämmen und den verwendeten Bedingungen Mk 93. Die Ausbeuten der Reaktion mit dem Dk-Lyophilisat und dem des Mk 37 waren sehr gut vergleichbar, wobei diese aus Mk 57 leicht abfielen.

### 3.10.3 Umsetzungen in Abhängigkeit von Inkubationsdauer & -temperatur

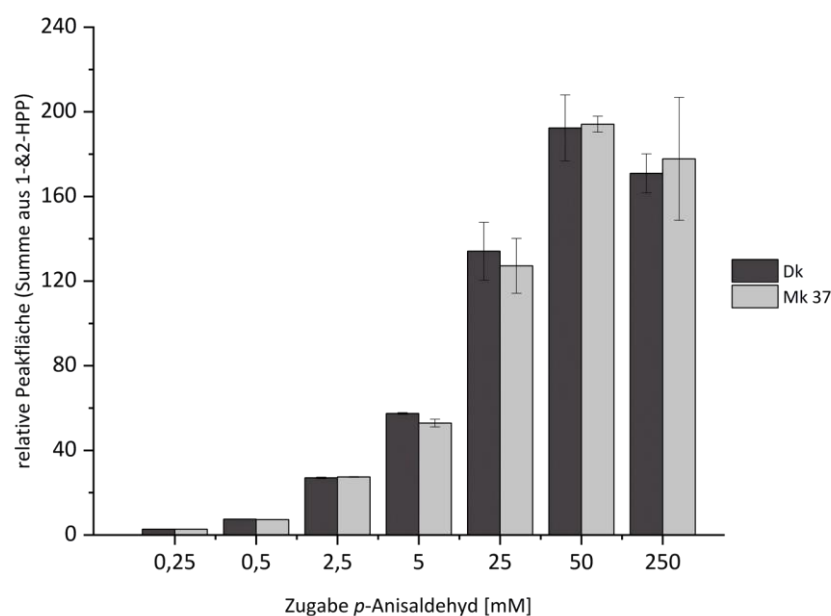
Bei den Untersuchungen zur Inkubationsdauer und -temperatur erwiesen sich 24 h und 30 °C als optimal (Tabelle 53; Abbildung 26).



**Abbildung 26: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, *m*-Anisaldehyd) in Abhängigkeit von Inkubationsdauer (a; 24 °C) und -temperatur (b; 24 h)**

### 3.10.4 Substratabhängigkeit

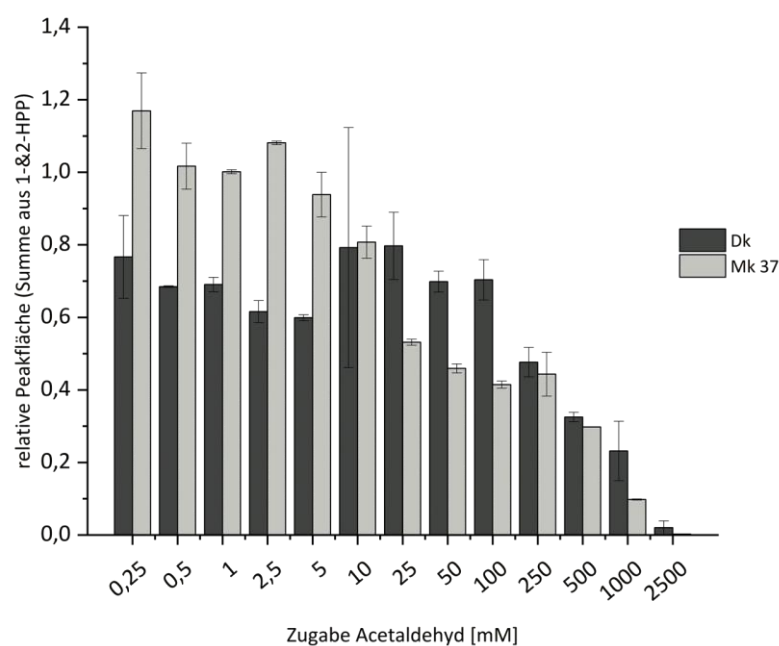
Unter der Annahme der Aktivität einer PDC, welche die Bildung von 2-HPP und dessen korrespondierendem Tautomer 1-HPP katalysiert, wurde die Summe beider Acyloine dargestellt, da auch bei den Chromatogrammen der Hauptanalysemethode, GC-MS, immer beide Verbindungen präsent waren. Zunächst wurde der Einfluss der Konzentration des aromatischen Akzeptors *p*-Anisaldehyd untersucht (Tabelle 53, Abbildung 27).



**Abbildung 27: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, *m*-Anisaldehyd) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an *p*-Anisaldehyd.**

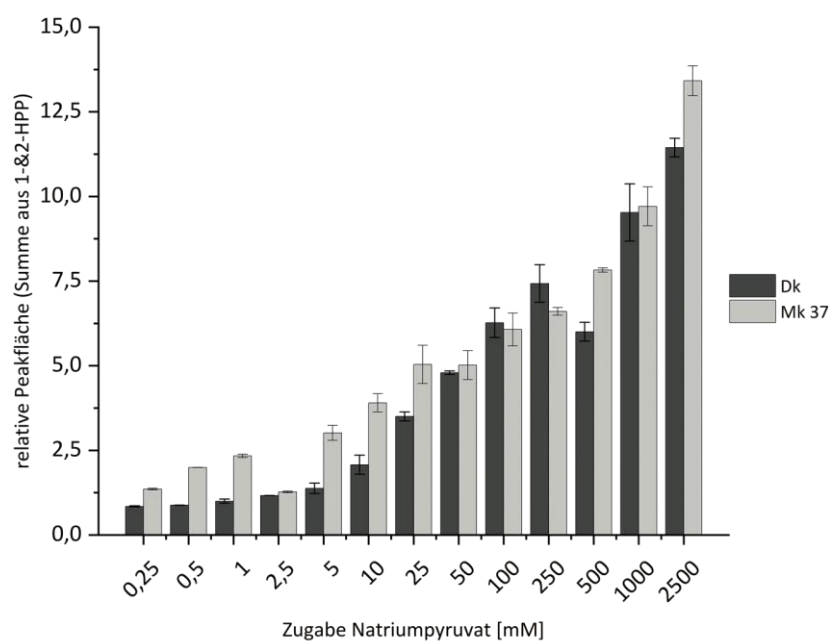
Bis zu einer Konzentration von 50 mM Anisaldehyd stieg die Summe der relativen Peakflächen in Gegenwart von Natriumpyruvat stetig an. Unter Zugabe von 250 mM des Aldehyds war kein weiterer Anstieg zu beobachten. Bei der Umsetzung des Pyruvats mit Lyophilisat ohne **33** (Blindwert), war im entsprechenden Chromatogramm kein Peak für die Acyloine erkennbar.

Für den Vergleich der C2-Donore wurde einerseits Acetaldehyd (Abbildung 28) und andererseits Natriumpyruvat (Abbildung 29) herangezogen.



**Abbildung 28: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Acetaldehyd.**

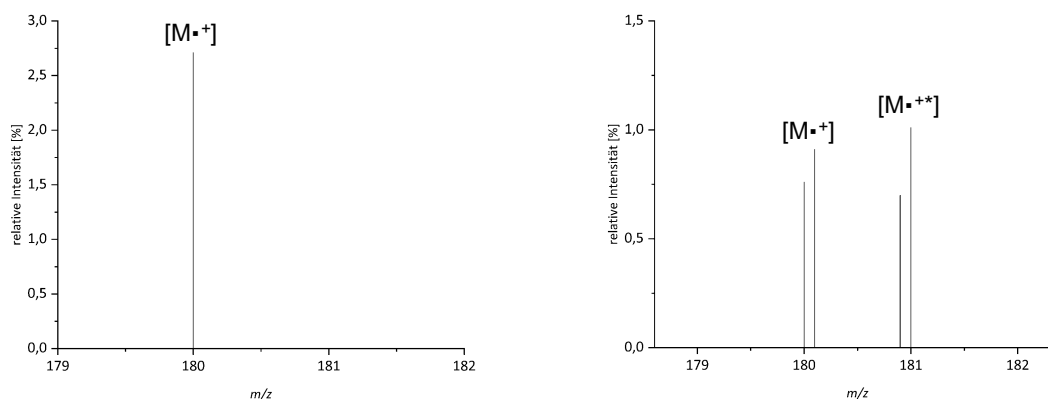
Bei Zugabe von Acetaldehyd zum Dk-Lyophilisat änderte sich der Acyloingehalt unter Berücksichtigung der Schwankungsbreiten bis zu einer Konzentration von 100 mM kaum. Oberhalb dieses Levels sanken dann die Peakflächen des Acyloins. Bei den Umsetzungen mit Mk-Lyophilisat wurde eine Abnahme der Zielprodukte bei einer Konzentration von 2,5 mM an Acetaldehyd beobachtet, wobei in den geringeren Konzentrationsbereichen höhere Gehalte als mit dem Dk-Lyophilisat erzielt wurden. Dieses Bild drehte sich allerdings ab einer Konzentration von 25 mM um, wobei das Niveau ab einer Zugabe von 250 mM in etwa gleichblieb.



**Abbildung 29: Relative Peakflächen (Summe aus 1-&2-HPP, bezogen auf den internen Standard, m-Anisaldehyd) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an Natriumpyruvat.**

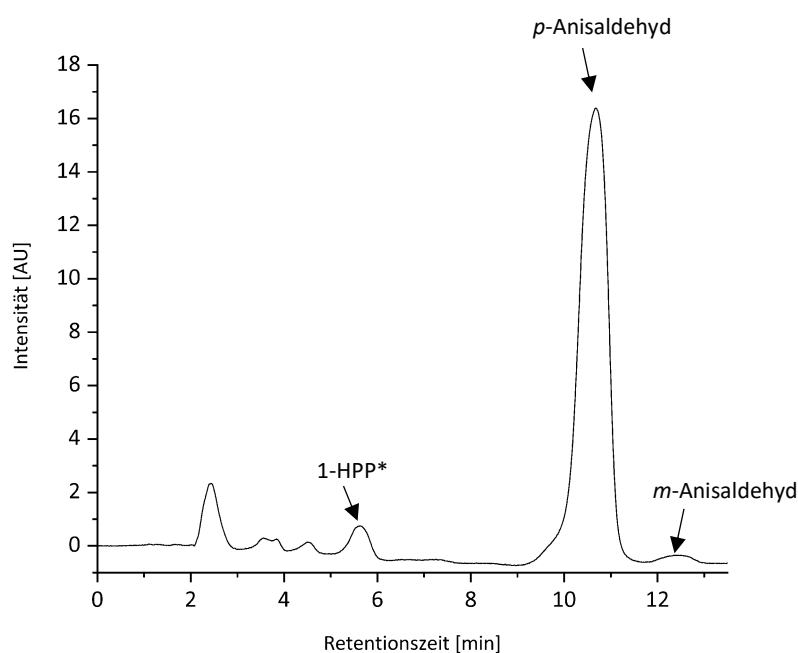
Beim Ersetzen des C2-Donors durch Natriumpyruvat wurden höhere Ausbeuten des Acyloinpaars bereits bei der niedrigsten Konzentration von 0,25 mM erhalten. Mit gesteigerten Konzentrationen an Natriumpyruvat stieg auch die relative Menge an Zielprodukt wobei in beiden Umsetzungsreihen jeweils ein Ausreißer auftrat, der bei dem Dk-Lyophilisat 500 mM lag und bei dem Mk-Lyophilisat bei 2,5 mM.

Um weitere Hinweise auf den C2-Donor zu erhalten, erfolgte die Umsetzung von *p*-Anisaldehyd mit [2-<sup>13</sup>C]-Natriumpyruvat. Daraus resultierte entsprechend die markierten 1- und 2-HPP (2.10.3, Abbildung 30).



**Abbildung 30: Ausschnitte aus den Massenspektren von 2-HPP (links) und markiertem 2-HPP nach Umsetzung von *p*-Anisaldehyd und  $^{13}\text{C}$ -Natriumpyruvat (rechts)**

Da es zu Tautomerisierungseffekten durch erhöhte Temperaturen bei der Analyse mittels GC kommen kann, erfolgte eine Analyse der Umsetzungen von Anisaldehyd in Gegenwart von Natriumpyruvat mittels HPLC-PDA (2.10.2, Abbildung 31).



**Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm (265 nm) der Umsetzung von *p*-Anisaldehyd in Gegenwart von 25 mM Natriumpyruvat durch PSA Mk 37 mit *m*-Anisaldehyd als internem Standard; \*vorläufig identifiziert**

Die Analyse über HPLC machte deutlich, dass PSA *p*-Anisaldehyd mit Natriumpyruvat tendenziell nicht zum 2-HPP umsetzt, sondern primär 1-HPP entsteht.

### 3.10.5 Biotransformation von 1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandion (Diketon)

#### 3.10.5.1 Synthese von 1-(4-methoxyphenyl)-1,[2-<sup>13</sup>C]-propandion

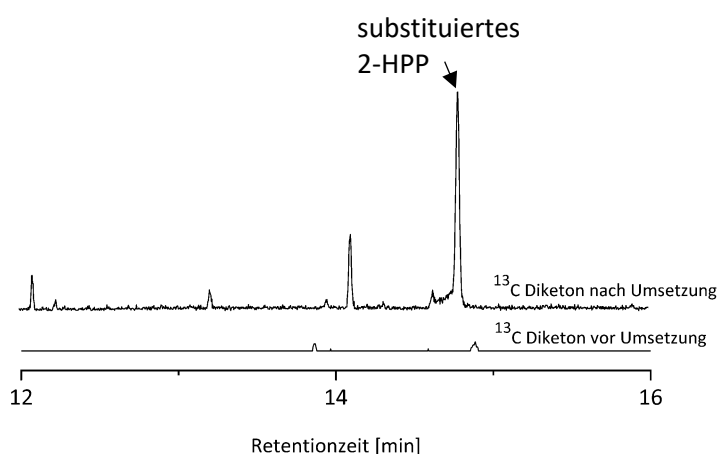
Die erfolgreiche Synthesekontrolle des 1-(4-methoxyphenyl)-1,[2-<sup>13</sup>C]-propandion (2.10.3) aus der Oxidation des Tautomerenpaares [<sup>13</sup>C]-1-HPP und [<sup>13</sup>C]-2-HPP erfolgte durch Abgleich des Massenspektrums auf polarer Säule mit dem der nicht-substituierten Verbindung (Tabelle 67).

**Tabelle 67: massenspektrometrische Daten auf polarer Säule des [<sup>13</sup>C]-Diketons im Vergleich zum nicht substituierten authentischen Standard**

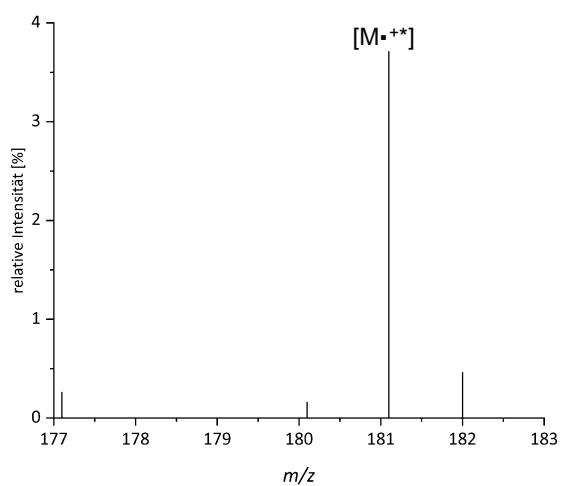
	<sup>13</sup> C-Diketon	Diketon
<b>Massenspektrum (70 eV, EI)</b>	<i>m/z</i> 63 (3%), 64 (4%), 77 (13%), 92 (10%), 107 (9%), 135 (100%), 136 (9%), 178 (< 1%), 179 (1%), 180 (<1%), 181 (< 1%)	<i>m/z</i> 63 (3%), 64 (4%), 77 (15%), 92 (10%), 107 (9%) 135 (100%), 136 (9%), 178 (1%), 179 (<1%)

#### 3.10.5.2 Reduktion des Diketons

Da in der Vergangenheit Arylketone bereits als Abbauprodukte von Lignin isoliert wurden, wurden diese in Studien bereits als Ligninmodellsubstanzen verwendet. Um diesen Ansatz für die hier dargestellte Studie anzuwenden, wurde das kommerziell erhältliche Diketon erfolgreich mit PSA Mk 37 zum 2-HPP reduziert, vergleichbar mit der Bäckerhefe-Umsetzung. Zur Bestätigung wurde daraufhin das synthetisierte substituierte Diketon für die Biotransformation eingesetzt (Abbildung 32). Wie erwartet, resultierte das substituierte 2-HPP mit dem Molekülion *m/z* 181 (Abbildung 33).



**Abbildung 32: Chromatogrammausschnitte zur Bildung des substituierten 2-HPP aus <sup>13</sup>C-Diketon vor (unten) und nach (oben) der Umsetzung mit PSA Mk 37**



**Abbildung 33: Ausschnitt des Massenspektrums des substituierten 2-HPPs nach Reduktion von  $^{13}\text{C}$ -Diketon durch PSA**

## 4 Diskussion

### 4.1 Screening von mono- und dikaryotischen Stämmen des PSA

Für die vorrangig submerse Kultivierung von Basidiomycota kommen in Laborstudien verschiedene Medien, wie Malzextrakt, Malzextrakt-Pepton oder Standardnährlösung zur Anwendung. Unter den genannten weist SNL die komplexeste Zusammensetzung auf, wobei jedoch aus vorausgegangen Publikationen deutlich wurde, dass PSA in diesem Medium sehr gutes Wachstumsverhalten zeigte (Fraatz *et al.*, 2014; Trapp *et al.*, 2019). Dabei wurde verschiedentlich der Glucose-Anteil durch eine Nebenstrom-Kohlenhydratquelle ersetzt (Bosse *et al.*, 2013; Trapp *et al.*, 2018; Ahlborn *et al.*, 2019). Bosse *et al.* (2013) testeten beispielsweise unterschiedliche Substrat-Pilz-Kombinationen hinsichtlich ihrer Geruchsprofile und setzten dabei Apfeltrester, Waffelbruch, Teigbruch, Kakaoschalen, Kakaopulver und Weintrester als einzige Kohlenhydratquelle ein.

Als Hauptnährstoffgrundlage für den Pilz dienten in den hier durchgeführten Arbeiten Nebenströme der *Citrus*-verarbeitenden Industrie (CSS). Da einer der relevantesten Parameter für das Wachstum der Zuckergehalt des Mediums ist, wurde der Gesamtkohlenhydratanteil (GKH) der jeweiligen Substrate bestimmt. Um einen für PSA notwendigen Glucosegehalt von  $15 \text{ g L}^{-1}$  zu erreichen (Fraatz *et al.*, 2014), wurden bis zu ca.  $72 \text{ g L}^{-1}$  (CSS<sub>4</sub>) des jeweiligen Nebenstroms zugesetzt. Allerdings wurde CSS<sub>4</sub> im Gegensatz zu den anderen drei Substraten ohne eine vorherige Trocknung eingesetzt, um die zeit- und kostenintensive Gefriertrocknung einzusparen. Der Gesamtkohlenhydratanteil, ausgedrückt als Glucose-Monohydrat, war mit ca.  $91 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  für CSS<sub>4</sub> vergleichbar zu den Nebenströmen CSS<sub>1</sub> und CSS<sub>3</sub>. Einzig CSS<sub>2</sub> wich mit  $37 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  deutlich von den anderen Werten ab, sodass im Medium knapp 4% diesen Nebenstroms eingesetzt werden mussten (3). Dieser vergleichsweise geringe GKH kann z. T. natürliche Ursachen haben aber auch mit der industriellen Verarbeitung der Früchte zusammenhängen. Neben den natürlichen klimatischen Bedingungen und Umwelteinflüssen spielt auch die Auswahl des Wurzelstocks und der Erntezeitpunkt eine wesentliche Rolle für die Qualität und Nährwerte der Früchte (Lado *et al.*, 2014; Lado *et al.*, 2018; Morales Alfaro *et al.*, 2021). Da über den Prozess der jeweiligen Nebenströme keine Hintergrundinformationen vorlagen, können nur Vermutungen zu den Gründen der Unterschiede angestellt werden. In der Regel werden neben dem Fruchtsaft auch die ätherischen Öle aus den Schalen der *Citrus*früchte gewonnen. Darüber hinaus dienen diese auch als Quelle für Pektin und *Citrus*fasern. Bei Letzterem handelt es sich um einen Ballaststoff, der in der Lebensmittelindustrie als Bindemittel und Texturgeber bspw. bei der Eis- und Wurstherstellung oder allgemein in vegetarischen/veganen Produkten eingesetzt wird (Dervisoglu & Yazici, 2006; Fernández-López *et al.*, 2007; Powell *et al.*, 2019; Noguerol *et al.*, 2021; Loffredi & Alamprese, 2023). Als Polysaccharid hat Pektin gelierende Eigenschaften und spielt eine bedeutende Rolle in der Herstellung von Konfitüren und Marmeladen. Je nach Studie und Extraktionsmethode

wurden Pektingehalte zwischen 13% und 31% für *Lemon Peel* und zwischen 17% und 25% für *Orange Peel* bestimmt (Marín *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2021). Demzufolge wurde nach der Entsaftung und Entölung möglicherweise auch Pektin und/oder *Citrusfasern* aus  $\text{CSS}_2$  gewonnen, was schlussfolgernd bei den anderen Nebenströmen wahrscheinlich nicht oder nur eingeschränkt der Fall war.

Um zu evaluieren inwiefern diese Nebenströme der *Citrus*-verarbeitenden Industrie als Substrate für mono- und dikaryotische Stämme von PSA zur Produktion eines interessanten Geruchsprofils geeignet sind, wurde als einfache, schnelle und effektive Screeningmethode die vergleichende Oberflächenkultivierung gewählt.

Die in erster Linie gebildete Grundnoten Anis und Marzipan wurden als PSA-typisch bezeichnet, da Versuche submerser SNL-Kulturen ähnliche Töne aufwiesen und auch bei Trapp *et al.* (2018) in einer Isomaltulose-Melasse-Kultur der potenteste Aromastoff als *p*-Anisaldehyd identifiziert und mit den Deskriptoren Anis und Bittermandel beschrieben wurde. In Studien zur Aromabildung verschiedener Nebenstrom-Basidiomycet-Kombinationen wurde PSA bei Kultivierung mit Trester vom Gewürztraminer als grün, frisch und frisch geschnittene Kiwi beschrieben sowie in der Kultivierung mit Apfeltrester mit Attributen von Popcorn, röstig und leicht Apfel belegt (Bosse *et al.*, 2013). Dies zeigt deutlich die Abhängigkeit der Aromastoffbildung vom jeweiligen Medium und damit verbunden den im Medium enthaltenen Präkursoren. Je nach Enzymsystem des jeweiligen Pilzes und den resultierenden Biotransformationen erfolgt so die unterschiedlichste Ausbildung der Aromaprofile.

Da bei den meisten Kulturen der hier getesteten PSA-Stämme die anisartige Basisnote wahrnehmbar war, galt es Nuancen herauszuarbeiten. Diese äußerte sich zum einen in der Intensität und in der Kultivierungsdauer über die das Aroma abgegeben wurde. Bei einigen Monokaryoten wurden Attribute wie muffig und käsig wahrgenommen und andere Stämme wurden als waldmeisterartig, cumarinartig, krautig und süßlich beschrieben (3.3.1).

Bei Betrachtung der Enzymaktivitäten über das Spektrum der Monokaryoten hinweg ist von unterschiedlichen Aktivitäten auszugehen, wie vergangene Studien anhand einer DyP-Typ Peroxidase gezeigt haben (Krahe *et al.*, 2021). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe um Rühl, welche Laccaseaktivitäten verschiedener Monokaryoten von *Coprinopsis cinerea* untersuchte. Die optimalen Kultivierungsbedingungen für eine möglichst hohe Aktivität des Enzyms variierten dabei zwischen den Pilzstämmen (Rühl *et al.*, 2013). Übertragen bedeutet dies das Auftreten von Divergenzen der volatilen Verbindungen, was sich im Aromaprofil widerspiegelt, sodass neben der interspezifischen Variabilität hier auch eine intraspezifische Variabilität zum Tragen kommt.

Um dieses Präscreening mittels instrumenteller Methoden abzubilden und relevante Aromastoffe zu identifizieren, wäre eine Schrägagarkultivierung im HS-Vial möglich gewesen. Die entsprechende GC-

Analyse hätte dann mindestens alle 2 Tage erfolgen müssen, was bei einer Regelkultivierungsdauer von 8 Tagen und 62 PSA-Stämmen einen sehr geräteintensiven Aufwand bedeutet hätte. Zudem war ein Ziel des Projektes, den Fermentationsprozess bis zum Pilotmaßstab zu vergrößern, wobei Submerskulturen einfacher im *handling* sind. Somit wurde das Kultivierungssystem im nächsten Schritt von Agarplatten auf Schüttelkolben übertragen. Dabei wurde zunächst auf Standardnährmedium zurückgegriffen, um die Vergleichbarkeit der Stämme zu gewährleisten, da nur eine begrenzte Menge des CSS einer Charge zur Verfügung stand.

Es zeigte sich in den jeweiligen GC-MS-Chromatogrammen, dass die fünf ausgewählten Aromastoffe (2 Dillether, 3,9-Epoxy-*p*-mentha-1,8(10)-dien, *p*-Anisaldehyd und (*E*)-Nerolidol) repräsentativ für alle PSA-Stämme in SNL-Medium waren (Abbildung 5). Trapp *et al.* (2019) untersuchten die Bildung der Dillether in PSA und nutzten dafür unterschiedliche Medien. In allen Medien wurden die Stereoisomerenpaare 3*S*/*R*,6-Dimethyl-2,3*S*/*R*,3*aS*/*R*,4,5,7*aR*/*S*-hexahydrobenzofuran (Dillether 1) und 3*R*/*S*,6-Dimethyl-2,3*R*/*S*,3*aS*/*R*,4,5,7*aR*/*S*-hexahydrobenzofuran (Dillether 2) gefunden, wobei sie, in YPDA und MEP die intensivsten Verbindungen waren. Experimente mit <sup>13</sup>C-Glucose zeigten die *de novo* Synthese dieser Verbindungen, wobei Limonen und *p*-Menth-1-en-9-ol als Intermediate im Biosyntheseweg postuliert wurden (Trapp *et al.*, 2019).

Innerhalb der hier untersuchten Monokaryoten variierte die Präsenz der bicyclischen Monoterpenoide. Zum Teil machten diese den Hauptanteil der aromaaktiven Substanzen aus, während oftmals parallel in diesen Kulturen Limonen nachgewiesen wurde (3.3.2). Der Metabolit *p*-Menth-1-en-9-ol wurde nicht detektiert, wobei auch Trapp *et al.* (2019) diesen nur in YPDA-Kulturen fanden. Sowohl die Dillether als auch *p*-Menth-1-en-9-ol wurden ebenfalls in Kulturen des Basidiomyceten *Cystostereum murrayi* (CMU) identifiziert und Brescia *et al.* (2021) vermuteten bei beiden Pilzen den gleichen Biosyntheseweg.

Eine Substanz, welche in der Vergangenheit ebenfalls sowohl bei PSA als auch bei CMU detektiert wurde und strukturelle Ähnlichkeit zu den vorher betrachteten Verbindungen aufweist, ist 3,9-Epoxy-*p*-mentha-1,8(10)-dien (EMD) (Trapp *et al.*, 2018; Brescia *et al.*, 2021). In der Natur kommt dieser *p*-Menthether beispielsweise in Pontianak Orangen (*Citrus nobilis* Lour. var. *microcarpa* Hassk.) und Mosambi (*Citrus sinensis* Osbeck) vor (Dharmawan *et al.*, 2007) und wurde ebenfalls in ätherischen Ölen verschiedener Porst-Arten (*Ledum palustre* L., *Ledum groenlandicum*) gefunden (Belousova *et al.*, 1991; Collin, 2015). Geruchlich wird die Substanz von Wardencki *et al.* (2009) als fruchtig, krautig und nach Dill riechend, von Trapp *et al.* (2018) als Anis- und Estragon-ähnlich und von Brescia *et al.* (2021) als blumig eingeordnet.

*p*-Anisaldehyd wurde in PSA-Isomaltulose-Melasse-Kulturen als Hauptaromastoff beschrieben (Trapp *et al.*, 2018). Gutiérrez *et al.* (1994) zeigte die Bildung dieser Verbindung durch sechs verschiedene

Spezies der Gattung *Pleurotus*, namentlich *P. pulmonarius* (Lungenseitling), *P. ostreatus* (Austernseitling), *P. eryngii* (Brauner Kräuterseitling), *P. sajor-caju* (grauer Austernseitling), *P. cornucopiae* (Rillstieliger Seitling) und *P. floridanus*, wobei bei den beiden letztgenannten *p*-Anisaldehyd nur in Kulturen aus Lignin- und/oder strohbasiertem Medium nachgewiesen wurde, nicht in denen auf Glucosemedium. Dies zeigt die starke Präsenz des marzipanartig riechenden Aromastoffs innerhalb dieser Gattung. Allerdings bildeten während des hier durchgeführten Screenings einige Stämmen diese Substanz gar nicht oder nur in geringen Mengen. Während der sensorischen Charakterisierung dreier Basidiomycota fanden Berger *et al.* (1986) dieses Benzaldehyd-Derivat in *Bjerkandera adusta* (*B. adusta*), welcher selbst oder der Stamm *Bjerkandera* sp. BOS55 daraufhin häufig Gegenstand von Studien zur *de novo* Synthese und Biotransformation von Verbindungen mit aromatischem Grundgerüst war (de Jong *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1994b). Vermutet wird die biosynthetische Bildung als Folgeprodukt des Shikimatsäureweges (Mester *et al.*, 1997; Silk *et al.*, 2001), vergleichbar zur Synthese in pflanzlichen Produkten (Guyot *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 2016). (*E*)-Nerolidol wurde bereits in Basidiomycota, wie *Polyporus* sp. (Abraham & Berger, 1994), *Piptoporus betulinus*, *Fomitopsis pinicola*, *Gloeophyllum odoratum*, *Trametes suaveolens* (Rösecke *et al.*, 2000) und auch in den *Pleurotus* spezies *P. eryngii* var. *tuoliensis*, *P. cystidiosus* (Usami *et al.*, 2014a), *P. sajor-caju* (Usami *et al.*, 2014b), *P. citrinopileatus* (Miyazawa *et al.*, 2011), *P. ostreatus* und *P. abalonus* (Usami *et al.*, 2015) detektiert. In der von Trapp *et al.* (2018) durchgeführten Studie mit PSA wurde die je nach Stereoisomer als angenehm, holzig, warm, muffig ((-)-(*E*)-Nerolidol) bzw. leicht süßlich, mild, weich und blumig ((+)-(*E*)-Nerolidol) beschriebene Substanz nicht nachgewiesen (Schubert *et al.*, 1992).

Der acyclische Sesquiterpenalkohol wird ausgehend von Farnesylpyrophosphat produziert. Das Schlüsselenzym dabei ist eine Nerolidolsynthase, welche in dem Genom von PSA in einer noch nicht veröffentlichten Studie von Orban *et al.* identifiziert wurde. Im Gegensatz zu einer aus *Agrocybe aegerita* (*Cyclocybe aegerita*) beschriebenen Nerolidolsynthase mit der Doppelfunktion einer Linaloolsynthase (Zhang *et al.*, 2021), wurde durch das PSA-Enzym kein Linalool gebildet (Orban *et al.*, noch nicht veröffentlicht). Durch den Pilz wurden in der dikaryotischen Kultur bis zu  $(115,0 \pm 3,0) \mu\text{g L}^{-1}$  (Tag 7) und in der monokaryotischen Kultur des Stammes Mk 37 bis zu  $(57,8 \pm 3,9) \mu\text{g L}^{-1}$  (Tag 6) gebildet. Die entsprechende putative Nerolidolsynthase wurde in *Coprinopsis cinerea* transformiert, wobei durch die Transformanten ähnliche Gehalte an Nerolidol erzielt wurden ( $48 \mu\text{g L}^{-1}$ , Tag 8) (Orban *et al.*).

Vergleichende Aromastudien innerhalb von Monokaryoten eines Basidiomycets gibt es in der Literatur bisher nur sehr wenige. Orban *et al.* (2020) haben bei Untersuchungen des Volatiloms von Monokaryoten von *Cyclocybe aegerita* beobachtet, dass sich das Profil je nach Entwicklungsstadium, in dem der Pilz sich befindet, stark unterscheidet. Beispielsweise wurde das Vorkommen der

Sesquiterpene eher mit dem Myzelstadium als mit der Fruchtkörperbildung in Verbindung gebracht. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente beschränkten sich nur auf das Myzelstadium und es wurde für das Screening nur eine Stichprobe ab Beginn der Aromabildung (Tag 3 bzw. 4) untersucht. Die Experimente zur Biosynthese von Nerolidol in PSA zeigen jedoch auch Unterschiede in diesem Stadium. Während der dikaryotische Stamm das Konzentrationsmaximum an Tag 7 erreichte, fiel der Gehalt des Sesquiterpenalkohols in der Kultur des Mk 37 bereits ab diesem Tag wieder (Orban *et al.*). Nichtsdestotrotz wurde anhand des in dieser Arbeit aufgenommenen volatilen Profils zwischen Tag 3 und Tag 7 verschiedener SNL-Mk-Kulturen deutlich (Tabelle A 2, Tabelle A 3), dass dieses für die ausgewählten Aromastoffe weitgehend stabil bleibt und sich anhand dessen ablesen lässt, ob eine solche Kultur tendenziell geruchlich eher den Attributen „Anis“ und „Bittermandel“ zuzuordnen ist oder eher in die krautige Aromen der Dillether geht. Dies deutet auf eine stabile intraspezifische Variabilität der Enzymproduktion innerhalb der Monokaryoten hin, was durch systematische Untersuchungen über Subkultivierungszyklen anhand der Carotinabbauaktivität durch *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Linke *et al.*, 2019) und anhand der *trans*-Anetholspaltung durch PSA (Krahe *et al.*, 2021) bestätigt wird.

Beim Wechsel des Mediums auf CSS als Hauptkohlenstoffquelle änderte sich das Aromaprofil. In nahezu allen untersuchten Vertretern der ersten Generation wurde *p*-Anisaldehyd als Hauptaromastoff detektiert, wobei die anderen volatilen Substanzen deutlich in den Hintergrund traten (Abbildung 7). Ausnahme bildete dabei jedoch Mk 100, bei welchem die Dillether einen höheren Peakflächenanteil bezogen auf die Summe der fünf ausgewählten aromaaktiven Substanzen zeigten. Auch die Pilzstämme der zweiten Generation zeigten ein diverseres Bild (3.3.3).

(*R*)-Limonen kommt als Majorkomponente in verschiedenen *Citrus*ölen und folglich auch in den Nebenprodukten der Produktion dieser Öle und der Säfte vor (Erasto & Viljoen, 2008; John *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2019; El-Gengaihi *et al.*, 2020). Daneben wurde es auch als Pilzmetabolit in PSA beschrieben. Anhand der Untersuchungen von Trapp *et al.* ist der Seitling in der Lage, das (*R*)-Enantiomer parallel zur *de novo* Synthese der Dillether zu biokonvertieren (Trapp *et al.*, 2019). An dieser Stelle hätten eigene Untersuchungen der Enantiomerenverhältnisse der detektierten Dillether weitere Rückschlüsse über bevorzugt ablaufende Synthesewege zugelassen.

Genau wie die Bildung von *p*-Anisaldehyd eng mit dem ligninolytischen System des Weißfäulepilzes verbunden ist, spielt dieses Enzymsystem mit großer Wahrscheinlichkeit auch bei der Biosynthese von 4-Chlor-3-methoxybenzaldehyd eine bedeutende Rolle. Chlorierte Anisylderivate und deren Bildung wurden vor allem anhand von *Bjerkandera* ssp. untersucht, wobei diese auch in anderen Basidiomycota Gattungen, wie *Lepista*, *Oudemansiella*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Stropharia*, *Trametes*, *Mycena*, *Peniophora*, *Phellinus*, *Phylloporia* und *Hypholoma* vorkommen (de Jong *et al.*, 1992; Field *et al.*, 1995; Swarts *et al.*, 1996; Swarts *et al.*, 1997; Swarts *et al.*, 1998; Hjelm *et al.*, 1999; Silk *et al.*, 2001)

Postemsky *et al.* (2019) nutzte für seine Studien z. T. die gleichen PSA-Pilzstämmen, wie die, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Autoren untersuchten in einem Screening der aus Dk 3174 erhaltenen Mks die enzymatischen Profile (Laccase, Peroxidase und VP) in einem Kartoffel-Dextrose-Agar + *Remazol Brilliant Blue R* Test. Dabei war auffällig, dass die meisten Stämme hohe Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten zeigten, M16 (=Mk 216) und P15 (=Mk 115) jedoch zu den wenigen Stämmen zählten, die hauptsächlich Laccase produzierten.

Im weiteren Verlauf der Studie zeigte Mk 216 mit Ausnahme der Peroxidase-Aktivität auf Sonnenblumennebenstrom keine hohen Enzymaktivitäten (Laccase/Peroxidase) auf den verwendeten Medien. Auch mit Mk 115 wurden nur vergleichsweise geringe Enzymaktivitäten auf Reis- und Sonnenblumennebenströmen erzielt (Postemsky *et al.*, 2019).

Beim Vergleich der beiden Aromaprofile im CSS-Medium ergab sich ein unterschiedliches Bild. Während Mk 216 ähnlich wie die Stämme der ersten Generation insbesondere Anisaldehyd produzierte, war dies für Mk 115 nicht der Fall, sodass von den ausgewählten Verbindungen Dillether 2 den größten Peakflächenanteil hatte. Dies verdeutlicht die starke Abhängigkeit der Enzymaktivität von dem verwendeten Medium, was aus der Studie von Postemsky ebenfalls hervorgeht (Postemsky *et al.*, 2019). Anhand von monokaryotischen Stämmen des Pilzes *Pycnoporus cinnabarinus* wurde gezeigt, dass aromatische Verbindungen wie Ferulasäure die Laccaseproduktion induzieren können. Es gab darunter jedoch auch Stämme, die durch die Zugabe von Ferulasäure keine gesteigerte Laccaseaktivität zeigten (Herpoël *et al.*, 2000). Ähnliche Beobachtungen wurden bei Untersuchungen zur Manganperoxidaseaktivität in mono- und dikaryotischen Stämmen von *Trametes versicolor* gemacht, wo die Zugabe von Holzstoff bei einem Stamm die Aktivität stark erhöhte und bei anderen Stämmen ein deutlich geringerer Effekt erzielt wurde (Addleman & Archibald, 1993). Die jeweiligen Autorengruppen führten dies auf das Vorhandensein von Isoformen der Enzyme zurück (Addleman & Archibald, 1993; Herpoël *et al.*, 2000). Um jedoch vergleichbare Aussagen für das hier verwendete Fermentationssystem treffen zu können, wären weitere Untersuchungen vor allem auf enzymatischer Ebene notwendig.

Nach dem breit angelegten Screening einerseits der Oberflächenkulturen und andererseits der submersen Kulturen (SNL und CSSM) wurden vier monokaryotische Stämme und der parentale dikaryotische Stamm für die sensorische Beurteilung der Flüssigkulturen ausgewählt. Die Pilze stammten entweder aus Kategorie 2 oder 4 der Einteilung nach dem Oberflächenscreening (Tabelle 63). Damit galten sie als „PSA-typisch, jedoch schwach und z. T. mit Fehlnoten“ (Dk, Mk 93) oder „waldmeisterartig, Cumarin, krautig und z. T. süßlich“ (Mk 37, Mk 74 und Mk 124). Der Dikaryot wurde vor allem als Vergleich für die Monokaryoten herangezogen, während Mk 93 im submersen SNL-Screening vergleichsweise hohe relative Peakintensitäten für *p*-Anisaldehyd zeigte (Abbildung 5).

Mk 37 wurde im Oberflächenscreening als waldmeisterartig beschrieben, wobei jedoch im SNL-Flüssigscreening die relative Peakintensität des Dillether 2 höher als die des *p*-Anisaldehyds war. . Mit Mk 124 wurde auch ein Vertreter der Generation ausgewählt, die aus dem Dikaryoten 3174 hervorging. Als einer der selteneren Stämme wurde bei diesem Mk parallel zu *p*-Anisaldehyd auch deutliche Peakintensitäten an (*E*)-Nerolidol in der SNL-Flüssigkultur detektiert.

Da Omarini *et al.* (2014) in ihren Untersuchungen feststellten, dass es sich bei Mk 74 um einen guten Nootkaton-Produzenten aus der Transformation von (+)-Valencen handelt, wurde dieser Stamm in der gleichen Studie genutzt um einen neuen Dikaryoten daraus zu bilden, der auch in der vorliegenden Arbeit gescreent wurde. Während Mk 74 im SNL-submersen Screening nicht auffiel, zeigte er im Oberflächenscreening mit CSS-Agar ein grün-krautiges Geruchsprofil.

## 4.2 Isolierung, Anreicherung & Identifizierung flüchtiger Verbindungen

Um das erhaltene Geruchsprofil der Fermentation gaschromatographisch möglichst authentisch abzubilden, bedarf es einer geeigneten Extraktion der volatilen Substanzen. Dafür gibt es verschiedenste Techniken. Die drei hier gewählten weisen alle Vor- und Nachteile auf, sowohl was die Handhabung als auch die Extraktionsleistung betrifft. Laut einem Bericht von Jeleń *et al.* aus 2012 war zu diesem Zeitpunkt SPME die am weitesten verbreitete Mikroextraktionsmethode zur Aromaanalytik von Lebensmitteln. Da der Anteil an semi-volatilen Verbindungen insbesondere in den hier vorliegenden Proben mit CSS-Supplement vergleichsweise groß war, wurde mittels HS-SPME nur ein unzureichendes Extraktionsergebnis erzielt. Vom Hersteller wird für Aromastoffe die Beschichtung DVB/CAR/PDMS empfohlen, die sich aufgrund des Carboxens und der hohen Konzentrationen an *p*-Anisaldehyd in den Kulturen als nicht geeignet erwies. Ähnliche Beobachtungen wurden von Trapp *et al.* (2018) bei der Analyse verschiedener Standardsubstanzen gemacht. Alternativ wurde daher auf PDMS/DVB-Beschichtung zurückgegriffen. Die SPME-Technik bietet den großen Vorteil des geringen Aufwands hinsichtlich der Probenvorbereitung und leicht in der Handhabung zu sein. Gleiches gilt für die SBSE-Technik (Wells, 2003). Da dabei der *direct immersion* Ansatz gewählt wurde, wurden im Gegensatz zur SPME mehr Verbindungen im semi-volatilen Bereich erfasst. Hinzukommt, dass die Kapazität der PDMS-Beschichtung des Rührmagneten deutlich höher ist als die der SPME-Fasern, was zu höheren Empfindlichkeiten führt (Baltussen *et al.*, 2002). Damit wurde die Anzahl an extrahierten Substanzen trotz eines deutlich höheren Splitverhältnisses (50:1 vs. 20:1) gesteigert. Jedoch hatte die hohe Empfindlichkeit in der vorliegenden Studie auch den Nachteil, dass die vergleichsweise großen Mengen an *p*-Anisaldehyd unter den gewählten TDU-Parametern nicht vollständig desorbiert wurden. Der traditionellste Weg der Aromaanalyse führt über die Simultane Destillation und Extraktion (SDE), wobei dort die Bildung von Artefakten durch die hohe Temperaturbelastung ein Risiko darstellt. Eine schonendere Alternative dazu bietet eine Flüssig-/Flüssigextraktion mit anschließender Abtrennung schwerflüchtiger Matrixbestandteile mittels SAFE (Engel *et al.*, 1999). Bei der Analyse von extrudierten Kartoffelsnacks wurden SDE, SPME und SAFE miteinander verglichen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass SAFE die am besten geeignete Methode war, da mittels SDE Artefakte gebildet wurden und per SPME nicht alle Substanzen extrahiert werden konnten (Majcher & Jeleń, 2009). Bei der Durchführung von Aromaextraktverdünnungsanalysen (AEVA) kommt hinzu, dass bei einer Flüssig-/Flüssigextraktion ein und derselbe Extrakt schrittweise verdünnt wird, während bei den automatisierten Verfahren wie SBSE oder SPME jeder Verdünnungsstufe eine Extraktion vorausgeht, was sich nachteilig auf die Reproduzierbarkeit auswirken kann. Bei diesen Techniken, wie auch bei der zunehmend genutzten Alternative der *dynamic headspace* (DHS), wird das Splitverhältnis für die Aromaverdünnungsanalyse direkt über das GC-System eingestellt. Daraus ergibt sich allerdings auch

eine Limitierung, da höhere FD-Faktoren nicht mehr bestimmt werden können (Trapp *et al.*, 2018; Brescia *et al.*, 2021).

Als nachteilig werden bei der Flüssig-/Flüssigextraktion der hohe Lösungsmittelverbrauch sowie die Zeitintensität angesehen. Daneben besteht eine erhöhte Gefahr des Verlustes von sehr volatilen Substanzen (Zhang *et al.*, 2015b), wobei im vorliegenden Fall Verbindungen mit einem niedrigen Siedepunkt vor allem Terpene des eingesetzten Substrates waren und weniger Pilzmetabolite.

Grundsätzlich wird das beste Bild durch sich ergänzende Extraktionsmethoden erhalten, wobei vor allem die Matrix und mögliche spezifische Zielsubstanzen eine entscheidende Rolle spielen.

Aufgrund des waldmeisterartigen Gesamteindrucks der Pilzkulturen mit CSS wurde vermutet, dass die relevantesten Verbindungen im semi-volatilen Bereich liegen. Infolgedessen wurde die Flüssig-/Flüssigextraktion in Kombination mit SAFE genutzt, um Extrakte der Fermentationsbrühen ausgewählter monokaryotischer Stämme und des ursprünglichen Dikaryoten zur sensorischen Beurteilung durch ein Panel herzustellen. Dabei kristallisierte sich Mk 37 durch sein sehr harmonisches Geruchsprofil (Abbildung 11) weiter als interessanter Kandidat für die sich anschließende Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEDA) zur Identifizierung relevanter volatiler Substanzen heraus.

Es wurden zahlreiche Monoterpene und Terpenalkohole, die typischerweise in *Citrus*früchten vorkommen, detektiert, wovon ein Großteil ebenfalls im verwendeten Substrat identifiziert wurde. Limonen und Linalool wurden bereits für Flüssigkulturen von PSA beschrieben (Trapp *et al.*, 2019) und konnten z. T. bei der SNL-Kultivierung für einige Stämmen nachgewiesen werden. Diese Monoterpene können daher sowohl auf das Substrat als auch auf den Pilzmetabolismus zurückgeführt werden. Andere für *Citrus*früchte typische Aromaverbindungen wie *p*-Cymen-8-ol (**29**, FD 512) und die beiden Monoterpenketone Dihydrocarvon (**22**, FD 1024) und Piperiton (**26**, FD 64) (Moshonas *et al.*, 1972; Cannon *et al.*, 2015) sind ausschließlich auf den Pilzmetabolismus zurückzuführen, da sie nicht im Substrat vorkamen. Die Verbindung **22** wurde bisher als Umsetzungsprodukt von Myrcen durch verschiedene Basidiomycota, darunter auch PSA, beschrieben (Busmann & Berger, 1994). Da Myrcen auch im CSSM detektiert wurde, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um den Präkursor von Dihydrocarvon, welches in der Literatur als minzig und frisch beschrieben wurde (Busmann & Berger, 1994).

(*Z*)-Linalooloxid-furanoid (**16**, FD 64) kommt häufig zusammen mit Linalool vor und wurde verschiedentlich als Metabolit von Weißfäulepilzen beschrieben (Drawert *et al.*, 1983; Gallois *et al.*, 1990; Abraham & Berger, 1994). Dagegen wurde keine Literatur über das Vorkommen von (*Z*)-(+)-Limonenoxid (**15**, FD 1024) in Basidiomycota gefunden. Es ist als Inhaltsstoff für *Citrus*schale oder -öle beschrieben, wurde aber nicht im verwendeten CSS detektiert (Chamblee *et al.*, 1991; Blanch & Nicholson, 1998; Belletti *et al.*, 2004).

Neben den bereits in den SNL-Kulturen gezeigten Dillether-Isomeren (**17**, FD 32.768; **20**, FD 128) wurde hier auch das durch Trapp *et al.* beschriebene Stereoisomer des Weinlactons detektiert (Trapp *et al.*, 2018; Trapp *et al.*, 2019). Aus auf anderen Medien gezogenen Kulturen wurde ein zweites Isomer dieses Benzofuran-Derivates extrahiert, welches in den hier vorliegenden Kulturen nicht detektiert wurde (Trapp *et al.*, 2018; Trapp *et al.*, 2019).

Eine Vielzahl der identifizierten aromaaktiven Verbindungen ist den arylischen Verbindungen zuzuordnen (Abbildung 12). Davon sind bereits einige als in PSA vorkommend aus der Literatur bekannt, worunter *p*-Anisaldehyd (**33**, FD 262.144), (*E*)-Methylcinnamat (**34**, FD 1024) und Methyl-*p*-anisat (**35**, FD 4096) fallen (Abraham & Berger, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1994; Trapp *et al.*, 2018). Die strukturelle Ähnlichkeit dieser Verbindungen spiegelte sich in ähnlichen Geruchseindrücken wider. So wurde für alle diese arylischen Verbindungen ein süßlicher Geruch wahrgenommen, außer für die Verbindung *p*-Methoxyphenylaceton (**37**), welche in der Literatur als fruchtig beschrieben wurde (Díaz-Maroto *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu wurde diese Substanz am ODP als grün, holzig und würzig wahrgenommen.

Der Hauptaromastoff *p*-Anisaldehyd kommt in Fenchel, Sternanis und auch in Vanille vor (Díaz-Maroto *et al.*, 2005; Zeller & Rychlik, 2006; Brunschwig *et al.*, 2012; Zhang & Mueller, 2012; Takahashi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015a; Shigeto *et al.*, 2016; Afifi *et al.*, 2021). Je nach Studie wurden 0,3 mg kg<sup>-1</sup> bis 132 mg kg<sup>-1</sup> dieser süßlichen, anis- und waldmeisterartigen Verbindung in Vanillebohnen quantifiziert (Zhang & Mueller, 2012; Takahashi *et al.*, 2013; Shigeto *et al.*, 2016). Takahashi *et al.* (2013) haben in *Vanilla tahitensis* die Schlüsselaromastoffe identifiziert und haben sowohl für Vanillin als auch für *p*-Anisaldehyd einen FD Faktor von 1.953.125 bestimmt. Somit tragen beide gleichermaßen zum Gesamtaroma dieser Vanille bei, was die Bedeutung von *p*-Anisaldehyd in den Schoten der Tahiti-Vanille im Gegensatz zu denen von der weiter verbreitenden *Vanilla planifolia* deutlich macht (Pérez-Silva *et al.*, 2006; Brunschwig *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013).

Als Konsequenz der Identifizierung des *p*-Anisaldehyds als Schlüsselaromastoff (3.5), erfolgte die Quantifizierung über SIVA (3.8), um auch mögliche industrielle Anwendungsgebiete ausmachen zu können. An Kulturtag 4, der auch für den Extrakt der AEVA ausgewählt wurde, wurden je nach Substrat (9,2 ± 1,7) mg L<sup>-1</sup> (CSS<sub>2</sub>) bzw. (73,2 ± 10,7) mg L<sup>-1</sup> (CSS<sub>3</sub>) des Aromastoffs nachgewiesen. Aufgrund begrenzter Verfügbarkeiten des CSS<sub>1</sub>, der für die Kultur der AEVA verwendet wurde, ist ein Rückschluss der bestimmten Mengen zu möglichen Gehalten des AEVA-Extraktes nicht möglich. Für CSS<sub>2</sub> konnte allerdings ein deutlicher Anstieg an *p*-Anisaldehyd während der Kultivierung von Tag 4 auf Tag 6 (Faktor 16) und wiederum auf Tag 8 (Faktor 1,1) beobachtet werden. Auffällig war der vergleichsweise konstante Gehalt an *p*-Anisaldehyd unter Verwendung von CSS<sub>3</sub>. Möglicherweise spielten bei dieser Kultivierung Inhibierungseffekte eine Rolle, die unter anderem auf enthaltene Terpene zurückgeführt werden können (Onken & Berger, 1999).

Bereits 1994 haben Abraham und Berger die Konzentration von *p*-Anisaldehyd in einer PSA-Kultur in einem chemisch zusammengesetzten Medium zu 13 mg L<sup>-1</sup> bestimmt. In Kulturen von *P. pulmonarius* wurden in einem Glucose-basierten Medium ca. 27 mg L<sup>-1</sup> des nach Anis, Waldmeister und süßlich riechenden Methoxybenzaldehyds bestimmt (an Kulturtag 12) (Gutiérrez *et al.*, 1994). Diese Studie zeigte auch, dass in einem Lignin-basierten Medium alle untersuchten *Pleurotus* spp. mit Ausnahme von *P. eryngii* Anisaldehyd produzierten (Gutiérrez *et al.*, 1994).

Mit dem Basidiomycet *Ischnoderma benzoinum* wurden in einem synthetischen Medium Gehalte für *p*-Anisaldehyd mit bis zu 356 mg L<sup>-1</sup> bestimmt (Berger *et al.*, 1987). Die Kultivierung erfolgte dabei im Schüttelkolben bei 200 rpm. Für die Experimente dieser Arbeit wurde die Geschwindigkeit des Orbitalschüttlers standardmäßig auf 150 rpm eingestellt, wobei mit einem höheren Wert möglicherweise noch größere Gehalte erzielt werden könnten.

Quantifizierungen von Aromastoffen in Fermentationsprodukten mit Pilzen zeigen oftmals Ausbeuten der Schlüsselverbindungen im µg L<sup>-1</sup> bzw. kg<sup>-1</sup> oder niedrigen mg L<sup>-1</sup> bzw. kg<sup>-1</sup> Bereich (Zhang *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2015c; Nedele *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2022). So wurden bei der Fermentation von schwarzem Johannisbeertrester mit *Wolfiporia cocos* in Oberflächenkultivierung die beiden Aromastoffe mit dem höchsten *Odor Activity Value (R)*-Linalool und Methylantranilat mit 1897 µg kg<sup>-1</sup> bzw. 2206 µg kg<sup>-1</sup> bestimmt (Sommer *et al.*, 2021). Der gleiche Pilz wurde für die submerse Kultivierung mit grünem Teeaufguss verwendet, wo dieselben Aromastoffe als Schlüsselaromastoffe in ähnlicher Größenordnung wie von Sommer *et al.* quantifiziert wurden (Linalool 1137 µg L<sup>-1</sup>; Methylantranilat 6419 µg L<sup>-1</sup>) (Rigling *et al.*, 2021).

Ausbeuten dieser Größenordnung machen die industrielle Anwendung der entwickelten Fermentationsprozesse schwer. Dagegen kann bei höheren mg kg<sup>-1</sup> bzw. L<sup>-1</sup> Gehalten, wie es für *p*-Anisaldehyd in dem vorliegenden Fermentationssystem der Fall ist (3.8), über weitere Prozessoptimierungsschritte nachgedacht werden, was eine mögliche Umsetzung in der Aromaproduktion interessant macht.

Die Verbindung **42** war die Substanz mit dem zweithöchsten FD Faktor von 65.536 und wurde als blumig, süßlich und krautig wahrgenommen, allerdings konnte diese Verbindung nicht identifiziert werden. Auf Basis des Massenspektrums wurde jedoch auf ein Benzofuranderivat geschlossen. Relevante Fragmente mit den jeweiligen Intensitäten waren *m/z* 111 (100%), 137 (43%), und 180 (28%). Diese Fragmente sind auch charakteristisch für 5,6,7,7a-Tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-2(4*H*)-benzofuranon [Dihydroactinidiolid, *m/z* 111 (100%), 137 (59%), 180 (34%)], wobei jedoch die RI-Werte auf der polaren Säule zu weit voneinander entfernt lagen (**42**: 2350, Dihydroactinidiolid: 2318). Dihydroactinidiolid wird in der Literatur als holzig, moschusartig und fermentiert beschrieben und

trägt bedeutend zum Aroma von Tee bei (Rigling *et al.*, 2022). Das Weinlacton-Isomer **39** gehört auch zu dieser Verbindungsklasse und zeichnet sich durch eine sehr niedrige Geruchsschwelle aus (bis zu  $0,01 \text{ pg L}^{-1}$  in Luft) (Guth, 1996). Dies könnte auch für **42** der Fall sein, da die Peakfläche der Verbindung sehr gering war.

Die identifizierte Verbindung 2-HPP zeigte mit einem Enantiomerenverhältnis von 98,4:1,6 einen großen Überschuss für das (*S*)-Enantiomer und reichte somit fast an die Enantiomerenreinheit des durch die Bäckerhefe produzierten 2-HPP heran. Das Acyloin wurde in der Vergangenheit bereits in einem Verwandten von *PSA*, *P. pulmonarius* identifiziert, um die hohe nematocidale Aktivität gegen den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* zu zeigen (Stadler *et al.*, 1994). Jedoch gab es in der Literatur bisher keine Berichte über die Aromaeigenschaften des 2-HPP.

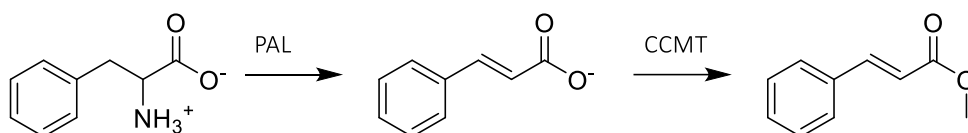
Neuser *et al.* (2000b) untersuchten im wesentlichen aliphatische geruchsaktive  $\alpha$ -Hydroxyketone. Es wurde jedoch auch eine aromatische Substanz 3-Hydroxy-4-phenyl-2-butanon mit einem blumigen, süßlichen Geruch analysiert, deren Geruchsschwelle auf 75 - 100 ng (in Luft) bestimmt wurde. 2-HPP ist damit 80 bis 1000-mal potenter ( $0,2 \text{ ng L}^{-1}$  bis  $2,4 \text{ ng L}^{-1}$  entspricht 0,1 bis 0,9 ng absolut). Auch bei anderen Acyloinen, die aus Terpenoiden hergestellt wurden, lag die Geruchsschwelle deutlich höher (110 - 1000 ng) (Zorn *et al.*, 2003).

Im Zuge der durchgeführten Arbeiten fiel auf, dass 2-HPP von den Panelisten sehr unterschiedlich wahrgenommen wurde (3.6). Allerdings sind dazu intensivere Studien notwendig, da in der Literatur keine Hinweise auf Anosmien gegenüber dieser Substanzklasse vorliegen. Zudem bestand das Panel nur aus 12 Personen, was für solch unterschiedliche Geruchswahrnehmung nicht repräsentativ ist.

Die dargestellten identifizierten Substanzen zeigten eine Momentaufnahme des Profils an Kulturtag 4 des Mk 37. Um bessere Rückschlüsse auf die Bildung der relevanten Aromastoffe schließen zu können, wurde deren Verlauf von Beginn der Kultivierung bis zum 10. Kultivierungstag für den gleichen Monokaryoten untersucht (3.7). Dabei ließ sich ein paralleler Bildungsverlauf der Verbindungen mit gleicher Grundstruktur, namentlich Methylcinnamat, 4-Chlor-3-methoxybenzaldehyd, 4,6-Dimethoxyphthalid, *p*-Anisaldehyd, Methyl-*p*-anisat, Veratraldehyd, 2-HPP und *p*-Anissäure, feststellen. Dies gibt ein Indiz für Überschneidungen in den jeweiligen Biosynthesewegen und/oder Biotransformationswegen.

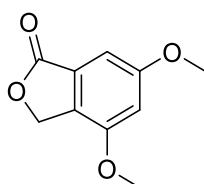
Bosse *et al.* (2013) führten ebenfalls eine zeitabhängige Studie zur Bildung ausgewählter Aromastoffe mit *Tyromyces chioneus* auf Apfeltrester durch. Dabei wurde Methylcinnamat ab Kulturtag 6 mit einem Anstieg der Intensität bis Tag 8 nachgewiesen. Anhand des Basidiomyceten *Tricholoma matsutake* wurden zwei Möglichkeiten der Bildung postuliert. Zum einen gibt es Hinweise auf den Shikimat-Biosyntheseweg über Phenylalanin und Zimtsäure, wobei der letzte Schritt ähnlich wie in Pflanzen

durch eine Zimtsäure-Carboxyl-Methyltransferase (CCMT) katalysiert werden würde (Abbildung 34). Zum anderen wäre eine Umwandlung von Cinnamoyl-CoA zu Methylcinnamat in Gegenwart von Methanol durch eine Acyltransferase denkbar (Kapteyn *et al.*, 2007; Hattori *et al.*, 2016; Tasaki *et al.*, 2018). Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit Fütterungsstudien mit Phenylalanin durchgeführt wurden und auch dort die Bildung von Methylcinnamat induziert wurde, könnte ein vergleichbarer Bildungsweg bei PSA vorliegen (Abbildung A 9).



**Abbildung 34: Biosynthese von Methylcinnamat ausgehend von L-Phenylalanin über die Bildung von Cinnamat; PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, CCMT: Zimtsäure-Carboxyl-Methyltransferase**

Ein vergleichsweise ungewöhnlicher Metabolit ist 4,6-Dimethoxyphthalid (4,6-Dimethoxy-3H-2-benzofuran-1-on, Abbildung 35). Natürlich kommen Phthalide in verschiedenen Pflanzen, insbesondere in Vertretern der *Umbelliferae/Apiaceae* (Doldenblütler) und Pilzen vor, wobei einige der Pflanzen in der traditionellen Medizin Anwendung finden (z. B. die Wurzel von *Ligusticum porteri*). Zudem wurde auch über das Vorkommen eines ähnlichen Metaboliten, 5,7-Dimethoxyphthalid, in *P. citrinopileatus*, kultiviert auf Reis berichtet (Li *et al.*, 2013). Im Lebensmittelbereich tragen verschiedene Phthalide entscheidend zum Aroma von Stauden- und Knollensellerie bei (MacLeod & Ames, 1989; van Wassenhove *et al.*, 1990; Kurobayashi *et al.*, 2006). Die Biosynthese dieser Verbindungsklasse ist weitestgehend unklar. Eine neuere Metabolom- und Transkriptomstudie in Selleriesamen zeigt eine Parallele zu einem Gen in Petunien, welches in die Regulierung des Metabolismus von arylischen Verbindungen involviert ist (Verdonk *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2021). Li *et al.* (2013) postulieren die Biosynthese über den Acetat-Malonat-Weg.



**Abbildung 35: Struktur von 4,6-Dimethoxyphthalid**

Methyl-*p*-anisat ist einer der arylischen Metabolite, die zum anisartigen Gesamteindruck der Kultur beitragen (3.5). In dem Speisepilz Anis-Klumpfuß (*Cortinarius odorifer*) wurde die Verbindung mit einem FD-Faktor von 8192 und einer Konzentration von 120 mg kg<sup>-1</sup> als Schlüsselaromastoff identifiziert (Kleofas *et al.*, 2015). Auch in den während dieser Arbeit angelegten Kulturen unterstützt diese Verbindung den anisartigen Gesamteindruck.

Für Methyl-*p*-anisat ist als Präkursor *p*-Anissäure sehr wahrscheinlich. Bereits 1988 wurde von Wood *et al.* dieser Bildungsweg nach Detektion in *Hydnellum suaveolens*, einem Basidiomyceten, vorgeschlagen. Für die Methylierung kommt dabei die Funktionalität einer *O*-Methyltransferase in Frage, wie es beispielsweise bei Fütterungsstudien mit isotopenmarkiertem L-Methionin in *B. adusta* diskutiert wurde (Silk & Macaulay, 2003b).

Recht frühe Nachweise gibt es sowohl für 4-Chlor-3-methoxybenzaldehyd als auch für 3-Chlor-4-methoxybenzaldehyd in Oberflächen- und Schüttelkulturen von *Lepista diemii* Singer (Thaller & Turner, 1972). Daneben wurde auch in anderen Genera wie *Bjerkandera*, *Hypholoma*, *Oudemansiella*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Stropharia* und *Trametes* vom Vorkommen chlorierter arylischer Metabolite (CAM) berichtet (Hautzel & Anke, 1990; Pfefferle *et al.*, 1990; de Jong *et al.*, 1992; Lauritsen *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 1994; Spinnler *et al.*, 1994; Field *et al.*, 1995). Mit Ausnahme von *Lepista diemii* wird sonst nur die Präsenz von mono- und/oder dihalogeniertem *p*-Anisaldehyd bzw. dem entsprechenden Alkohol gezeigt. Demnach sind unsere Ergebnisse (3.7) erst der zweite Nachweis des 4-Cl-3-methoxybenzaldehyds in Basidiomyceten und heben sich insbesondere von den zahlreichen Studien zu *B. adusta* und *B. sp. BOS55* ab. 1992 veröffentlichten de Jong *et al.* eine Studie der Biosynthese von 3-Chlor-*p*-anisaldehyd und des entsprechenden Alkohols durch *B. adusta* in einem Glucose-basierten Medium. Sie schlussfolgerten, dass eine Aryl-Alkohol-Oxidase eine zentrale Rolle in der Produktion der chlorierten arylischen Metabolite (CAM) spielt (de Jong *et al.*, 1992). Weitere Untersuchungen in Basidiomyceten geben starke Hinweise auf Tyrosin und/oder Phenylalanin als Intermediate der CAMs (Spinnler *et al.*, 1994; Beck, 1997). Diese Indizien zeigen Parallelen zu den Ergebnissen dieser Arbeit, wobei auch hier nicht 3-Cl-4-methoxybenzaldehyd gebildet wurde, sondern 4-Cl-3-methoxybenzaldehyd (3.9). Auffällig war außerdem, dass ein Nachweis nur in den statisch geführten Supplementationskulturen möglich war und eine Induktion der Bildung durch Tyrosin nicht gelang (3.9.2).

Für die Bildung des 3-Cl-*p*-anisaldehyds gibt es verschiedene Thesen. Zum einen wird *p*-Anisaldehyd als direkter Präkursor angesehen, welcher anschließend chloriert wird (Beck, 1997) und zum anderen deutet eine Supplementierungsstudie auf eine Chlorierung vor der Methylierung hin, da 4-Hydroxybenzoat die frühe Bildung von CAMs stimuliert, während *p*-Anisat nur im späteren Kulturverlauf zu einer verstärkten Produktion führte (Mester *et al.*, 1997). Field und Wijnberg (2003) gehen in ihrem postulierten Bildungsweg von 3-Cl-*p*-hydroxybenzoesäure als Präkursor für die

Methylierung aus. Möglicherweise spielen als Substrate für die Methylierung jedoch auch die korrespondierenden Alkohole oder Aldehyde, was im Falle von PSA 4-Cl-3-hydroxybenzylalkohol bzw. 4-Cl-3-hydroxybenzaldehyd entsprechend würde, eine Rolle. Als Methyldonor wurden in der Vergangenheit für die nicht-halogenierten Derivate neben Chlormethan auch L-Methionin und S-Adenosyl-Methionin (SAM) untersucht, wobei letzteres Cofaktor für O-Methyltransferasen ist (Coulter *et al.*, 1993a; Harper *et al.*, 1996). Dabei zeigte eine aus *Phanerochaete chrysosporium* gereinigte O-Methyltransferase eine deutliche Spezifität hinsichtlich der *para*-Position (Coulter *et al.*, 1993b), was der Bildung des 3-Cl-*p*-anisaldehyds entsprechen würde. Da Voruntersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe eine ähnliche Spezifität für eine in PSA vorliegende O-Methyltransferase zeigten, ist an dieser Stelle von einem anderen Präkursor auszugehen.

Physiologisch sind die CAMs im Ligninabbau von Bedeutung. Nach de Jong *et al.* (1994b; 1994a) werden in *Bjerkandera* sp. BOS55 die halogenierten Metabolite simultan zu den Aktivitäten von AAO und ligninolytischen Peroxidasen gebildet. 3-Cl-4-methoxybenzylalkohol und auch 3,5-Dichlor-4-methoxybenzylalkohol wurden als sehr gute und im Vergleich zu den nicht-halogenierten Analogenen als bessere Substrate für die AAO ausgemacht und produzieren damit das für zahlreiche ligninolytische Enzyme notwendige Wasserstoffperoxid (de Jong *et al.*, 1994b; de Jong *et al.*, 1994a). Eine rekombinante PSA AAO zeigte sehr gute Aktivitäten insbesondere gegenüber *p*-Anisalkohol (Galperin *et al.*, 2016). Chlorierte Anisylalkohole wurden für dieses Enzym nicht getestet, sodass dahingehend keine weiteren Aussagen möglich sind.

Basierend auf den von Lapadatescu *et al.* (2000) postuliertem Biosyntheseweg in *B. adusta* lassen sich *p*-Anissäure, der korrespondierende Aldehyd sowie Veratraldehyd auf gemeinsame Präkursoren beginnend mit L-Phenylalanin zurückführen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den hier erzielten Ergebnissen in PSA (3.9). Eine tragende Rolle nehmen dabei die ligninolytischen Enzyme AAO, LiP, AAD, und AADD ein, da sie die Katalyse zwischen den jeweiligen Alkoholen, Säuren und Aldehyden steuern. Für die Erhaltung des Redoxzyklus mit Beteiligung von AAD und AAO zur Produktion von Wasserstoffperoxid ist aus physiologischer Sicht mit hoher Wahrscheinlichkeit *p*-Anisaldehyd verantwortlich, da dies in PSA wie auch in anderen Pleuroten in großen Mengen gebildet wird (Guillén & Evans, 1994).

Shimada und Gold (1983) berichteten, dass der Pilz *Phanerochaete chrysosporium* in der Lage ist, die Ligninmodellsubstanz Dihydroanisoin zu *p*-Anisaldehyd zu spalten, welches dann zum korrespondierenden Alkohol weiter reagiert, der ebenfalls in den CSSM PSA Mk 37 Kulturen identifiziert wurde (3.5). Katalysiert wird diese Reaktion möglicherweise durch eine Ligninperoxidase (Shimada & Gold, 1983). Zu ähnlichen Ergebnissen kommt die Arbeitsgruppe um Espejo, die Studien zu *Wolfiporia cocos* und *Gloeophyllum trabeum* durchführten und welche davon ausgehen, dass Dihydroanisoin durch Reduktion des Anisoin gebildet wird (Espejo *et al.*, 1990).

Aus Untersuchungen mit *Pleurotus eryngii* wurde geschlossen, dass wahrscheinlich zwei Redoxzyklen existieren, mit den Paaren Säure-Aldehyd und Aldehyd-Alkohol. Es wurde gezeigt, dass Veratraldehyd direkt aus Veratrumsäure via AADD gebildet wird, da kein Wasserstoffperoxid entsteht, was auf die Beteiligung einer AAO schließen würde (Guillén & Evans, 1994).

Wie bereits zuvor erwähnt, ist eine AAO aus PSA beschrieben (Galperin *et al.*, 2016). Bei der Untersuchung der LiP-Aktivität in PSA wurden Ergebnisse zwischen 30 und 59 U mL<sup>-1</sup> auf verschiedenen ligninhaltigen Substraten erzielt (Bilal & Asgher, 2016). PSA sticht damit etwas innerhalb der Pleuroten heraus, da andere Spezies keine bis sehr geringe LiP-Aktivitäten zeigten (Okamoto *et al.*, 2002; Kalmış *et al.*, 2008).

Zusammenfassend bestätigen sich die vermuteten Überschneidungen der Bildungswege der diskutierten arylischen Verbindungen Methylcinnamat, 4-Chlor-3-methoxybenzaldehyd, 4,6-Dimethoxyphthalid, *p*-Anisaldehyd, Methyl-*p*-anisat, Veratraldehyd und *p*-Anissäure, wobei im Wesentlichen das ligninolytische Enzymsystem des Pilzes und die aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin eine Rolle spielen. Für intensivere Untersuchungen möglicher Bildungswege in PSA wurde sich im Folgenden auf die Substanzen *p*-Anisaldehyd und 2-HPP konzentriert.

### 4.3 Induktion der Bildung von *p*-Anisaldehyd und 2-HPP

Um die Bildung von *p*-Anisaldehyd und 2-HPP besser zu verstehen, wurden Induktionsexperimente auf Basis verschiedener Stickstoffquellen durchgeführt (3.9).

Der alleinige Einsatz von Aspartat und Nitrat (ohne Phe oder Tyr) zeigte keine Förderung der Bildung von *p*-Anisaldehyd, der Hauptzielsubstanz der Untersuchungen (Abbildung 18). In einer anderen Studie wurde ebenfalls der Einfluss dieser beiden Stickstoffquellen auf die Aromabildung untersucht. Dabei veränderte sich der Gesamteindruck durch die Zugabe von Aspartat signifikant. Allerdings wurde für diese Untersuchungen kein synthetisches Medium, sondern Trester der schwarzen Johannisbeere zur Fermentation mit *Wolfiporia cocos* verwendet (Sommer *et al.*, 2021). Fraatz *et al.* (2014) machten in ihrer Studie zur Medienoptimierung für PSA deutlich, dass alle untersuchten Kombinationen an Einzelamino­säuren ohne Aspartat bei niedrigen Wachstumsraten zu geringen Biomassen führten. In der vorliegenden Studie zeigten die Kulturen mit zusätzlicher Asp-Supplementation beim Einsatz von Phe mit deutlichem Abstand die größten Peakintensitäten (erste Stufe der Medienoptimierung, Abbildung 18). Dahingehend stimmten die hier erzielten Ergebnisse mit den anderen Studien überein. Im Gegensatz dazu wurden jedoch die größten Peakintensitäten für Tyrosin ohne zusätzliches Aspartat erreicht. Bei der geringsten Tyrosinkonzentration und zusätzlicher Zugabe von Aspartat wurde eine vergleichbare Größenordnung an Anisaldehyd erzielt. Eine eindeutige Schlussfolgerung zum Effekt dieser zusätzlichen Stickstoffquelle im Zusammenhang mit Tyr konnte aus diesen Ergebnisse nicht gezogen werden. Daraufhin wurde alternativ der Einsatz von Hefeextrakt getestet (zweite Stufe der Medienoptimierung, Abbildung 19), welcher laut Literatur ebenfalls positive Auswirkungen auf das Wachstum von PSA hat (Fraatz *et al.*, 2014) und nach den hier erarbeiteten Ergebnissen auch auf die Bildung von *p*-Anisaldehyd (3.9.1). Bei der Tyr-Supplementation lieferte hier die Zugabe von Asp und Nitrat ähnliche Ergebnisse wie die Zugabe von Hefeextrakt bei gleichbleibender Tyr-Konzentration. Da Hefeextrakt deutlich günstiger ist und zudem auch die Ausbeuten bei der Phe-Zugabe höher lagen, kam auch im finalen Supplementationsmedium Hefeextrakt (0,3 g L<sup>-1</sup>) zum Einsatz (Tabelle 26).

In einer Studie aus 2002 wurden verschiedene Konzentrationen an L-Tyrosin (1-10 mM) zu Kulturen von *P. ostreatus* gegeben. Mit 5 mM wurde eine Anisaldehyd-Konzentration von 366 mg L<sup>-1</sup> 18 Tage nach Inokulation in einer statischen Kultur erreicht. Eine weitere Steigerung der Tyrosinkonzentration auf 10 mM führte nicht zu höheren Konzentrationen des Aromastoffs innerhalb des untersuchten Zeitraums (Okamoto *et al.*, 2002). Obwohl in den hier getätigten Untersuchungen 33 mM Tyr eingesetzt wurden, führte dies bei PSA Mk 37 nur zu 71,1 ± 24,2 mg L<sup>-1</sup> *p*-Anisaldehyd (3.9.3). Wenn jedoch ausschließlich eine möglichst hohe Produktion dieses Aldehyds als Ziel gesetzt wird, ist ein anderer monokaryotischer Stamm, wie z. B. Mk 93 geeigneter, was die Screening-Daten deutlich gemacht haben (Abbildung 5).

Die Hypothese, dass L-Tyrosin in die Biosynthese von *p*-Anisaldehyd in PSA involviert ist, wurde durch die erfolgreiche Umsetzung des deuterierten Tyrosins eindeutig gestützt. Auf diese Weise wurde auch die Bildung des 2-HPP auf die aromatische Aminosäure zurückgeführt (3.9.3). In der Literatur wurde der Biosyntheseweg des Acyloins in Basidiomyceten bisher nicht eindeutig aufgeklärt. Bei *B. adusta* wurde 2-HPP nach Supplementierung des Kulturmediums mit  $^{13}\text{C}_6$ -*p*-Anisaldehyd mittels GC-MS detektiert (Silk & Macaulay, 2003a). Der Fokus dieser Studie lag allerdings auf Chlorarylpropandiolen, von welchem bereits einige 1998 durch Swarts *et al.* beschrieben wurden. Silk *et al.* (2001) fanden solche Diole auch nach Supplementierung mittels  $^{13}\text{C}_9$ -L-Phenylalanin. In dem CSSM PSA Mk 37 Extrakt wurden auch 1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandiol vorläufig und das korrespondierende Diketon (1-(4-Methoxyphenyl)-1,2-propandion) abschließend identifiziert (Tabelle A 4), allerdings zeigten beide Verbindungen keine FD-Faktoren > 64 und fanden so keine Berücksichtigung in der AEVA. In den in der Literatur zu findenden *Bjerkandera*-Studien gibt es keine Berichte über das Vorkommen des Diketons. Die Biosynthese des Diols wird einerseits auf einen reduktiven Weg zurückgeführt, bei welchem das Acyloin als Intermediat angesehen wird (Brambilla *et al.*, 1995; Silk *et al.*, 2001) und andererseits gibt es Hinweise, dass das Diol zum  $\alpha$ -Hydroxyketon im Zuge des Ligninabbaus oxidiert wird (Buswell *et al.*, 1987). Zusätzlich wurden Aryldiketone als Abbauprodukte aus Lignin isoliert und dienten folglich als Ligninmodellsubstanzen (Brauns, 1952; Pepper & Saha, 1964).

Die hier getätigten Untersuchungen zeigten, dass die statische Kultivierung die Bildung des 2-HPP aus Tyr und Phe induzierte (Abbildung 21). Auch die Studien zu den Chlorarylpropandiolen aus *B. adusta* durch verschiedene Arbeitsgruppen erfolgten anhand statisch gewachsener Pilzkulturen (Swarts *et al.*, 1996; Silk *et al.*, 2001; Silk & Macaulay, 2003a; Silk & Macaulay, 2003b).

Da die Ausbeuten von *p*-Anisaldehyd aus den Schüttelkulturen bedeuten höher gegenüber denen der statischen Kulturen lagen (Abbildung 20), stellte dieses sich umgekehrt zu den Ergebnissen für die Bildung des 2-HPP dar. Dies lässt den Schluss zu, dass die Bedingungen der Enzymaktivitäten für die Bildung von 2-HPP und *p*-Anisaldehyd verschieden sind und zumindest in Teilen der Biosyntheseweg nicht gemeinsam verläuft.

Allerdings deckt sich dies nicht mit den Beobachtungen von Okamoto *et al.* (2002), wo *p*-Anisaldehyd in den Schüttelkulturen von *P. ostreatus* nicht detektiert wurde. Auf enzymatischer Ebene wurden beim Vergleich von sechs Pleuroten die Beobachtung gemacht, dass Laccase die höchsten Aktivitäten bei statischer Kultivierung zeigte, während AAO unter Schüttelbedingungen am aktivsten war (Martínez *et al.*, 1994). Schlussfolgernd kann die Annahme getroffen werden, dass unter den Bedingungen des eingesetzten Mediums (2.9.2) möglicherweise die Aktivität der AAO für die Produktion des *p*-Anisaldehyds in PSA eine bedeutende Rolle spielt.

Da es deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der statischen Kulturen der beiden PSA-Stämme gab und die Konzentrationen an 2-HPP in Mk 37 bei diesem Experiment unter denen der Dk-Kulturen lagen (3.9.2), wird an dieser Stelle ein Zusammenhang zwischen dem Wachstum und der Bildung dieses Sekundärmetaboliten gesehen. Auch Swarts *et al.* (1996) machten die Kulturernte vom Wachstum des Pilzes abhängig und führten die Extraktion erst bei einer vollständig Myzel-bedeckten Oberfläche durch.

#### 4.4 Biotransformationsstudien

Mit dem Ziel, Hinweise auf Enzyme zu bekommen, welche an der Bildung des 2-HPP durch PSA beteiligt sind, wurden Untersuchungen mit lyophilisiertem Myzel durchgeführt.

Beim Vergleich der Umsetzungen der ausgewählten Stämme stach das Ergebnis aus Mk 93 deutlich hervor (3.10.2). Dieser Stamm fiel bereits während des submersen SNL-Screenings durch hohe Konzentrationen an *p*-Anisaldehyd auf (3.3.2). Damit macht dieses Experiment erneut die intraspezifische Variabilität der Monokaryoten deutlich und unterstreicht die Möglichkeit der Nutzung als biotechnologisches Tool zur Steigerung von Ausbeuten (Omarini *et al.*, 2014).

Im Zuge des submersen SNL-Screenings der verschiedenen PSA-Stämme fiel das Vorhandensein des Acyloins nicht auf. Aus diesem Grund erfolgte alternativ die Kultivierung zur Herstellung des Umsetzungs-Lyophilisates in MEP-Medium. Im Vergleich zur Umsetzung mit SNL-Lyophilisat wurde eine höhere Umsetzungsrate für das Acyloin durch MEP-Lyophilisat erzielt.

Durch Carboligase-Aktivität einer PDC kann die Bildung von Hydroxyketonen aus Aldehyden katalysiert werden. Die Arbeitsgruppe um Berger hat so mit Hilfe einer PDC aus *Zygosaccharomyces bisporus* aus verschiedenen Aldehyden die entsprechenden Acyloine generiert; im Fall von Benzaldehyd gelang so eine Ausbeute beider Isomere von 2.382 mg L<sup>-1</sup> bei einer Startkonzentration von 118 mM. Innerhalb der untersuchten Substrate bedeutete dies nach Heptanal die höchste Ausbeute (Neuser *et al.*, 2000a). Die Autoren zeigten jedoch, dass die Kondensation des Pyruvates mit Benzaldehyd zum 1-Hydroxy-1-phenyl-2-propanon führte, was mit *p*-Anisaldehyd dem hier detektierten 1-HPP entsprechen würde. Da bei ausschließlicher Betrachtung der hier durchgeführten Umsetzungen von *p*-Anisaldehyd mit Pyruvat oder Acetaldehyd ebenfalls in der Hauptsache das 1-HPP- Isomer gebildet wurde, wäre dies ein Indiz für einen vergleichbaren Reaktionsmechanismus der PDC aus der o. g. Hefe.

Bei der Analyse der entstandenen Stereoisomere bestimmten Neuser *et al.* (2000a) das *R*-Enantiomer für das Kondensationsprodukt aus Benzaldehyd und Pyruvat. Im Gegensatz dazu führte die Biotransformation des Phenylpyruvates hauptsächlich zum *S*-Enantiomer des 3-Hydroxy-1-phenyl-2-butanons. Die geringe optische Reinheit deuteten die Autoren als Ergebnis einer Racemisierung über Keto-Enol-Tautomerie und spiegelte somit nicht die eigentliche Stereoselektivität des Enzyms wider (Neuser *et al.*, 2000a). Auch andere Studien zur PDC zeigten die bevorzugte Bildung des *R*-Enantiomers (Křen *et al.*, 1993; Bornemann *et al.*, 1996; Lobell & Crout, 1996).

Křen *et al.* (1993) verwendete für die Umsetzungen mit einer PDC aus *Saccharomyces cerevisiae* 20 mM des Aldehyds bei einer Konzentration an Natriumpyruvat von 100 mM. Für die Reaktionen mit der PDC aus *Zygosaccharomyces bisporus* wurde ebenfalls Pyruvat im Überschuss eingesetzt (0,5 mM Pyruvat und 0,1 mM Aldehyd) (Neuser *et al.*, 2000a). Auch die hier dargestellten Studien zeigen, dass höhere Verhältnisse von Pyruvat zu Aldehyd bessere Ausbeuten lieferten, sogar bis zu einem Faktor von 5000, zumindest in einem Konzentrationsbereich des Aldehyds von 0,5 mM. In höheren

Konzentrationsbereichen des *p*-Anisaldehyds konnte die Ausbeute bei 25 mM Pyruvat noch weiter gesteigert werden. Da bei einer Konzentration von 250 mM des Aldehyds eine abnehmende Tendenz zu beobachten war, tritt möglicherweise eine Inhibierung der Enzymreaktion auf (3.10.4). Dieser Effekt wurde auch bereits bei anderen Substraten beobachtet (Crout *et al.*, 1991).

Wird davon ausgegangen, dass das in den PSA CSSM-Kulturen nachgewiesene 2-HPP kein Produkt einer Keto-Enol-Tautomerie ist, ist mit einer hohen Wahrscheinlichkeit die Biokatalyse über die PDC nicht der einzige Weg zur Bildung des Acyloins in PSA.

Wilcocks und Ward (1992) stellten die Biokatalyse von PDC und Benzoylformiatdecarboxylase (BFD) von *Pseudomonas putida* gegenüber, wobei bei Einsatz von Benzaldehyd 2-Hydroxy-1-phenyl-1-propanon beim zweitgenannten Enzym entstand. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe um Gerhards (Gerhards *et al.*, 2012). Dabei wurde Acetaldehyd im Fall der PDC (ebenfalls aus *Pseudomonas putida*) äquimolar zu Benzaldehyd eingesetzt und im Fall der BFD in einer 10-fach höheren Konzentration. In unseren Studien erwies sich eine Konzentration an Acetaldehyd in gleicher Größenordnung mit dem bis zum zehnfachen der Konzentration an *p*-Anisaldehyd als optimal, zumindest für Mk 37. Für den Dk wurde ein optimales Verhältnis von mindestens 1:20, tendenziell eher 1:50 bestimmt. Bei der Biokatalyse über die BFD entstehen bevorzugt die *S*-Enantiomere, wobei sich der Enantiomerenüberschuss über die äußeren Bedingungen steuern lässt (Iding *et al.*, 2000). Dabei erwiesen sich möglichst niedrige Temperaturen und hohe Acetaldehydkonzentrationen bei niedrigen Benzaldehydkonzentrationen als optimal (Dünnwald *et al.*, 2000).

Während häufig für die aromatischen Aldehyde ausschließlich Benzaldehyd umgesetzt wird, wurde in der Studie von Iding *et al.* (2000) auch die Substratspezifität für *p*-Anisaldehyd (10 mM) in Gegenwart von Acetaldehyd (500 mM) getestet. Dabei wurde eine Ausbeute von 23% der Acyloine mit einem Enantiomerenverhältnis von 96:4 für das Hauptisomer des (*S*)-2-HPP erzielt. Da unter ähnlichen Bedingungen in unseren Umsetzungsexperimenten das 1-HPP dominant war, spielt vermutlich eine BFD eher eine untergeordnete Rolle.

Eine ebenso unwahrscheinliche Möglichkeit wäre die Aktivität einer Benzaldehydlyase (BAL, EC 4.1.2.38) bei deren Carboligation aus einem aromatischen Aldehyd und Acetaldehyd das entsprechende *R*-Enantiomer des 2-HPPs entstehen würde (Demir *et al.*, 2002). Da dieses weder in den PSA Mk 37 CSSM Kulturen noch in den Biotransformationsstudien von Bedeutung war, wurde dieses Enzym nicht näher betrachtet.

Zusammenfassend kann für die Umsetzung des *p*-Anisaldehyds in Gegenwart von Acetaldehyd oder Pyruvat gesagt werden, dass wahrscheinlich eine PDC-Aktivität vorliegt. Dies zeigt auch das Ergebnis aus dem Umsatz des entsprechenden isotope-markierten Pyruvates, da im Massenspektrum ein

Massenshift von +1 für das Molekülion von  $m/z$  180 zu sehen war (3.10.4). Für eine Charakterisierung dieses Enzyms sollten nach Isolierung relevante Parameter, wie Michaelis-Menten-Konstante, pH- und Temperaturoptimum sowie Substratspezifität und Enantioselektivität bestimmt werden.

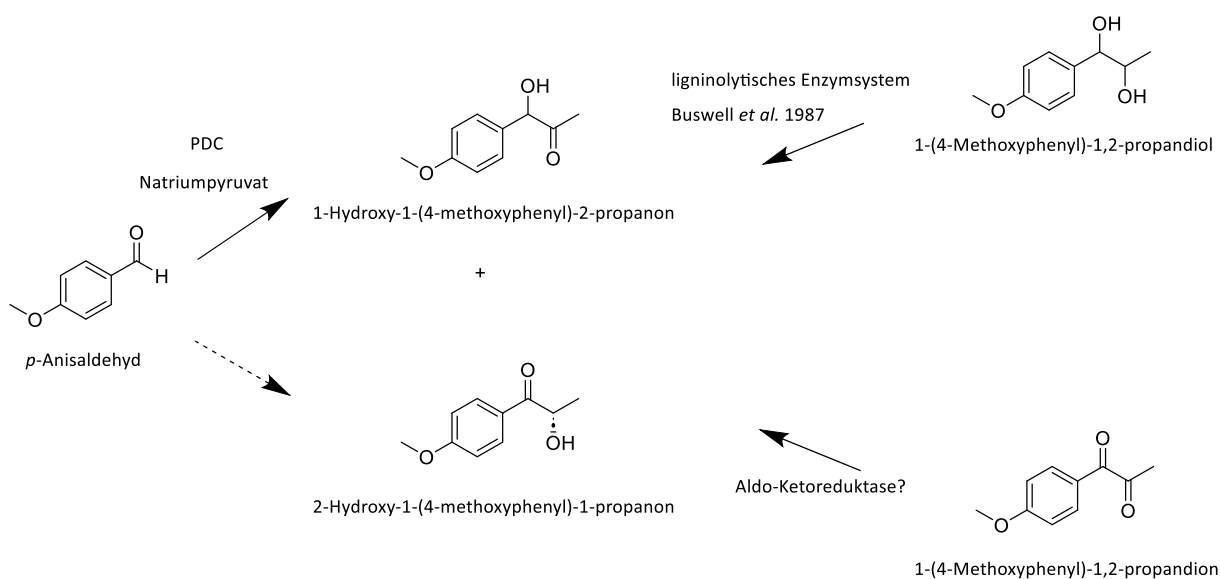
Bei eingehenderer Betrachtung der einzelnen Tautomere in den GC-Analysen fiel auf, dass die zur PDC durchgeführten Experimente zu deutlich größeren Peakintensitäten des 1-HPP im Vergleich zu denen des 2-HPP führten. Ersteres wurde jedoch nicht bei der GC-Analyse des SAFE Destillates der CSSM PSA Mk 37 Kultur gefunden. Um den Temperatureinfluss auf die Keto-Enol-Tautomerie durch die GC-Analyse auszuschließen, wurde das Verhältnis der beiden Isomere mittels HPLC analysiert.

Die HPLC-Chromatogramme der Extrakte aus den Umsetzungen zeigten kaum Signale für das 2-HPP (Abbildung 31), wodurch klar wurde, dass während der Biotransformationen bevorzugt 1-HPP gebildet wird. Selbst als das Puffersystem durch das CSSM-Medium ersetzt wurde (Ergebnisse nicht dargestellt), ließ sich das Gleichgewicht der HPP-Isomere nicht auf die Seite des 2-HPP verschieben. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass in PSA neben einer PDC-Aktivität weitere Enzymaktivitäten vorliegen, welche die Bildung der Acyloine aus *p*-Anisaldehyd katalysieren.

Infolgedessen wurde die Bildung des 2-HPPs aus dem entsprechenden Diketon in Betracht gezogen. Die eindeutige Reduktion des isotopenmarkierten Diketons (3.10.5) unterstreicht die Hypothese, dass die Bildung des Acyloins in Verbindung mit dem ligninolytischen System des Pilzes steht. Aldo-Ketoreduktasen (AKR), die bisher für PSA noch nicht beschrieben wurden, können für diese Reaktion verantwortlich sein und diese möglicherweise auch in anderen Pilzen der Abteilung Basidiomycota katalysieren. AKRs sind eine *enzyme superfamily*, die in Abhängigkeit von Nicotinamidadeninnukleotid(phosphat) (NAD(P)H) die Oxidoreduktion von Carbonylgruppen katalysiert.

Trotz der umfassenden Betrachtung von Chlorarylpropanderivaten in *Bjerkandera*-Spezies gab es in diesen Publikationen keine Hinweise auf solch einen reduktiven Weg (Silk *et al.*, 2001; Silk & Macaulay, 2003a; Silk & Macaulay, 2003b).





**Abbildung 37: Mögliche Bildungswege von 2-HPP in PSA; PDC: Pyruvatdecarboxylase**

Dabei konnte die Bildung aus *p*-Anisaldehyd über die PDC (3.10.4) und aus dem Diketon über eine wahrscheinliche Aldo-Ketoreduktase (3.10.5.2) eindeutig gezeigt werden. Die Oxidation des Diols zum Tautomerenpaar ergibt sich ausschließlich aus der Übertragung der von Buswell *et al.* (1987) beschriebenen Bildung. Die Weiterreaktion der Acyloine zum Diol, die von Brambilla *et al.* (1995) und Silk *et al.* (2001) für Pilze der Abteilung Basidiomycota berichtet wurde, wurde durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse in PSA nicht bestätigt.

#### 4.6 Vergleichende Nährwertcharakterisierung von Substrat, Medium und Fermentationsprodukt

Um die Entwicklung der Hauptelemente vom Substrat über das Medium bis zum Fermentationsprodukt beurteilen zu können, wurden diese Prozessstufen einer Elementaranalyse unterzogen.

Pathak *et al.* haben in einer Studie von 2017 ebenfalls die Gehalte von Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoff von Nebenprodukten der *Citrus*-verarbeitenden Industrie untersucht. Dabei lagen die Kohlenstoffgehalte um ca. 10% niedriger als bei dem hier verwendeten Material, während der Stickstoffanteil vergleichbar und der Wasserstoffanteil ca. 1% niedriger lag (Tabelle 58). Die primären Gründe für die Unterschiede sind in den verschiedenen Herkünften und klimatischen Bedingungen zu finden, wobei die Art der Citrusfrucht eine untergeordnete Rolle spielt. Das bestätigen die Analyse dieser Arbeit, da es sich bei CSS<sub>3</sub> und CSS<sub>4</sub> um Material aus der Orange handelte und in CSS<sub>1</sub> vorwiegend Zitrone enthalten war. Da die ermittelten Werte vergleichbar waren, lassen sich daraus keine Rückschlüsse auf unterschiedliche Herkunftsgebiete ziehen.

Für die Kultivierung von Pilzen spielt das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff eine entscheidende Rolle (Dundar *et al.*, 2009; Sarris *et al.*, 2020). Die hier eingesetzten C/N-Verhältnisse reichten von 37 bis zu 60 (Tabelle 68). Bei Untersuchungen von Wu *et al.* (2004) anhand von *P. tuber-regium* in rein chemischem Medium wurde ein optimales C/N-Verhältnis zwischen 18:1 und 36:1, bezogen auf die Biotrockenmasse, beobachtet.

Bei dem Vergleich der submersen Kultivierung verschiedener Basidiomyceten zwischen einem C/N Verhältnis von 20 zu 50 verdeutlichten die Ergebnisse, dass das optimale Verhältnis sowohl vom Pilz selbst als auch von dem eingesetzten Substrat und damit von der Art des Kohlenstoffs und Stickstoffs abhängig ist (Sarris *et al.*, 2020), was durch andere Studien bestätigt wird (Mikiashvili *et al.*, 2006; Stajić *et al.*, 2006). Damit ist keine Vorhersage für Pilz-Substrat-Kombinationen möglich. Die hier eingesetzten C/N-Verhältnisse reichten von 37 bis zu 60 (Tabelle 68) (Tabelle 21).

**Tabelle 68: Kohlenhydrat/Stickstoff-Verhältnisse von Substraten, Medien und Fermentationsprodukten**

Substrate/Medium/Fermentationsprodukt	C/N-Verhältnis
CSS <sub>1</sub>	34
CSS <sub>3</sub>	53
CSS <sub>4</sub>	47
CSSM <sub>1</sub>	37

**Fortsetzung Tabelle 68**

<b>Substrate/Medium/Fermentationsprodukt</b>	<b>C/N-Verhältnis</b>
<b>CSSM<sub>3</sub></b>	60
<b>CSSM<sub>4</sub> 5%</b>	43
<b>CSSM PSA Mk 74</b>	15
<b>CSSM<sub>3</sub> PSA Mk 74</b>	20
<b>CSSM<sub>4</sub> PSA Mk 37, Kolben</b>	16
<b>CSSM<sub>4</sub> PSA Mk 37, 7,5 L Bioreaktor</b>	14
<b>CSSM<sub>4</sub> PSA Mk 37, 150 L Bioreaktor</b>	11

Für *P. ostreatus* wird berichtet, dass mit zunehmenden C/N-Verhältnis im Bereich von 5 bis 30 auch das Myzelwachstum steigt (Medium basierend auf Sojabohnenschalen) während parallel die Laccaseaktivität abnimmt (D'Agostini *et al.*, 2011). Dagegen haben Untersuchungen unter Verwendung von Mandarinenschalen gezeigt, dass die gleiche Spezies sehr hohe Laccase- und MnP-Aktivitäten zeigt, wobei davon ausgegangen werden kann, dass das C/N-Verhältnis größer 30 war (Mikiashvili *et al.*, 2006).

Die höchste spezifische Aktivität einer versatilen Peroxidase aus PSA lieferten C/N-Verhältnisse des Mediums von 10. Geringere spezifische Aktivitäten dieses Enzyms wurden bei der Kultivierung mit Medien der C/N-Verhältnisse von 30 und 60 erreicht (Schüttmann *et al.*, 2014).

Schlussfolgernd bedeutet dies, dass eine Optimierung des C/N-Verhältnisses zur Biomassesteigerung nicht gleichzeitig auch die optimalen Enzymaktivitäten ergibt und damit nicht zwingend die höchsten Ausbeuten an Sekundärmetaboliten gebildet werden.

Je nach Fragestellung ist somit immer eine individuelle Anpassung des C/N-Verhältnisses notwendig, was die parallele Herstellung eines Produktes für die aromaherstellende Industrie und eines Fischfuttersupplementes erschwert.

Mit Fermentation wurde das C/N-Verhältnis auf die Seite des Stickstoffs verschoben (z. B. CSSM<sub>3</sub>, 60 zu CSSM<sub>3</sub> PSA Mk 74, 20, Tabelle 68). Mit 75% sank das Verhältnis im 150 L Bioreaktor im Vergleich zum Medium am deutlichsten (CSSM<sub>4</sub> 5%, 43 *versus* CSSM<sub>4</sub> PSA Mk 37 150 L Bioreaktor, 11), was wiederum der größten Stickstoffzunahme entspricht. Die Literatur gibt für Pilzmyzel aus Basidiomyceten C/N Verhältnisse zwischen 8 und 12 an (Koide & Malcolm, 2009), wobei in der vorliegenden Studie im Fermentationsprodukt neben dem Pilz auch noch unlösliche Bestandteile des Substrates enthalten waren, was den Kohlenstoffanteil erhöht und wodurch ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Um den Trend der vegetarischen und veganen Ernährung gerecht zu werden, gab es in den letzten Jahren immer mehr wissenschaftlich basierte Studien zu Fleisch- und Wurstalternativen. Dabei waren auch Speisepilz-basierte Produkte Gegenstand der Arbeiten (Stephan *et al.*, 2018; Souza Filho *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019b).

Für eines der Erzeugnisse wurde das eingesetzte Fermentationsprodukt von PSA durch Ahlborn *et al.* (2019) hinsichtlich verschiedener Nährwerte untersucht, insbesondere auf den Proteingehalt und die Aminosäurezusammensetzung. Diese Ergebnisse liefern den besten Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit getätigten Experimenten.

Im Schüttelkolben wurde durch PSA auf Apfeltrester nach 4 Tagen ein residualer Gesamtaminosäuregehalt von  $(20,7 \pm 0,3) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  erreicht, was 6,5 g mehr als in der vorliegenden Studie mit CSSM<sub>4</sub> Mk 37 entspricht. Dieser Reinproteingehalt konnte im 150 L Fermenter um  $2,4 \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  gesteigert werden, blieb aber unterhalb des auf Apfeltrester erhalten PSA-Myzels (Ahlborn *et al.*, 2019). Bei Betrachtung der Ausgangsprodukte fiel auf, dass sich deren Reinproteingehalte voneinander unterschieden. Apfeltrester wies dabei mit  $(4,27 \pm 0,05) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  einen leicht höheren Wert auf im Vergleich zum *Citrus*-Nebenstrom mit  $(4,0 \pm 0,0) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  bzw.  $(3,64 \pm 0,0) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  für das entsprechende Medium.

Zudem müssen auch die unlöslichen Bestandteile des Substrates berücksichtigt werden, die im Fermentationsprodukt weiterhin vorhanden sind. Dabei handelt es sich vorwiegend um Ballaststoffe, deren Anteil womöglich im untersuchten Apfeltrester geringer war als im vorliegenden *Citrus*-Nebenstrom. Je nach betrachtetem Pflanzenmaterial und verwendeter Charge wird diese Vermutung durch die Literatur bestätigt (Granucci *et al.*, 2023).

In der Literatur werden für Orangennebenprodukte Proteingehalte von  $(3,8 - 4,7) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$  angegeben (Mantzouridou & Paraskevopoulou, 2013; Mantzouridou *et al.*, 2015; Granucci, 2018; Lindsay *et al.*, 2022; Granucci *et al.*, 2023). Dabei wird der übliche Stickstoff-zu-Protein-Faktor von 6,25 zugrunde gelegt. Aus der Umrechnung folgen somit Stickstoffgehalte zwischen  $(0,61 \text{ und } 0,75) \text{ g (100 g TM)}^{-1}$ . Mittels Kjeldahl-Bestimmung wurde ein Wert von  $(1,06 \pm 0,01) \text{ g Stickstoff (100 TM)}^{-1}$  für CSS<sub>4</sub> erzielt, welcher leicht höher als die Vergleichswerte lag.

Die biologische Wertigkeit wurde vom Nebenstrom (BW von 87) bzw. vom eingesetzten Medium (BW von 68) hin zum proteinreichen Endprodukt im Pilotmaßstab gesteigert und mit 89 lag sie damit oberhalb des auf Basis von Apfeltrester hergestellten Produktes (Ahlborn *et al.*, 2019). Bei dem im 7,5 L Bioreaktor gefahrenen Ansatz wurde mit einer biologischen Wertigkeit von 93 ein noch höherer Wert erzielt, wodurch das Optimierungspotential des Prozesses deutlich wird. Ein ähnlicher Verlauf war für den EAAI zu beobachten, welcher mit 96 ebenfalls auf der Fermentationsstufe des 7,5 L Fermenters das Maximum erreichte. Auch der bedeutendste Wert zur Beurteilung der Proteinqualität, der CS, zeigte den höchsten Durchschnitt für die relevanten Aminosäuren im Pilzmyzel aus der ersten

Maßstabsvergrößerung. Die insgesamt hohen Werte verdeutlichen die sehr gute Proteinqualität bezogen auf die menschliche Ernährung.

Neben diesem Einsatz ist jedoch auch die Verwendung solcher Proteinquellen in der Tierernährung denkbar. *Citrustrester* als solche sind laut Teil C des Anhangs der Verordnung (EU) Nr. 68/2013 als Einzelfuttermittel zugelassen. Im Teilprojekt eines argentinischen Kooperationspartner sollten Fischfutterstudien durchgeführt werden. Allerdings genügt der hier bestimmte Stickstoffgehalt von 1% im CSS nicht einer angemessenen Ernährung dieser Tiere. Durch Fermentation kann der Proteingehalt enorm gesteigert werden, was in den vorliegenden Studien deutlich wurde und dadurch können andere zusätzliche Proteinquellen reduziert oder ersetzt werden. Die am weitesten verbreitete Proteinquelle in der Aquakultur ist Fischmehl mit ca. 65% Rohproteinanteil (Tacon & Metian, 2008). Dieser sehr hohe Anteil wird mit dem bisher entwickelten Fermentationsprodukt nicht erreicht, sodass dieses für diesen Anwendungsbereich weiterhin optimiert bzw. durch weitere Proteinquellen ergänzt werden muss.

Neben dem Proteingehalt spielt die Zusammensetzung der Aminosäuren eine bedeutende Rolle. Die Präsenz von Prolin als Hauptaminosäure im CSS (3.2.4.1) deckt sich mit den Literaturangaben (Park *et al.*, 2020; Granucci *et al.*, 2023). Dabei können die Gehalte relativ stark schwanken, da sich umwelt- und klimatisch bedingte Stressfaktoren unmittelbar auf die Konzentration dieser Aminosäure auswirken (Syvertsen & Smith, 1983; Szabados & Savouré, 2010). Absolut betrachtet blieb der Gehalt an Prolin zum Fermentationsprodukt relativ konstant (Abbildung 3), was Studien von Granucci (2018) zur Kultivierung der Hefe *Brettanomyces bruxellensis* unter Verwendung von Orangentrester, sowohl als SmF als auch als SSF, gleichermaßen gezeigt haben.

Für die Aquakultur relevant sind insbesondere die Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin (D'Mello, 2003; Karimi *et al.*, 2019). Mit einem Anteil von 8,2% des Gesamtaminosäuregehaltes spielt Lysin dabei die Hauptrolle im Fischmehl, dem bedeutendsten Futtermittel für die Fischzucht. Während in dem hier eingesetzten Nebenstrom CSS<sub>4</sub> der Lysinanteil bei (6,67 ± 0,01)% lag, machte diese AS im Endprodukt des skalierten Ansatzes nur noch (5,28 ± 0,01)% aus (Abbildung 3). Die Arbeitsgruppe um Karimi hat verschiedene Asco- und Zygomyceten auf Vinasse kultiviert und hinsichtlich der Eignung als Fischfutter untersucht. Mit *Aspergillus oryzae*, *Neurospora intermedia* und *Rizhopus oryzae* wurden dabei Lysingehalte zwischen 6,91% und 7,39% des Gesamtaminosäureanteils erreicht (Karimi *et al.*, 2019).

In unserer Studie fiel vor allem der Anstieg des Histidins vom Rohprodukt mit 3,67% hin zum fermentierten CSS<sub>4</sub> mit 12,91% des Gesamtaminosäureanteils auf (3.2.4.1). Während mit den Asco- und Zycomyceten nur Anteile von bis zu 2,57% dieser Aminosäure erreicht wurden (Karimi *et al.*, 2019), zeigte bereits die Studie mit PSA kultiviert auf Apfeltrester einen prozentualen Anteil von 10,19%

(Ahlborn *et al.*, 2019). Manzi *et al.* (1999) analysierten die Nährwerte verschiedener *Pleurotus* Spezies und bestimmten deutlich niedrigere Histidinanteile zwischen 3,16% (*P. eryngii*) und 4,26% (*P. ostreatus*). Allerdings wurden dabei Fruchtkörper nach der Ernte untersucht, was einen direkten Vergleich nicht zulässt. Einen leicht niedrigeren Wert von 2,76% erzielten Guo *et al.* bei der Analyse von Fruchtkörpern des PSA (Guo *et al.*, 2007). Neben dem Wachstumsstadium, in dem sich der Pilz befindet, wird die Histidinbildung möglicherweise auch unmittelbar durch die Substratzusammensetzung hervorgerufen. Untersuchungen zur SSF von schwarzen Bohnen, Kidneybohnen und Hafer mit *P. ostreatus* zeigten jeweils eine Abnahme des Histidingehaltes (Espinosa-Páez *et al.*, 2017) während die Fermentation von Orangentrester durch *P. pulmonarius* eine deutliche Zunahme zeigte (Granucci, 2018).

Um die Analyse der Hauptnährstoffe zu vervollständigen, wurde die Fettsäurezusammensetzung untersucht. Bei Betrachtung verschiedener *Pleurotus* Spezies war mit Ausnahme von *P. eryngii* Linolsäure mit Anteilen zwischen 33,3% (*P. cystidiosus*) und 68,5% (*P. cornucopiae*) stets die Hauptfettsäure (Dimou *et al.*, 2002). Dies deckt sich mit dem Wert der hier vorliegenden Studie (47,3%, Tabelle 57), was durch Omarini *et al.* (2019) mit einem Wert von 39,1% bestätigt wird.

Bei *P. eryngii* dominiert mit 46,9% Ölsäure (C18:1) das Profil, welches bei den Untersuchungen zu PSA die Fettsäure mit dem zweithöchsten Anteil war (17,6%).

Neben anderen üblichen Fettsäuren wie Palmitin- und Stearinsäure wird in der Literatur auch von Pentacosansäure (C25:0), Pentacosensäure (C25:1), Hexacosansäure (C26:0) und Hexacosensäure (C26:1) in Pleuroten berichtet, während im PSA-Fermentationsprodukt außer den genannten auch  $\alpha$ -Linolensäure und Tetracosansäure (C24:0) detektiert wurde (Tabelle 57), die auch von Omarini *et al.* im PSA beschrieben wurden (Dimou *et al.*, 2002; Omarini *et al.*, 2019).

Diamantopoulou *et al.* (2014) haben gezeigt, dass sich die Anteile der Fettsäuren innerhalb des Kultivierungszeitraumes verschieben können, wobei die Hauptfettsäure bei *P. pulmonarius* zwischen Tag 8 und Tag 20 stets Linolsäure war. Damit ist das hier gezeigte Fettsäureprofil des Fermentationsproduktes zwar eine Momentaufnahme charakterisiert aber im Großen und Ganzen dennoch den Pilz an sich hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung.

#### 4.7 Maßstabsvergrößerung

Wie aus dem vorherigen Abschnitt hervorgegangen ist, besteht bei der Maßstabsvergrößerung noch Optimierungspotential. Die Übertragung des Fermentationsprozesses vom Schüttelkolben auf den 7,5-L-Bioreaktor wurde bereits so weiterentwickelt, dass die Proteinqualität gesteigert wurde. Dabei musste der Anteil des Nebenstroms reduziert werden, da der Organismus bei dem ursprünglich berechneten Gehalt kein Wachstum zeigte. Dies ist mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf den Terpenegehalt der Orangenschalen und der damit verbundenen Toxizität für den Pilz zurückzuführen, wie es anhand von Limonen bereits in der Literatur gezeigt wurde (Onken & Berger, 1999). Der intensive Geruch nach Anis und Waldmeister, wie er aus den Kulturen der Schüttelkolben bekannt war, war jedoch auch bei dem optimiertem Fermentationsprozess nicht wahrnehmbar. Dies zeigt, dass auch auf dieser Fermentationsstufe noch Verbesserungspotential vorliegt, insbesondere was die Aromabildung angeht. Mit dem Ziel, den Projektpartnern Mycoprotein für Fütterungsstudien zur Verfügung zu stellen, wurden nichtsdestotrotz die angewendeten Parameter auf den Pilotmaßstab übertragen, was jedoch nicht zu einem gleichwertigen Fermentationsprodukt führte. Bereits bei der Optimierung im 7,5-L-Fermenter wurde insbesondere der Zeitaufwand und damit einhergehend auch der Bedarf sonstiger Ressourcen, wie Ausgangsprodukte, Energie usw. deutlich. Grund dafür sind die zahlreichen Einflussfaktoren wie Sauerstoffeintrag, pH-Wert, Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Scherkräfte und Licht (Rigling *et al.*, 2022). Ein Lösungsansatz um den Aufwand zu reduzieren, ist die Anwendung statistischer Methoden wie *Design of Experiments* anstelle der gängigen *one variable at a time* Methodik (Mandenius & Brundin, 2008).

Nach momentanem Kenntnisstand wurden verschiedenste Fermentationen mittels Basidiomycota zur Bildung interessanter Aromen im Schüttelkolben entwickelt, wobei eine industrielle Applikation noch nicht erfolgte. Ein besonders kritischer Parameter bei der Übertragung der Aromagenerierung vom Kolben in den Bioreaktor ist die Belüftung respektive der Sauerstoffeintrag. Während im Kolben in aller Regel Luft nur durch den Cellulosestopfen eindringt, erfolgt im Fermenter eine aktive Luftzufuhr, womit auch ein Teil der Aromastoffe ausgetrieben wird.

Da eine Kontrolle des Fermentationsprozesses online nur durch Aufzeichnung des pH-Wertes und des partiell gelösten Sauerstoffs erfolgte, ist die Bildung der gewünschten Aromastoffe nur schwer ablesbar. Regelmäßige Probenahme und gaschromatographische Analysen sind zeitaufwändig und eine zeitnahe Steuerung ist so kaum möglich. Damit ist die Entwicklung eines geeigneten Monitoringsystems der Schlüsselaromastoffe für eine erfolgreiche Prozessführung mit einem Produkt gleicher Qualität unabdingbar. Lösungsansätze bieten dafür beispielsweise Systeme basierend auf einer elektronischen Nase (Sharmilan *et al.*, 2020; Demarigny *et al.*, 2021), *proton transfer reaction mass spectrometry* (PTR-MS) (Boschetti *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2021) oder die *soft ionization by chemical reaction in transfer* (SICRIT) Technologie (Thaler *et al.*, 2021; Zeng *et al.*, 2022).

## 5 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit wurden 60 monokaryotische und zwei dikaryotische Stämme von PSA auf *Citrus*-Nebenströmen kultiviert und hinsichtlich des Gesamtaromaeindrucks gescreent, wovon Mk 37 näher untersucht wurde. Da es noch weitere interessante Stämme gab, wäre eine detaillierte Analyse und der Vergleich untereinander ein Ansatz für fortführende Forschungsarbeiten. Insbesondere Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene und die Nutzung bioinformatischer Methoden, wie Transkriptomanalysen, haben großes Potential für genaue Erkenntnisse über die Biosynthesewege charakteristischer Aromastoffe des Pilzes.

Um die Hinweise auf das Vorhandensein einer *O*-Methyltransferase zur Bildung von *p*-Anisaldehyd zu stützen, sollte das Gen des Biokatalysators in einem geeigneten Organismus heterolog exprimiert werden. Nach Reinigung des Enzyms wäre dann eine biochemische Charakterisierung möglich. Erste Ergebnisse, die diesen Ansatz verfolgten, wurden in fortführenden Studien innerhalb der Arbeitsgruppe bereits erzielt und als Patent eingereicht (Brescia *et al.*, 2022).

Auch die Genese des *p*-Anisaldehyds aus Dihydroanisoin könnte weiterverfolgt werden. In einem ersten Schritt wären Supplementierungsstudien mit diesem möglichen Präkursor denkbar. Unter Verwendung der isopenmarkierten Substanz wäre eindeutig nachvollziehbar, inwiefern PSA über eine postulierte Ligninperoxidase verfügt um die vicinale Diolbindung zu spalten.

Da die vorliegende Arbeit auch verschiedene Biosynthesemöglichkeiten für 2-HPP aufgezeigt hat, wären auch hier tiefergehende Untersuchungen möglich. Hilfreich dafür wären in jedem Fall die bereits vorgeschlagenen Transkriptomanalysen, da sie Hinweise auf vorliegende Enzyme verfestigen oder entkräften könnte.

Isolierte Enzyme aus PSA oder entsprechend rekombinant erzeugte, könnten möglicherweise für die Herstellung weiterer Aromastoffe interessant sein. Insbesondere die Gruppe der  $\alpha$ -Hydroxyketone sind hinsichtlich ihres Potentials als Aromastoffe wenig untersucht und könnten Gegenstand zukünftiger systematischer Forschungsarbeiten sein.

Um den Prozess im Pilotmaßstab weiter zu optimieren, könnte im nächsten Schritt das Fed-Batch-Verfahren angewendet werden, indem zunächst nur ein Teil des Substrates eingesetzt wird und im Laufe der Kultivierung Substrat supplementiert wird. Mit diesem Ansatz wurde bei Ahlborn *et al.*

hinsichtlich der Biomasseproduktion von PSA auf Apfeltrester gute Erfolge erzielt (Ahlborn *et al.*, 2019). Daneben könnte es sich möglicherweise auch positiv auf das Gesamtaroma auswirken.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abraham B.G. & Berger R.G. (1994) Higher Fungi for Generating Aroma Components through Novel Biotechnologies. *Journal of agricultural and food chemistry*, **42**, 2344–2348. DOI: 10.1021/jf00046a050.
- Addleman K. & Archibald F. (1993) Kraft Pulp Bleaching and Delignification by Dikaryons and Monokaryons of *Trametes versicolor*. *Applied and environmental microbiology*, **59**, 266–273. DOI: 10.1128/aem.59.1.266-273.1993.
- Afifi S.M., El-Mahis A., Heiss A.G. & Farag M.A. (2021) Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Classification of 12 Fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) Varieties Based on Their Aroma Profiles and Estragole Levels as Analyzed Using Chemometric Tools. *ACS omega*, **6**, 5775–5785. DOI: 10.1021/acsomega.0c06188.
- Ahlborn J., Stephan A., Meckel T., Maheshwari G., Rühl M. & Zorn H. (2019) Upcycling of food industry side streams by basidiomycetes for production of a vegan protein source. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, **8**, 447–455. DOI: 10.1007/s40093-019-00317-4.
- Aime M.C., Toome M. & McLaughlin D.J. (2014) 10 Pucciniomycotina. In: *Systematics and Evolution* (ed. by D.J. McLaughlin & J.W. Spatafora), pp. 271–294. Springer Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Albornoz S., Wyman V., Palma C. & Carvajal A. (2018) Understanding of the contribution of the fungal treatment conditions in a wheat straw biorefinery that produces enzymes and biogas. *Biochemical Engineering Journal*, **140**, 140–147. DOI: 10.1016/j.bej.2018.09.011.
- Anderson N.A., Furnier G.R., Wang A.S. & Schwandt J.W. (1991) The number and distribution of incompatibility factors in natural populations of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sapidus*. *Canadian Journal of Botany*, **69**, 2187–2191. DOI: 10.1139/b91-274.
- Anderson N.A., Wang S.S. & Schwandt J.W. (1973) The *Pleurotus Ostreatus-Sapidus* Species Complex. *Mycologia*, **65**, 28–35. DOI: 10.1080/00275514.1973.12019401.
- Aurore G., Ginies C., Ganou-parfait B., Renard C.M. & Fahrasmane L. (2011) Comparative study of free and glycoconjugated volatile compounds of three banana cultivars from French West Indies: Cavendish, Frayssinette and Plantain. *Food Chemistry*, **129**, 28–34. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.104.
- Awan A.T., Tsukamoto J. & Tasic L. (2013) Orange waste as a biomass for 2G-ethanol production using low cost enzymes and co-culture fermentation. *RSC Advances*, **3**, 25071. DOI: 10.1039/C3RA43722A.

- Ayer W.A. & Singer P.P. (1980) Phenolic metabolites of the bird's nest fungus *Nidula niveo-tomentosa*. *Phytochemistry*, **19**, 2717–2721. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)83949-7.
- Baltussen E., Cramers C.A. & Sandra P.J.F. (2002) Sorptive sample preparation -- a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **373**, 3–22. DOI: 10.1007/s00216-002-1266-2.
- Banik S. & Nandi R. (2004) Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom. *Industrial Crops and Products*, **20**, 311–319. DOI: 10.1016/j.indcrop.2003.11.003.
- Beck H.C. (1997) Biosynthetic Pathway for Halogenated Methoxybenzaldehydes in the White Rot Fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters*, **149**, 233–238. DOI: 10.1016/S0378-1097(97)00081-5.
- Beck H.C., Lauritsen F.R., Patrick J.S. & Cooks R.G. (1996) Metabolism of Halogenated Compounds in the White Rot Fungus *Bjerkandera adusta* Studied by Membrane Inlet Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *Biotechnology and Bioengineering*, **51**, 23–32. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960705)51:1<23::AID-BIT3>3.3.CO;2-W.
- Becker U., Anke T. & Sterner O. (1994) A Novel Bioactive Illudalane Sesquiterpene from the Fungus *Pholiota destruens*. *Natural Product Letters*, **5**, 171–174. DOI: 10.1080/10575639408044054.
- Beisl S., Quehenberger J., Kamravamanesh D., Spadiut O. & Friedl A. (2019) Exploitation of Wheat Straw Biorefinery Side Streams as Sustainable Substrates for Microorganisms: A Feasibility Study. *Processes*, **7**, 956. DOI: 10.3390/pr7120956.
- Belletti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R. & Gardini F. (2004) Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **52**, 6932–6938. DOI: 10.1021/jf049444v.
- Belousova N.I., Tkachev A.V., Shakirov M.M. & Khan V.A. (1991) New terpenoids of the essential oil of *Ledum palustre*. *Chemistry of Natural Compounds*, **27**, 20–24. DOI: 10.1007/bf00629824.
- Berger R.G., Böker A., Fischer M. & Taubert J. (1999) Microbial Flavors. In: *Flavor Chemistry* (ed. by R. Teranishi, E.L. Wick & I. Hornstein), pp. 229–238. Springer US, Springer US.
- Berger R.G., Neuhaeuser K. & Drawert F. (1987) Biotechnological production of flavor compounds: III. High productivity fermentation of volatile flavors using a strain of *Ischnoderma Benzoinum*. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**, 987–990. DOI: 10.1002/bit.260300811.
- Berger R.G., Neuhäuser K. & Drawert F. (1986) Characterization of the odour principles of some basidiomycetes: *Bjerkandera adusta*, *Poria aurea*, *Tyromyces sambuceus*. *Flavour and Fragrance Journal*, **1**, 181–185. DOI: 10.1002/ffj.2730010410.
- Bilal M. & Asgher M. (2016) Biodegradation of Agrowastes by Lignocellulolytic Activity of an Oyster Mushroom, *Pleurotus sapidus*. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, **44**, 399. DOI: 10.4038/jnsfsr.v44i4.8022.

- Bisaria R., Madan M. & Bisaria V.S. (1987) Biological efficiency and nutritive value of *Pleurotus sajor-caju* cultivated on different agro-wastes. *Biological Wastes*, **19**, 239–255. DOI: 10.1016/0269-7483(87)90058-9.
- Blanch G.P. & Nicholson G.J. (1998) Determination of the Enantiomeric Composition of Limonene and Limonene-1,2-epoxide in Lemon Peel by Multidimensional Gas Chromatography with Flame-Ionization Detection and Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, **36**, 37–43. DOI: 10.1093/chromsci/36.1.37.
- Böker A., Fischer M. & Berger R.G. (2001) Raspberry ketone from submerged cultured cells of the basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa*. *Biotechnology progress*, **17**, 568–572. DOI: 10.1021/bp010011b.
- Boluda-Aguilar M. & López-Gómez A. (2013) Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, **41**, 188–197. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.04.031.
- Bornemann S., Crout D.H.G., Dalton H., Kren V., Lobell M., Dean G., Thomson N. & Turner M.M. (1996) Stereospecific formation of *R*-aromatic acylloins by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 425. DOI: 10.1039/p19960000425.
- Boschetti A., Biasioli F., van Opbergen M., Warneke C., Jordan A., Holzinger R., Prazeller P., Karl T., Hansel A., Lindinger W. & Iannotta S. (1999) PTR-MS real time monitoring of the emission of volatile organic compounds during postharvest aging of berryfruit. *Postharvest Biology and Technology*, **17**, 143–151. DOI: 10.1016/S0925-5214(99)00052-6.
- Bosse A.K., Fraatz M.A. & Zorn H. (2013) Formation of Complex Natural Flavours by Biotransformation of Apple Pomace with Basidiomycetes. *Food Chemistry*, **141**, 2952–2959. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.116.
- Bourbonnais R. & Paice M.G. (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochemical Journal*, **255**, 445–450. DOI: 10.1042/bj2550445.
- Brambilla U., Nasini G. & Pava O.V. de (1995) Secondary Mold Metabolites, Part 49. Isolation, Structural Elucidation, and Biomimetic Synthesis of Trametol, a New 1-Arylpropane-1,2-diol Produced by the Fungus *Trametes* sp. *Journal of Natural Products*, **58**, 1251–1253. DOI: 10.1021/np50122a016.
- Brauns F.E. (1952) *The chemistry of lignin*. Academic Press Inc., New York.
- Brescia F., Rühl M. & Zorn H. (2022) *Entdeckung einer neuartigen O-Methyltransferase aus Pleurotus sapidus und Anwendung zur Gewinnung von Aromastoffen*.
- Brescia F.F., Pitelas W., Yalman S., Popa F., Hausmann H.G., Wende R.C., Fraatz M.A. & Zorn H. (2021) Formation of Diastereomeric Dihydromenthofurolactones by *Cystostereum murrayi* and Aroma

- Dilution Analysis Based on Dynamic Headspace Extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, **69**, 5997–6004. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c01478.
- Bringer-Meyer S. & Sahm H. (1988) Acetoin and Phenylacetylcarbinol Formation by the Pyruvate Decarboxylases of *Zymomonas Mobilis* and *Saccharomyces Carlsbergensis* Stephanie Bringer-Meyer. *Biocatalysis*, **1**, 321–331. DOI: 10.3109/10242428808998172.
- Broeckx L., Frootinckx L., Slegers L., Berrens S., Noyens I., Goossens S., Verheyen G., Wuyts A. & van Miert S. (2021) Growth of Black Soldier Fly Larvae Reared on Organic Side-Streams. *Sustainability*, **13**, 12953. DOI: 10.3390/su132312953.
- Brown A.J. & Casselton L.A. (2001) Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair. *Trends in Genetics*, **17**, 393–400. DOI: 10.1016/S0168-9525(01)02343-5.
- Brunschwig C., Senger-Emonnot P., Aubanel M.-L., Pierrat A., George G., Rochard S. & Raharivelomanana P. (2012) Odor-Active Compounds of Tahitian Vanilla Flavor. *Food Research International*, **46**, 148–157. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.12.006.
- Busmann D. & Berger R.G. (1994) Conversion of Myrcene by Submerged Cultured Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, **37**, 39–43. DOI: 10.1016/0168-1656(94)90200-3.
- Buswell J.A., Odier E. & Kirk T.K. (1987) Lignin Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*, **6**, 1–60. DOI: 10.3109/07388558709086984.
- Camarero S., Bockle B., Martinez M.J. & Martinez A.T. (1996) Manganese-Mediated Lignin Degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and environmental microbiology*, **62**, 1070–1072. DOI: 10.1128/aem.62.3.1070-1072.1996.
- Cannon R.J., Kazimierski A., Curto N.L., Li J., Trinnaman L., Jańczuk A.J., Agyemang D., Da Costa N.C. & Chen M.Z. (2015) Identification, Synthesis, and Characterization of Novel Sulfur-Containing Volatile Compounds from the In-Depth Analysis of Lisbon Lemon Peels (*Citrus limon* L. Burm. f. cv. Lisbon). *Journal of agricultural and food chemistry*, **63**, 1915–1931. DOI: 10.1021/jf505177r.
- Caplice E. & Fitzgerald G.F. (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **50**, 131–149. DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3.
- Casado López S., Theelen B., Manserra S., Issak T.Y., Rytioja J., Mäkelä M.R. & Vries R.P. de (2017) Functional diversity in *Dichomitus squalens* monokaryons. *IMA fungus*, **8**, 17–25. DOI: 10.5598/ima fungus.2017.08.01.02.
- Casselton L.A. & Kües U. (1994) Mating-Type Genes in Homobasidiomycetes. In: *Growth, Differentiation and Sexuality* (ed. by J.G.H. Wessels & F. Meinhardt), pp. 307–321. Springer Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.

- Casselton L.A. & Olesnicky N.S. (1998) Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **62**, 55–70. DOI: 10.1128/MMBR.62.1.55-70.1998.
- Chamblee T.S., Clark B.C., Jr., Brewster G.B., Radford T. & Iacobucci G.A. (1991) Quantitative Analysis of the Volatile Constituents of Lemon Peel Oil. Effects of Silica Gel Chromatography on the Composition of its Hydrocarbon and Oxygenated Fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, **39**, 162–169. DOI: 10.1021/jf00001a032.
- Chaplin M.F. & Kennedy J.F., editors (1994) *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Cheigh H.S. & Park K.Y. (1994) Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Critical reviews in food science and nutrition*, **34**, 175–203. DOI: 10.1080/10408399409527656.
- Chen G.C. & Jordan F. (1984) Brewers' yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss. *Biochemistry*, **23**, 3576–3582. DOI: 10.1021/bi00311a002.
- Choi H.S., Kondo Y. & Sawamura M. (2001) Characterization of the Odor-Active Volatiles in Citrus Hyuganatsu (*Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka). *Journal of agricultural and food chemistry*, **49**, 2404–2408. DOI: 10.1021/jf001467w.
- Choi I.S., Lee Y.G., Khanal S.K., Park B.J. & Bae H.-J. (2015) A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Applied Energy*, **140**, 65–74. DOI: 10.1016/j.apenergy.2014.11.070.
- Chyau C.-C., Ko P.-T., Chang C.-H. & Mau J.-L. (2003) Free and glycosidically bound aroma compounds in lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Food Chemistry*, **80**, 387–392. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00278-9.
- Clark T.A. & Anderson J.B. (2004) Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: evolution in long-term culture. *Genetics*, **167**, 1663–1675. DOI: 10.1534/genetics.104.027235.
- Coelho M.A., Bakkeren G., Sun S., Hood M.E. & Giraud T. (2017) Fungal Sex: The Basidiomycota. *Microbiology spectrum*, **5**. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016.
- Cohen R., Persky L. & Hadar Y. (2002) Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied microbiology and biotechnology*, **58**, 582–594. DOI: 10.1007/s00253-002-0930-y.
- Collin G. (2015) Aromas from Quebec. IV. Chemical composition of the essential oil of *Ledum groenlandicum*: A review. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, **2**, 6–11.
- Coulter C., Hamilton J.T. & Harper D.B. (1993a) Evidence for the existence of independent chloromethane- and S-adenosylmethionine-utilizing systems for methylation in *Phanerochaete*

- chryso sporium. *Applied and environmental microbiology*, **59**, 1461–1466. DOI: 10.1128/aem.59.5.1461-1466.1993.
- Coulter C., Kennedy J.T., McRoberts W.C. & Harper D.B. (1993b) Purification and Properties of an S-Adenosylmethionine: 2,4-Disubstituted Phenol O-Methyltransferase from *Phanerochaete chryso sporium*. *Applied and environmental microbiology*, **59**, 706–711. DOI: 10.1128/aem.59.3.706-711.1993.
- Crout D.H.G., Dalton H., Hutchinson D.W. & Miyagoshi M. (1991) Studies on Pyruvate Decarboxylase: Acyloin Formation from Aliphatic, Aromatic and Heterocyclic Aldehydes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, 1329–1334.
- D'Agostini É.C., Mantovani T.R.D., Valle J.S.d., Paccola-Meirelles L.D., Colauto N.B. & Linde G.A. (2011) Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola*, **68**, 295–300. DOI: 10.1590/S0103-90162011000300004.
- Darwish G.A., Bakr A.A. & Abdallah M. (2012) Nutritional value upgrading of maize stalk by using *Pleurotus ostreatus* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. *Annals of Agricultural Sciences*, **57**, 47–51. DOI: 10.1016/j.aos.2012.03.005.
- de Jong E., Cazemier A.E., Field J.A. & de Bont J.A.M. (1994a) Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied and environmental microbiology*, **60**, 271–277. DOI: 10.1128/aem.60.1.271-277.1994.
- de Jong E., Field J.A. & de Bont J.A. (1994b) Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**, 153–188. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00041.x.
- de Jong E., Field J.A., Dings J.A.F.M., Wijnberg J.B.P.A. & de Bont J.A.M. (1992) De-novo biosynthesis of chlorinated aromatics by the whiterot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55: Formation of 3-chloro-anisaldehyde from glucose. *FEBS Letters*, **305**, 220–224. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80672-4.
- Del Vecchio C., Lettera V., Pezzella C., Piscitelli A., Leo G., Birolo L. & Sannia G. (2012) Classical breeding in *Pleurotus ostreatus*: a natural approach for laccase production improvement. *Biocatalysis and Biotransformation*, **30**, 78–85. DOI: 10.3109/10242422.2012.646032.
- Demarigny Y., Legrand E., Sanchez J., Hallier A., Laurent N., Slimani S., Livache T. & Picque D. (2021) Utilisation of a Portable Electronic Nose, NeOse Pro, to Follow the Microbial Fermentation of a Yoghurt. *Food and Nutrition Sciences*, **12**, 90–105. DOI: 10.4236/fns.2021.121008.
- Demir A.S., Ayhan P. & Sopaci S.B. (2007) Thiamine Pyrophosphate Dependent Enzyme Catalyzed Reactions: Stereoselective C–C Bond Formations in Water. *CLEAN – Soil, Air, Water*, **35**, 406–412. DOI: 10.1002/clen.200720003.
- Demir A.S., Şeşenoglu Ö., Eren E., Hosrik B., Pohl M., Janzen E., Kolter D., Feldmann R., Dünkemann P. & Müller M. (2002) Enantioselective Synthesis of  $\alpha$ -Hydroxy Ketones via Benzaldehyde Lyase-

- Catalyzed C-C Bond Formation Reaction. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **344**, 96–103. DOI: 10.1002/1615-4169(200201)344:1<96::AID-ADSC96>3.0.CO;2-Z.
- Dervisoglu M. & Yazici F. (2006) Note. The Effect of Citrus Fibre on the Physical, Chemical and Sensory Properties of Ice Cream. *Food Science and Technology International*, **12**, 159–164. DOI: 10.1177/1082013206064005.
- Dess D.B. & Martin J.C. (1983) Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones. *The Journal of organic chemistry*, **48**, 4155–4156. DOI: 10.1021/jo00170a070.
- Dharmawan J., Kasapis S., Curran P. & Johnson J.R. (2007) Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: freshly-squeezed juice. *Flavour and Fragrance Journal*, **22**, 228–232. DOI: 10.1002/ffj.1790.
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G. & Philippoussis A. (2014) Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess and biosystems engineering*, **37**, 1385–1400. DOI: 10.1007/s00449-013-1112-2.
- Díaz-Maroto M.C., Díaz-Maroto Hidalgo I.J., Sánchez-Palomo E. & Pérez-Coello M.S. (2005) Volatile Components and Key Odorants of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oil Extracts Obtained by Simultaneous Distillation–Extraction and Supercritical Fluid Extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53**, 5385–5389. DOI: 10.1021/jf050340+.
- Dimou D.M., Georgala A., Komaitis M. & Aggelis G. (2002) Mycelial fatty acid composition of *Pleurotus* spp. and its application in the intrageneric differentiation. *Mycological Research*, **106**, 925–929. DOI: 10.1017/S0953756202006184.
- Dirscherl W. (1931a) Mechanismus und Kinetik der Acyloinbildung bei der Gärung. 3. Mitteilung über Acyloine. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **201**, 47–77. DOI: 10.1515/bchm2.1931.201.1-2.47.
- Dirscherl W. (1931b) Nichtfermentative Acetoinbildung und das Problem der „Carboligase“. 4. Mitteilung über Acyloine. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **201**, 78–104. DOI: 10.1515/bchm2.1931.201.1-2.78.
- D'Mello J., editor (2003) *Amino Acids in Animal Nutrition*. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA, Wallingford, UK.
- Doroški A., Klaus A., Režek Jambrak A. & Djekic I. (2022) Food Waste Originated Material as an Alternative Substrate Used for the Cultivation of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*): A Review. *Sustainability*, **14**, 12509. DOI: 10.3390/su141912509.
- dos Santos Bazanella G.C., Souza D.F. de, Castoldi R., Oliveira R.F., Bracht A. & Peralta R.M. (2013) Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures

- and application in dye decolorization. *Folia microbiologica*, **58**, 641–647. DOI: 10.1007/s12223-013-0253-7.
- Drawert F., Berger R.G. & Neuhäuser K. (1983) Biosynthesis of Flavor Compounds by Microorganisms 4. Characterization of the Major Principles of the Odor of *Pleurotus euosmus*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **18**, 124–127. DOI: 10.1007/BF00500836.
- Dumont B., Hugueny P. & Belin J.-M. (1996) Production par bioconversion de cétone framboise.
- Dundar A., Acay H. & Yildiz A. (2009) Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. on mushroom yield, chemical composition and nutritional value. *African Journal of Biotechnology*, **8**, 662–666.
- Dünnwald T., Demir A.S., Siegert P., Pohl M. & Müller M. (2000) Enantioselective Synthesis of (S)-2-Hydroxypropanone Derivatives by Benzoylformate Decarboxylase Catalyzed C-C Bond Formation. *European Journal of Organic Chemistry*, 2161–2170. DOI: 10.1002/1099-0690(200006)2000:11<2161::AID-EJOC2161>3.0.CO;2-6.
- Eggert C., Temp U. & Eriksson K.E. (1996) The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and environmental microbiology*, **62**, 1151–1158. DOI: 10.1128/aem.62.4.1151-1158.1996.
- Eichlerová I. & Homolka L. (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**, 321–327. DOI: 10.1023/A:1001813603115.
- El-Gengaihi S.E., Mohammed M.A., Aboubaker D.H., Shoaib R.M., Asker M.S., Abdelhamid S.A. & Hassan E.M. (2020) Chemical, Biological and Molecular Studies on Different *Citrus* Species Wastes. *Plant Archives*, **20**, 2773–2782.
- Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Asatiani M. & Kvesitadze G. (2006) Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 998–1004. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.08.033.
- Elisashvili V., Penninckx M., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Metreveli E., Kharziani T. & Kvesitadze G. (2008) *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource technology*, **99**, 457–462. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.011.
- Engel W., Bahr W. & Schieberle P. (1999) Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *European Food Research and Technology*, **209**, 237–241. DOI: 10.1007/s002170050486.

- Erasto P. & Viljoen A.M. (2008) Limonene - a Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance. *Natural Product Communications*, **3**, 1934578X0800300. DOI: 10.1177/1934578X0800300728.
- Espejo E., Agosin E. & Vicuña R. (1990) Catabolism of 1,2-diarylethane lignin model compounds by two brown-rot fungi. *Archives of Microbiology*, **154**, 370–374. DOI: 10.1007/BF00276533.
- Espinosa-Páez E., Alanis-Guzmán M.G., Hernández-Luna C.E., Báez-González J.G., Amaya-Guerra C.A. & Andrés-Grau A.M. (2017) Increasing Antioxidant Activity and Protein Digestibility in Phaseolus vulgaris and Avena sativa by Fermentation with the Pleurotus ostreatus Fungus. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **22**. DOI: 10.3390/molecules22122275.
- Esser K. & Meinhardt F. (1977) A common genetic control of dikaryotic and monokaryotic fruiting in the basidiomycete Agrocybe aegerita. *Molecular and General Genetics MGG*, **155**, 113–115. DOI: 10.1007/BF00268568.
- Esser K., Saleh F. & Meinhardt F. (1979) Genetics of fruit body production in higher basidiomycetes II. Monokaryotic and dikaryotic fruiting in schizophyllum commune. *Current genetics*, **1**, 85–88. DOI: 10.1007/BF00413309.
- Esser K., Semerdžieva M. & Stahl U. (1974) Genetische Untersuchungen an dem Basidiomyceten Agrocybe aegerita : I. Eine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Fruchtkörperbildung und monokaryotischem Fruchten und ihre Bedeutung für Züchtung und Morphogenese. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, **45**, 77–85. DOI: 10.1007/BF00283480.
- Eugenio C.P. & Anderson N.A. (1968) The Genetics and Cultivation of Pleurotus Ostreatus. *Mycologia*, **60**, 627–634. DOI: 10.1080/00275514.1968.12018612.
- Falconnier B., Lapierre C., Lesage-Meessen L., Yonnet G., Brunerie P., Colonna-Ceccaldi B., Corrieu G. & Asther M. (1994) Vanillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus Pycnoporus cinnabarinus I-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology*, **37**, 123–132. DOI: 10.1016/0168-1656(94)90003-5.
- Fan L., Pandey A., Mohan R. & Soccol C.R. (2000) Use of various coffee industry residues for the cultivation of Pleurotus ostreatus in solid state fermentation. *Acta Biotechnologica*, **20**, 41–52. DOI: 10.1002/abio.370200108.
- Farinas C.S. (2015) Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **52**, 179–188. DOI: 10.1016/j.rser.2015.07.092.
- Fernández-López J., Viuda-Martos M., Sendra E., Sayas-Barberá E., Navarro C. & Pérez-Alvarez J.A. (2007) Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *European Food Research and Technology*, **226**, 1–6. DOI: 10.1007/s00217-006-0501-z.

- Ferreira P., Hernandez-Ortega A., Herguedas B., Martínez A.T. & Medina M. (2009) Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: a mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrates. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 24840–24847. DOI: 10.1074/jbc.M109.011593.
- Ferreira P., Hernández-Ortega A., Herguedas B., Rencoret J., Gutiérrez A., Martínez M.J., Jiménez-Barbero J., Medina M. & Martínez A.T. (2010) Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *The Biochemical journal*, **425**, 585–593. DOI: 10.1042/BJ20091499.
- Field J.A., Verhagen F.J. & Jong E. de (1995) Natural organohalogen production by basidiomycetes. *Trends in biotechnology*, **13**, 451–456. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)89001-0.
- Field J.A. & Wijnberg J.B.P.A. (2003) An Update on Organohalogen Metabolites Produced by Basidiomycetes. In: *Natural Production of Organohalogen Compounds* (ed. by G. Gribble), pp. 103–119. Springer Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2023). URL <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [accessed on 28 March 2023].
- Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization (1973) *Energy and Protein Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Committee*. Genf.
- Fraatz M.A., Naeve S., Hausherr V., Zorn H. & Blank L.M. (2014) A Minimal Growth Medium for the Basidiomycete *Pleurotus sapidus* for Metabolic Flux Analysis. *Fungal Biology and Biotechnology*, **1:9**, 1–8. DOI: 10.1186/s40694-014-0009-4.
- Fraatz M.A., Riemer S.J., Stöber R., Kaspera R., Nimtz M., Berger R.G. & Zorn H. (2009) A Novel Oxygenase from *Pleurotus sapidus* Transforms Valencene to Nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **61**, 202–207. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.07.001.
- Frank R.A.W., Leeper F.J. & Luisi B.F. (2007) Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **64**, 892–905. DOI: 10.1007/s00018-007-6423-5.
- Gallois A., Gross B., Langlois D., Spinnler H.-E. & Brunerie P. (1990) Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic Basidiomycetes. *Mycological Research*, **94**, 494–504. DOI: 10.1016/S0953-7562(10)80010-3.
- Galperin I., Javeed A., Luig H., Lochnit G. & Rühl M. (2016) An Aryl-Alcohol Oxidase of *Pleurotus sapidus*: Heterologous Expression, Characterization, and Application in a 2-Enzyme System. *Applied microbiology and biotechnology*, **100**, 8021–8030. DOI: 10.1007/s00253-016-7567-8.
- Garzillo A.M., Colao M.C., Buonocore V., Oliva R., Falcigno L., Saviano M., Santoro A.M., Zappala R., Bonomo R.P., Bianco C., Giardina P., Palmieri G. & Sannia G. (2001) Structural and kinetic

- characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. *Journal of protein chemistry*, **20**, 191–201. DOI: 10.1023/A:1010954812955.
- Gerhards T., Mackfeld U., Bocola M., Lieres E. von, Wiechert W., Pohl M. & Rother D. (2012) Influence of Organic Solvents on Enzymatic Asymmetric Carbonylations. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **354**, 2805–2820. DOI: 10.1002/adsc.201200284.
- Gocke D., Graf T., Brosi H., Frindi-Wosch I., Walter L., Müller M. & Pohl M. (2009) Comparative characterisation of thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **61**, 30–35. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.03.019.
- Golak-Siwulska I., Kałużewicz A., Spizewski T., Siwulski M. & Sobieralski K. (2018) Bioactive compounds and medicinal properties of Oyster mushrooms (*Pleurotus* sp.). *Folia Horticulturae*, **30**, 191–201. DOI: 10.2478/fhort-2018-0012.
- Golmakani M.-T., Mendiola J.A., Rezaei K. & Ibáñez E. (2014) Pressurized limonene as an alternative bio-solvent for the extraction of lipids from marine microorganisms. *The Journal of Supercritical Fluids*, **92**, 1–7. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.05.001.
- Granucci N. (2018) *Fruit residues: Low cost substrates for development of new food products*, The University of Auckland.
- Granucci N., Harris P.J. & Villas-Boas S.G. (2023) Chemical Compositions of Fruit and Vegetable Pomaces from the Beverage Industries. *Waste and Biomass Valorization*. DOI: 10.1007/s12649-023-02095-7.
- Gregori A., Švagelj M. & Pohleven J. (2007) Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, **45**, 238–249.
- Gross B., Yonnet G., Picque D., Brunerie P., Corrieu G. & Asther M. (1990) Production of methylanthranilate by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus* (Karst.). *Applied microbiology and biotechnology*, **34**. DOI: 10.1007/BF00170065.
- Guillén F. & Evans C.S. (1994) Anisaldehyde and Veratraldehyde Acting as Redox Cycling Agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production by *Pleurotus eryngii*. *Applied and environmental microbiology*, **60**, 2811–2817. DOI: 10.1128/aem.60.8.2811-2817.1994.
- Guillén F., Martínez A.T. & Martínez M.J. (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, **209**, 603–611. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb17326.x.
- Guneser B.A. & Yilmaz E. (2017) Bioactives, Aromatics and Sensory Properties of Cold-Pressed and Hexane-Extracted Lemon (*Citrus Limon* L.) Seed Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **94**, 723–731. DOI: 10.1007/s11746-017-2977-z.
- Guo L.-Q., Lin J.-Y. & Lin J.-F. (2007) Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China. *Food Chemistry*, **100**, 643–649. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.087.

- Guo Z., Goswami A., Mirfakhrae K. & Patel R.N. (1999) Asymmetric acyloin condensation catalyzed by phenylpyruvate decarboxylase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 4667–4675. DOI: 10.1016/S0957-4166(99)00548-0.
- Guth H. (1996) Determination of the Configuration of Wine Lactone. *Helvetica Chimica Acta*, **79**, 1559–1571. DOI: 10.1002/hlca.19960790606.
- Gutiérrez A., Caramelo L., Prieto A., Martínez M.J. & Martínez A.T. (1994) Anisaldehyde Production and Aryl-Alcohol Oxidase and Dehydrogenase Activities in Ligninolytic Fungi of the Genus *Pleurotus*. *Applied and environmental microbiology*, **60**, 1783–1788. DOI: 10.1128/aem.60.6.1783-1788.1994.
- Guyot C., Scheirman V. & Collin S. (1999) Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry*, **64**, 3–11. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00122-8.
- Hall R.L. & Oser B.L. (1965) Recent progress in the consideration of flavor ingredients under the Food Additives Amendment. 3. GRAS Substances. *Food Technology*, **19**, 151–197.
- Handoyo T. & Morita N. (2006) Structural and Functional Properties of Fermented Soybean (Tempeh) by Using *Rhizopus oligosporus*. *International Journal of Food Properties*, **9**, 347–355. DOI: 10.1080/10942910500224746.
- Harper D.B., McRoberts W.C. & Kennedy J.T. (1996) Comparison of the Efficacies of Chloromethane, Methionine, and S-Adenosylmethionine as Methyl Precursors in the Biosynthesis of Veratryl Alcohol and Related Compounds in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, **62**, 3366–3370. DOI: 10.1128/aem.62.9.3366-3370.1996.
- Hasbullah U.H.A., Supriyadi & Daryono B.S. (2019) Aroma Volatile Compounds Profile of Melon (*Cucumis melo* L.) cv. Gama Melon Parfum. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **292**, 12027. DOI: 10.1088/1755-1315/292/1/012027.
- Hasegawa T., Seimiya H., Fujihara T., Fujiwara N. & Yamada H. (2014) Aroma Profile of Star Anis and the Structure-odor Relationship of Anethole. *Natural Product Communications*, **9**, 251–256. DOI: 10.1177/1934578X1400900230.
- Hassan S., Araceli P.-S., Denis B., los Ángeles V.-V.M. de, Mayra N.-G. & Delfino R.-L. (2016) Identification of volatile compounds in cured Mexican vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans using headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Fruits*, **71**, 407–418. DOI: 10.1051/fruits/2016032.
- Hattori T., Tsuzuki H., Amou H., Yokoigawa K., Abe M. & Ohta A. (2016) A biosynthetic pathway for (E)-methyl cinnamate formation in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience*, **57**, 181–186. DOI: 10.1016/j.myc.2016.01.001.

- Haukeli A.D. & Lie S. (1975) FORMATION AND REMOVAL OF ACETOIN DURING YEAST FERMENTATION. *Journal of the Institute of Brewing*, **81**, 58–64. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1975.tb03662.x.
- Hautzel R. & Anke H. (1990) Screening of Basidiomycetes and Ascomycetes for Plant Growth Regulating Substances. Introduction of the Gibberellic Acid Induced de-novo Synthesis of Hydrolytic Enzymes in Embryoless Seeds of *Triticum aestivum* as Test System. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **45**, 1093–1098. DOI: 10.1515/znc-1990-11-1204.
- Heitman J., Sun S. & James T.Y. (2013) Evolution of fungal sexual reproduction. *Mycologia*, **105**, 1–27. DOI: 10.3852/12-253.
- Heredia A., Peinado I., Rosa E., Andrés A. & Escriche I. (2012) Volatile profile of dehydrated cherry tomato: Influences of osmotic pre-treatment and microwave power. *Food Chemistry*, **130**, 889–895. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.08.003.
- Herpoël I., Moukha S., Lesage-Meessen L., Sigoillot J. & Asther M. (2000) Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters*, **183**, 301–306. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08975.x.
- Herzog R., Solovyeva I., Rühl M., Thines M. & Hennicke F. (2016) Dikaryotic fruiting body development in a single dikaryon of *Agrocybe aegerita* and the spectrum of monokaryotic fruiting types in its monokaryotic progeny. *Mycological Progress*, **15**, 947–957. DOI: 10.1007/s11557-016-1221-9.
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lücking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P.B., McLaughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y.-C., Gams W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Kõljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K.-H., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J.-M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P., Schüssler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y.-J. & Zhang N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, **111**, 509–547. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.03.004.
- Hildebrandt G. & Klavehn W. (1932) Verfahren zur Herstellung von 1-1-Phenyl-2-methylaminopropan-1-ol.
- Hjelm O., Johansson E. & Öberg G. (1999) Production of organically bound halogens by the litter-degrading fungus *Lepista nuda*. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**, 1509–1515. DOI: 10.1016/S0038-0717(99)00069-3.

- Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M.J., Liers C. & Lundell T. (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied microbiology and biotechnology*, **87**, 871–897. DOI: 10.1007/s00253-010-2633-0.
- Hölker U. & Lenz J. (2005) Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? *Current opinion in microbiology*, **8**, 301–306. DOI: 10.1016/j.mib.2005.04.006.
- Honda Y., Ori A. & Tsuchihashi G. (1987) A General Synthetic Method of Chiral 2-Arylkanoic Esters via Thermal 1,2-Rearrangement. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **60**, 1027–1036. DOI: 10.1246/bcsj.60.1027.
- Hu W., Chen S., Wu D., Zhu K. & Ye X. (2021) Manosonication assisted extraction and characterization of pectin from different citrus peel wastes. *Food Hydrocolloids*, **121**, 106952. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106952.
- Iandolo D., Piscitelli A., Sannia G. & Faraco V. (2011) Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **163**, 40–51. DOI: 10.1007/s12010-010-9014-0.
- Iding H., Dünnwald T., Greiner L., Liese A., Müller M., Siegert P., Grötzinger J., Demir A.S. & Pohl M. (2000) Benzoylformate Decarboxylase from *Pseudomonas putida* as Stable Catalyst for the Synthesis of Chiral 2-Hydroxy Ketones. *Chemistry - A European Journal*, **6**, 1483–1495. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3765(20000417)6:8<1483::AID-CHEM1483>3.0.CO;2-S.
- Iding H., Siegert P., Mesch K. & Pohl M. (1998) Application of alpha-keto acid decarboxylases in biotransformations. *Biochimica et biophysica acta*, **1385**, 307–322. DOI: 10.1016/S0167-4838(98)00076-4.
- Inácio F.D., Ferreira R.O., Araujo C.A.V. de, Peralta R.M. & Souza C.G.M. de (2015) Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél. *Advances in Microbiology*, **05**, 1–8. DOI: 10.4236/aim.2015.51001.
- James T.Y., Liou S.-R. & Vilgalys R. (2004) The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **41**, 813–825. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.04.005.
- Jeleń H.H., Majcher M. & Dziadas M. (2012) Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica chimica acta*, **738**, 13–26. DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.006.
- Jensen K.A., Evans K.M.C., Kirk T.K. & Hammel K.E. (1994) Biosynthetic Pathway for Veratryl Alcohol in the Ligninolytic Fungus *Phanerochaet chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, **60**, 709–714. DOI: 10.1128/aem.60.2.709-714.1994.
- John I., Muthukumar K. & Arunagiri A. (2017) A review on the potential of citrus waste for D - Limonene, pectin, and bioethanol production. *International Journal of Green Energy*, **14**, 599–612. DOI: 10.1080/15435075.2017.1307753.

- Joshi S.M., Waghmare J.S., Sonawane K.D. & Waghmare S.R. (2015) Bio-ethanol and bio-butanol production from orange peel waste. *Biofuels*, **6**, 55–61. DOI: 10.1080/17597269.2015.1045276.
- Kahmann R., Steinberg G., Basse C., Feldbrügge M. & Kämper J. (2000) *Ustilago maydis*, the Causative Agent of Corn Smut Disease. In: *Fungal Pathology* (ed. by J.W. Kronstad), pp. 347–371. Springer Netherlands, Springer Netherlands.
- Kalichman J., Kirk P.M. & Matheny P.B. (2020) A compendium of generic names of agarics and Agaricales. *TAXON*, **69**, 425–447. DOI: 10.1002/tax.12240.
- Kalmış E., Yaşa İ., Kalyoncu F., Pazarbaşı B. & Koçyiğit A. (2008) Ligninolytic enzyme activities in mycelium of some wild and commercial mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, **7**, 4314–4320.
- Kapteyn J., Qualley A.V., Xie Z., Fridman E., Dudareva N. & Gang D.R. (2007) Evolution of Cinnamate/p-coumarate carboxyl methyltransferases and their role in the biosynthesis of methylcinnamate. *The Plant cell*, **19**, 3212–3229. DOI: 10.1105/tpc.107.054155.
- Karimi S., Mahboobi Soofiani N., Lundh T., Mahboubi A., Kiessling A. & Taherzadeh M.J. (2019) Evaluation of Filamentous Fungal Biomass Cultivated on Vinasse as an Alternative Nutrient Source of Fish Feed: Protein, Lipid, and Mineral Composition. *Fermentation*, **5**, 99. DOI: 10.3390/fermentation5040099.
- Karp S.G., Faraco V., Amore A., Letti L.A.J., Thomaz Soccol V. & Soccol C.R. (2015) Statistical Optimization of Laccase Production and Delignification of Sugarcane Bagasse by *Pleurotus ostreatus* in Solid-State Fermentation. *BioMed research international*, **2015**, 181204. DOI: 10.1155/2015/181204.
- Kaur J., Sodhi H.S. & Kapoor S. (2008) Breeding of *Pleurotus florida* (oyster mushroom) for phenotypic pigmentation and high yield potential. *Journal of the science of food and agriculture*, **88**, 2676–2681. DOI: 10.1002/jsfa.3389.
- Kaya M., Sousa A.G., Crépeau M.-J., Sørensen S.O. & Ralet M.-C. (2014) Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. *Annals of botany*, **114**, 1319–1326. DOI: 10.1093/aob/mcu150.
- Kim K.-H., Kang Y.M., Im C.H., Ali A., Kim S.Y., Je H.-J., Kim M.-K., Rho H.S., Lee H.S., Kong W.-S. & Ryu J.-S. (2014) Identification and functional analysis of pheromone and receptor genes in the B3 mating locus of *Pleurotus eryngii*. *PLoS one*, **9**, e104693. DOI: 10.1371/journal.pone.0104693.
- Kleofas V., Popa F., Fraatz M.A., Rühl M., Kost G. & Zorn H. (2015) Aroma profile of the anise-like odour mushroom *Cortinarius odorifer*. *Flavour and Fragrance Journal*, **30**, 381–386. DOI: 10.1002/ffj.3250.
- Koide R.T. & Malcolm G.M. (2009) N concentration controls decomposition rates of different strains of ectomycorrhizal fungi. *Fungal Ecology*, **2**, 197–202. DOI: 10.1016/j.funeco.2009.06.001.

- Kosjek B., Stampfer W., van Deursen R., Faber K. & Kroutil W. (2003) Efficient production of raspberry ketone via 'green' biocatalytic oxidation. *Tetrahedron*, **59**, 9517–9521. DOI: 10.1016/j.tet.2003.10.019.
- Krahe N.-K., Berger R.G. & Ersoy F. (2020) A DyP-Type Peroxidase of *Pleurotus sapidus* with Alkene Cleaving Activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **25**. DOI: 10.3390/molecules25071536.
- Krahe N.-K., Berger R.G., Witt M., Zorn H., Omarini A.B. & Ersoy F. (2021) Monokaryotic *Pleurotus sapidus* Strains with Intraspecific Variability of an Alkene Cleaving DyP-Type Peroxidase Activity as a Result of Gene Mutation and Differential Gene Expression. *International journal of molecular sciences*, **22**. DOI: 10.3390/ijms22031363.
- Křen V., Grout D.H.G., Dalton H., Hutchinson D.W., König W., Turner M.M., Dean G. & Thomson N. (1993) Pyruvate Decarboxylase: a New Enzyme for the Production of Acylolins by Biotransformation. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **115**, 341–343. DOI: 10.1039/C39930000341.
- Krings U. & Berger R.G. (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Applied microbiology and biotechnology*, **49**, 1–8. DOI: 10.1007/s002530051129.
- Krings U., Hinz M. & Berger R.G. (1996) Degradation of [<sup>2</sup>H]Phenylalanine by the Basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. *Journal of Biotechnology*, **51**, 123–129. DOI: 10.1016/0168-1656(96)01589-1.
- Kües U. (2000) Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **64**, 316–353. DOI: 10.1128/MMBR.64.2.316-353.2000.
- Kües U. (2015) From two to many: Multiple mating types in Basidiomycetes. *Fungal Biology Reviews*, **29**, 126–166. DOI: 10.1016/j.fbr.2015.11.001.
- Kües U., James T.Y. & Heitman J. (2011) 6 Mating Type in Basidiomycetes: Unipolar, Bipolar, and Tetrapolar Patterns of Sexuality. In: *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms* (ed. by S. Pöggeler & J. Wöstemeyer), pp. 97–160. Springer Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Kurobayashi Y., Kouno E., Fujita A., Morimitsu Y. & Kubota K. (2006) Potent odorants characterize the aroma quality of leaves and stalks in raw and boiled celery. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **70**, 958–965. DOI: 10.1271/bbb.70.958.
- Lado J., Gambetta G. & Zacarias L. (2018) Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. *Scientia Horticulturae*, **233**, 238–248. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.01.055.
- Lado J., Rodrigo M.J. & Zacarías L. (2014) Maturity indicators and citrus fruit quality. *Stewart Postharvest Review*, **10**, 1–6.

- Lambertz C., Ece S., Fischer R. & Commandeur U. (2016) Progress and obstacles in the production and application of recombinant lignin-degrading peroxidases. *Bioengineered*, **7**, 145–154. DOI: 10.1080/21655979.2016.1191705.
- Langenbeck W., Wrede H. & Schlockermann W. (1934) Über Carboxylase. II. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, **227**, 263–276. DOI: 10.1515/bchm2.1934.227.5-6.263.
- Lapadatescu C., Giniès C., Le Quéré J.-L. & Bonnarne P. (2000) Novel Scheme for Biosynthesis of Aryl Metabolites from L-Phenylalanine in the Fungus *Bjerkandera adusta*. *Applied and environmental microbiology*, **66**, 1517–1522. DOI: 10.1128/AEM.66.4.1517-1522.2000.
- Lauber C., Schwarz T., Nguyen Q.K., Lorenz P., Lochnit G. & Zorn H. (2017) Identification, Heterologous Expression and Characterization of a Dye-Decolorizing Peroxidase of *Pleurotus sapidus*. *AMB Express*, **7**, 164. DOI: 10.1186/s13568-017-0463-5.
- Lauritsen F.R., Kotiaho T. & Lloyd D. (1993) Rapid and direct monitoring of volatile fermentation products in the fungus *Bjerkandera adusta* by membrane inlet tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, **22**, 585–589. DOI: 10.1002/bms.1200221005.
- Lechner B.E. & Albertó E. (2011) Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields: *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Revista iberoamericana de micología*, **28**, 148–154. DOI: 10.1016/j.riam.2010.12.001.
- Lee S.C., Ni M., Li W., Shertz C. & Heitman J. (2010) The evolution of sex: a perspective from the fungal kingdom. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **74**, 298–340. DOI: 10.1128/MMBR.00005-10.
- Lee S.-J., Umamo K., Shibamoto T. & Lee K.-G. (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, **91**, 131–137. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.05.056.
- Lesage-Meessen L., Delattre M., Haon M., Thibault J.F., Ceccaldi B.C., Brunerie P. & Asther M. (1996) A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Biotechnology*, **50**, 107–113. DOI: 10.1016/0168-1656(96)01552-0.
- Li Y.-X., Han J.-J., Yang X.-L., Li H.-R., Wang Y.-Q., Wang S.-J. & Bao L. (2013) Bioactive composition of the solid culture of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus* on rice and the antioxidant effect evaluation. *Mycosystema*, **32**, 876–882.
- Liers C., Bobeth C., Pecyna M., Ullrich R. & Hofrichter M. (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**, 1869–1879. DOI: 10.1007/s00253-009-2173-7.

- Liers C., Pecyna M.J., Kellner H., Worrlich A., Zorn H., Steffen K.T., Hofrichter M. & Ullrich R. (2013) Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Applied microbiology and biotechnology*, **97**, 5839–5849. DOI: 10.1007/s00253-012-4521-2.
- Lin P., Yan Z.-F., Kook M., Li C.-T. & Yi T.-H. (2022) Genetic and Chemical Diversity of Edible Mushroom *Pleurotus* Species. *BioMed research international*, **2022**, 6068185. DOI: 10.1155/2022/6068185.
- Linde D., Ayuso-Fernández I., Laloux M., Aguiar-Cervera J.E., Lacey A.L. de, Ruiz-Dueñas F.J. & Martínez A.T. (2021) Comparing Ligninolytic Capabilities of Bacterial and Fungal Dye-Decolorizing Peroxidases and Class-II Peroxidase-Catalases. *International journal of molecular sciences*, **22**. DOI: 10.3390/ijms22052629.
- Lindsay M.A., Granucci N., Greenwood D.R. & Villas-Boas S.G. (2022) Fermentative Production of Volatile Metabolites Using *Brettanomyces bruxellensis* from Fruit and Vegetable By-Products. *Fermentation*, **8**, 457. DOI: 10.3390/fermentation8090457.
- Linke D., Omarini A.B., Takenberg M., Kelle S. & Berger R.G. (2019) Long-Term Monokaryotic Cultures of *Pleurotus ostreatus* var. *florida* Produce High and Stable Laccase Activity Capable to Degrade  $\beta$ -Carotene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **187**, 894–912. DOI: 10.1007/s12010-018-2860-x.
- Liu J., Liu B., Zhan L., Wang P., Ju M. & Wu W. (2016) Solid-State Fermentation of Ammoniated Corn Straw to Animal Feed by *Pleurotus ostreatus* PI-5. *BioResources*, **12**. DOI: 10.15376/biores.12.1.1723-1736.
- Lobell M. & Crout D.H.G. (1996) Pyruvate Decarboxylase: A Molecular Modeling Study of Pyruvate Decarboxylation and Acyloin Formation. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 1867–1873. DOI: 10.1021/ja951830t.
- Loffredi E. & Alamprese C. (2023) Optimisation of a blend of emulsifier substitutes for clean-label artisanal ice cream. *LWT*, **173**, 114338. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.114338.
- Lomascolo A., Record E., Herpoël-Gimbert I., Delattre M., Robert J.L., Georis J., Dauvrin T., Sigoillot J.-C. & Asther M. (2003) Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *Journal of applied microbiology*, **94**, 618–624. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01879.x.
- Lomascolo A., Stentelaire C., Asther M. & Lesage-Meessen L. (1999) Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends in biotechnology*, **17**, 282–289. DOI: 10.1016/S0167-7799(99)01313-X.

- Lu Q., Huang N., Peng Y., Zhu C. & Pan S. (2019) Peel oils from three Citrus species: volatile constituents, antioxidant activities and related contributions of individual components. *Journal of food science and technology*, **56**, 4492–4502. DOI: 10.1007/s13197-019-03937-w.
- MacLeod G. & Ames J.M. (1989) Volatile components of celery and celeriac. *Phytochemistry*, **28**, 1817–1824. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)97866-X.
- Majcher M. & Jeleń H.H. (2009) Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks. *Journal of Food Composition and Analysis*, **22**, 606–612. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.11.006.
- Mandenius C.-F. & Brundin A. (2008) Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology progress*, **24**, 1191–1203. DOI: 10.1002/btpr.67.
- Mantzouridou F. & Paraskevopoulou A. (2013) Volatile Bio-ester Production from Orange Pulp-Containing Medium Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Bioprocess Technology*, **6**, 3326–3334. DOI: 10.1007/s11947-012-1009-0.
- Mantzouridou F.T., Paraskevopoulou A. & Lalou S. (2015) Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste. *Biochemical Engineering Journal*, **101**, 1–8. DOI: 10.1016/j.bej.2015.04.013.
- Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V. & Pizzoferrato L. (1999) Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, **65**, 477–482. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00212-X.
- Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J. & Hutkins R. (2017) Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, **44**, 94–102. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.
- Marín F.R., Soler-Rivas C., Benavente-García O., Castillo J. & Pérez-Alvarez J.A. (2007) By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, **100**, 736–741. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.040.
- Martínez A.T., Camarero S., Guillén F., Gutiérrez A., Muñoz C., Varela E., Martínez M.J., Barrasa J.M., Ruel K. & Pelayo J.M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Reviews*, **13**, 265–273. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00047.x.
- Matheny P.B., Curtis J.M., Hofstetter V., Aime M.C., Moncalvo J.-M., Ge Z.-W., Yang Z.-L., Slot J.C., Ammirati J.F., Baroni T.J., Bougher N.L., Hughes K.W., Lodge D.J., Kerrigan R.W., Seidl M.T., Aanen D.K., DeNitis M., Daniele G.M., Desjardin D.E., Kropp B.R., Norvell L.L., Parker A., Vellinga E.C., Vilgalys R. & Hibbett D.S. (2006) Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia*, **98**, 982–995. DOI: 10.1080/15572536.2006.11832627.

- Meinhardt F., Esser K. & Lemke P.A. (1990) Sex determination and sexual differentiation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **9**, 329–341. DOI: 10.1080/07352689009382294.
- Mester T., Swarts H.J., Romero i Solé S., de Bont J.A.M. & Field J.A. (1997) Stimulation of Aryl Metabolite Production in the Basidiomycete *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 with Biosynthetic Precursors and Lignin Degradation Products. *Applied and environmental microbiology*, **63**, 1987–1994. DOI: 10.1128/aem.63.5.1987-1994.1997.
- Mikiashvili N., Wasser S.P., Nevo E. & Elisashvili V. (2006) Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 999–1002. DOI: 10.1007/s11274-006-9132-6.
- Miyazawa M., Dejima Y., Takahashi T., Matsuda N. & Ishikawa R. (2011) Characteristic Odor Components of Essential Oil from Dried Fruiting Bodies of Golden Oyster Mushroom ( *Pleurotus citrinopileatus* ). *Journal of Essential Oil Research*, **23**, 58–63. DOI: 10.1080/10412905.2011.9700459.
- Moens F., Lefeber T. & Vuyst L. de (2014) Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Applied and environmental microbiology*, **80**, 1848–1857. DOI: 10.1128/AEM.03344-13.
- Mohan D. & Singh K.P. (2002) Single- and multi-component adsorption of cadmium and zinc using activated carbon derived from bagasse—an agricultural waste. *Water Research*, **36**, 2304–2318. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00447-X.
- Morales Alfaro J., Bermejo A., Navarro P., Quiñones A. & Salvador A. (2021) Effect of Rootstock on Citrus Fruit Quality: A Review. *Food Reviews International*, 1–19. DOI: 10.1080/87559129.2021.1978093.
- Morgenstern I., Klopman S. & Hibbett D.S. (2008) Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the Agaricomycetes. *Journal of molecular evolution*, **66**, 243–257. DOI: 10.1007/s00239-008-9079-3.
- Moshonas M.G., Shaw P.E. & Veldhuis M.K. (1972) Analysis of Volatile Constituents from Meyer Lemon Oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, **20**, 751–752. DOI: 10.1021/jf60182a018.
- Nakamura K., Kondo S., Kawai Y., Hida K., Kitano K. & Ohno A. (1996) Enantio- and Regioselective Reduction of  $\alpha$ -Diketones by Baker's Yeast. *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 409–412. DOI: 10.1016/0957-4166(96)00020-1.
- Nedele A.-K., Gross S., Rigling M. & Zhang Y. (2021) Reduction of green off-flavor compounds: Comparison of key odorants during fermentation of soy drink with *Lycoperdon pyriforme*. *Food Chemistry*, **334**, 127591. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127591.

- Negrone M., D'Agostina A. & Arnoldi A. (2000) Autoxidation in xylose/lysine model systems. *Journal of agricultural and food chemistry*, **48**, 479–483. DOI: 10.1021/jf990610m.
- Neuberg C. & Hirsch J. (1921) Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase). *Biochemische Zeitschrift*, **115**, 282–310.
- Neuser F., Zorn H. & Berger R.G. (2000a) Formation of Aliphatic and Aromatic  $\alpha$ -Hydroxy Ketones by *Zygosaccharomyces bisporus*. *Zeitschrift für Naturforschung*, **55c**, 560–568. DOI: 10.1515/znc-2000-7-814.
- Neuser F., Zorn H. & Berger R.G. (2000b) Generation of Odorous Acyloins by Yeast Pyruvate Decarboxylases and their Occurrence in Sherry and Soy Sauce. *Journal of agricultural and food chemistry*, **48**, 6191–6195. DOI: 10.1021/jf000535b.
- Nicolini L., Volpe C., Pezzotti A. & Carilli A. (1993) Changes in in-vitro digestibility of orange peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi. *Bioresource technology*, **45**, 17–20. DOI: 10.1016/0960-8524(93)90137-Z.
- Nieter A., Kelle S., Linke D. & Berger R.G. (2016) Feruloyl esterases from *Schizophyllum commune* to treat food industry side-streams. *Bioresource technology*, **220**, 38–46. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.045.
- Nieuwenhuis B.P.S. & Aanen D.K. (2018) Nuclear arms races: Experimental evolution for mating success in the mushroom-forming fungus *Schizophyllum commune*. *PLoS one*, **13**, e0209671. DOI: 10.1371/journal.pone.0209671.
- Noguerol A.T., Igual M. & Pagán-Moreno M.J. (2021) Nutritional and Physicochemical Characterization of Vegetable Fibres in Order to Obtain Gelled Products. In: *The 1st International Electronic Conference on Food Science and Functional Foods*, p. 23. MDPI, MDPI.
- Novak R. (2011) Are pleuromutilin antibiotics finally fit for human use? *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1241**, 71–81. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06219.x.
- Oberoi H.S., Vadlani P.V., Madl R.L., Saida L. & Abeykoon J.P. (2010) Ethanol production from orange peels: two-stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design. *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**, 3422–3429. DOI: 10.1021/jf903163t.
- Okamoto K., Narayama S., Katsuo A., Shigematsu I. & Yanase H. (2002) Biosynthesis of *p*-Anisaldehyde by the White-Rot Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93**, 207–210. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80015-9.
- Omarini A., Dambolena J.S., Lucini E., Jaramillo Mejía S., Albertó E. & Zygodlo J.A. (2016) Biotransformation of 1,8-Cineole by Solid-State Fermentation of *Eucalyptus* waste from the essential oil industry using *Pleurotus ostreatus* and *Favolus tenuiculus*. *Folia microbiologica*, **61**, 149–157. DOI: 10.1007/s12223-015-0422-y.

- Omarini A., Nepote V., Grosso N.R., Zygadlo J.A. & Albertó E. (2010) Sensory analysis and fruiting bodies characterisation of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry. *International Journal of Food Science & Technology*, **45**, 466–474. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02147.x.
- Omarini A.B., Labuckas D., Zunino M.P., Pizzolitto R., Fernández-Lahore M., Barrionuevo D. & Zygadlo J.A. (2019) Upgrading the Nutritional Value of Rice Bran by Solid-State Fermentation with *Pleurotus sapidus*. *Fermentation*, **5**, 44. DOI: 10.3390/fermentation5020044.
- Omarini A.B., Plagemann I., Schimanski S., Krings U. & Berger R.G. (2014) Crosses Between Monokaryons of *Pleurotus sapidus* or *Pleurotus florida* Show an Improved Biotransformation of (+)-Valencene to (+)-Nootkatone. *Bioresource technology*, **171**, 113–119. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.08.061.
- Onken J. & Berger R.G. (1999) Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology*, **69**, 163–168. DOI: 10.1016/S0168-1656(99)00040-1.
- Oonincx D.G.A.B., van Itterbeeck J., Heetkamp M.J.W., van den Brand H., van Loon J.J.A. & van Huis A. (2010) An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PloS one*, **5**, e14445. DOI: 10.1371/journal.pone.0014445.
- Orban A., Bürger F., Mewe C., Sella N., Zorn H. & Rühl M. (*E*)-Nerolidol formation in dikaryotic and monokaryotic strains of *Pleurotus sapidus*: *in preparation*.
- Orban A., Hennicke F. & Rühl M. (2020) Volatilomes of *Cyclocybe aegerita* during different stages of monokaryotic and dikaryotic fruiting. *Biological chemistry*, **401**, 995–1004. DOI: 10.1515/hsz-2019-0392.
- Oser B.L. (1959) An integrated essential amino acid index for predicting the biological value of proteins. In: *Protein and amino acid nutrition* (ed. by A.A. Albanese). Academic Press Inc., Academic Press Inc.,
- Park Y.-S., Dhungana S.K., Kim I.-D. & Shin D.-H. (2020) Nutritional value and antioxidant potential of lemon seed and sprout. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **52**, 627–631. DOI: 10.9721/KJFST.2020.52.6.627.
- Patel Y., Naraian R. & Singh V.K. (2012) Medicinal properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, **3**, 1–12. DOI: 10.5829/idosi.wjfpb.2012.3.1.303.
- Pathak P.D., Mandavgane S.A. & Kulkarni B.D. (2017) Fruit Peel Waste: Characterization and its Potential Uses. *Current Science*, **113**, 444. DOI: 10.18520/cs/v113/i03/444-454.

- Patsalou M., Samanides C.G., Protopapa E., Stavrinou S., Vyrides I. & Koutinas M. (2019) A Citrus Peel Waste Biorefinery for Ethanol and Methane Production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **24**. DOI: 10.3390/molecules24132451.
- Pepper J.M. & Saha M. (1964) The Synthesis of Aroyl Methylketones as Lignin Model Substances. *Canadian Journal of Chemistry*, **42**, 113–120. DOI: 10.1139/V64-017.
- Pérez-Silva A., Odoux E., Brat P., Ribeyre F., Rodriguez-Jimenes G., Robles-Olvera V., García-Alvarado M.A. & Günata Z. (2006) GC–MS and GC–olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry*, **99**, 728–735. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.050.
- Pfefferle W., Anke H., Bross M. & Steglich W. (1990) Inhibition of Solubilized Chitin Synthase by Chlorinated Aromatic Compounds Isolated from Mushroom Cultures. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**, 1381–1384. DOI: 10.1080/00021369.1990.10870146.
- Pinela J., Omarini A.B., Stojković D., Barros L., Postemsky P.D., Calhelha R.C., Breccia J., Fernández-Lahore M., Soković M. & Ferreira I.C.F.R. (2020) Biotransformation of rice and sunflower side-streams by dikaryotic and monokaryotic strains of *Pleurotus sapidus*: Impact on phenolic profiles and bioactive properties. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, **132**, 109094. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109094.
- Pohl M. (1997) Protein design on pyruvate decarboxylase (PDC) by site-directed mutagenesis. In: *New Enzymes for Organic Synthesis* (ed. by T. Scheper, W. Babel, H.W. Blanch, C.L. Cooney, S.-O. Enfors, K.-E.L. Eriksson, A. Fiechter, A.M. Klivanov, B. Mattiasson, S.B. Primrose, H.J. Rehm, P.L. Rogers, H. Sahm, K. Schügerl, G.T. Tsao, K. Venkat, J. Villadsen, U. von Stockar & C. Wandrey), pp. 15–43. Springer Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Postel W. & Güvenc U. (1976) Gaschromatographische Bestimmung von Diacetyl, Acetoin und 2,3-Pentandion in Wein. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **161**, 35–44. DOI: 10.1007/BF01145418.
- Postemsky P.D., Bidegain M.A., Lluberas G., Lopretti M.I., Bonifacino S., Inés Landache M., Zygadlo J.A., Fernández-Lahore M. & Omarini A.B. (2019) Biorefining via Solid-State Fermentation of Rice and Sunflower By-Products Employing Novel Monosporic Strains from *Pleurotus sapidus*. *Bioresource technology*, **289**, 121692. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121692.
- Powell M.J., Sebranek J.G., Prusa K.J. & Tarté R. (2019) Evaluation of citrus fiber as a natural replacer of sodium phosphate in alternatively-cured all-pork Bologna sausage. *Meat science*, **157**, 107883. DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.107883.
- Raman J., Jang K.-Y., Oh Y.-L., Oh M., Im J.-H., Lakshmanan H. & Sabaratnam V. (2020) Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp.: An Overview. *Mycobiology*, **49**, 1–14. DOI: 10.1080/12298093.2020.1835142.

- Ramírez L., Larraya L.M. & Pisabarro A.G. (2000) Molecular tools for breeding basidiomycetes. *International Microbiology*, **3**, 147–152.
- Rapier S., Breheret S., Talou T., Pélissier Y. & Bessière J.-M. (2002) The Anise-like Odor of *Clitocybe odora*, *Lentinellus cochleatus* and *Agaricus essettei*. *Mycologia*, **94**, 373–376. DOI: 10.2307/3761770.
- Reddy G.V., Ravindra Babu P., Komaraiah P., Roy K. & Kothari I.L. (2003) Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochemistry*, **38**, 1457–1462. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00025-6.
- Rigling M., Heger F., Graule M., Liu Z., Zhang C., Ni L. & Zhang Y. (2022) A Robust Fermentation Process for Natural Chocolate-like Flavor Production with *Mycetinis scorodonius*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **27**. DOI: 10.3390/molecules27082503.
- Rigling M., Liu Z., Hofele M., Prozmann J., Zhang C., Ni L., Fan R. & Zhang Y. (2021) Aroma and catechin profile and in vitro antioxidant activity of green tea infusion as affected by submerged fermentation with *Wolfiporia cocos* (Fu Ling). *Food Chemistry*, **361**, 130065. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130065.
- Rodríguez Couto S. (2008) Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology journal*, **3**, 859–870. DOI: 10.1002/biot.200800031.
- Romano P. & Suzzi G. (1993) Acetoin production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **108**, 23–26. DOI: 10.1016/0378-1097(93)90481-g.
- Romano P. & Suzzi G. (1996) Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation. *Applied and environmental microbiology*, **62**, 309–315. DOI: 10.1128/aem.62.2.309-315.1996.
- Rösecke J., Pietsch M. & König W.A. (2000) Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry*, **54**, 747–750. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00138-2.
- Royse D.J. (2014) *A global perspective on the high five: Agaricus, Pleurotus, Lentinula, Auricularia & Flammulina*. New Delhi, India.
- Royse D.J., Baars J. & Tan Q. (2017) Current Overview of Mushroom Production in the World. In: *Edible and Medicinal Mushrooms* (ed. by C.Z. Diego & A. Pardo-Giménez), pp. 5–13. John Wiley & Sons, Ltd, John Wiley & Sons, Ltd.
- Rühl M., Fischer C. & Kües U. (2008) Ligninolytic enzyme activities alternate with mushroom production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheat-straw-based substrate. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, **2**, 478–492.

- Rühl M., Majcherczyk A. & Kües U. (2013) Lcc1 and Lcc5 are the main laccases secreted in liquid cultures of *Coprinopsis cinerea* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, **103**, 1029–1039. DOI: 10.1007/s10482-013-9883-7.
- Ruiz-Dueñas F.J. & Martínez A.T. (2009) Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial biotechnology*, **2**, 164–177. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x.
- Saavedra M., Benitez E., Cifuentes C. & Nogales R. (2006) Enzyme activities and chemical changes in wet olive cake after treatment with *Pleurotus ostreatus* or *Eisenia fetida*. *Biodegradation*, **17**, 93–102. DOI: 10.1007/s10532-005-4216-9.
- Salvachúa D., Prieto A., Martínez Á.T. & Martínez M.J. (2013) Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpelex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Applied and environmental microbiology*, **79**, 4316–4324. DOI: 10.1128/AEM.00699-13.
- Sandargo B., Chepkirui C., Cheng T., Chaverra-Muñoz L., Thongbai B., Stadler M. & Hüttel S. (2019) Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals. *Biotechnology advances*, **37**, 107344. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.011.
- Sannia G., Limongi P., Cocca E., Buonocore F., Nitti G. & Giardina P. (1991) Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1073**, 114–119. DOI: 10.1016/0304-4165(91)90190-R.
- Santi G., Crognale S., D'Annibale A., Petruccioli M., Ruzzi M., Valentini R. & Moresi M. (2014) Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, **61**, 146–156. DOI: 10.1016/j.biombioe.2013.12.007.
- Sarris D., Philippoussis A., Mallouchos A. & Diamantopoulou P. (2020) Valorization of low-cost, carbon-rich substrates by edible ascomycetes and basidiomycetes grown on liquid cultures. *FEMS Microbiology Letters*, **367**. DOI: 10.1093/femsle/fnaa168.
- Sauter H., Steglich W. & Anke T. (1999) Strobilurins: Evolution of a New Class of Active Substances. *Angewandte Chemie International Edition*, **38**, 1328–1349. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990517)38:10<1328::AID-ANIE1328>3.0.CO;2-1.
- Scheibner M., Hülsdau B., Zelena K., Nimtz M., Boer L. de, Berger R.G. & Zorn H. (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade beta-carotene. *Applied microbiology and biotechnology*, **77**, 1241–1250. DOI: 10.1007/s00253-007-1261-9.
- Schrader J. (2007) Microbial Flavour Production. In: *Flavours and Fragrances* (ed. by R.G. Berger), pp. 507–574. Springer Berlin Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.

- Schubert V., Dietrich A., Ulrich T. & Mosandl A. (1992) The Stereoisomers of Nerolidol: Separation, Analysis and Olfactoric Properties. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **47**, 304–307. DOI: 10.1515/znc-1992-3-422.
- Schüttmann I., Bouws H., Szweda R.T., Suckow M., Czermak P. & Zorn H. (2014) Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **103**, 79–84. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.08.007.
- Shang J., Xu S., Tang L., Yang R., Gong M., Li Y., Wang Y., Zou G., Wan J. & Bao D. (2023) Transformation of Compatible Mating-Type Genes in Monokaryons Triggers Fruiting Body Development by Activating Mating Pathways in *Pleurotus eryngii*. *Microbiology spectrum*, e0527222. DOI: 10.1128/spectrum.05272-22.
- Sharmilan T., Premarathne I., Wanniarachchi I., Kumari S. & Wanniarachchi D. (2020) Electronic Nose Technologies in Monitoring Black Tea Manufacturing Process. *Journal of Sensors*, **2020**, 1–8. DOI: 10.1155/2020/3073104.
- Shigeto A., Hachisuka S. & Kumazawa K. (2016) Characterization of Potent Odorants in Three Different Cultivars (Madagascar, Comoro and Tahiti) of Vanilla Bean by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). *Food Science and Technology Research*, **22**, 811–816. DOI: 10.3136/fstr.22.811.
- Shimada M. & Gold M.H. (1983) Direct Cleavage of the Vicinal Diol Linkage of the Lignin Model Compound Dihydroanisoin by the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, **134**, 299–302. DOI: 10.1007/BF00407806.
- Siegmund B. & Pöllinger-Zierler B. (2006) Odor thresholds of microbially induced off-flavor compounds in apple juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**, 5984–5989. DOI: 10.1021/jf060602n.
- Silk P.J., Aubry C., Lonergan G.C. & Macaulay J.B. (2001) Chlorometabolite Production by the Ecologically Important White Rot Fungus *Bjerkandera adusta*. *Chemosphere*, **44**, 1603–1616. DOI: 10.1016/S0045-6535(00)00537-3.
- Silk P.J. & Macaulay J.B. (2003a) Stereoselective Biosynthesis of Chloroarylpropane Diols by the Basidiomycete *Bjerkandera adusta*. *Chemosphere*, **52**, 503–512. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00203-0.
- Silk P.J. & Macaulay J.B. (2003b) Stereoselective Biosynthesis of Chloroarylpropane Diols by the Basidiomycete *Bjerkandera adusta* : Exploring the Roles of Amino Acids, Pyruvate, Glycerol and Phenyl Acetyl Carbinol. *FEMS Microbiology Letters*, **228**, 11–19. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00725-0.

- Singh M.P. & Singh V.K. (2012) Biodegradation of vegetable and agrowastes by *Pleurotus sapidus*: A novel strategy to produce mushroom with enhanced yield and nutrition. *Cellular & Molecular Biology*, **58**, 1–7. DOI: 10.1170/T913.
- Smith J.E., Rowan N.J. & Sullivan R. (2002) Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology letters*, **24**, 1839–1845. DOI: 10.1023/A:1020994628109.
- Sommer S., Fraatz M.A., Büttner J., Salem A.A., Rühl M. & Zorn H. (2021) Wild Strawberry-like Flavor Produced by the Fungus *Wolfiporia cocos*—Identification of Character Impact Compounds by Aroma Dilution Analysis after Dynamic Headspace Extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, **69**, 14222–14230. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c05770.
- Souza Filho P.F., Andersson D., Ferreira J.A. & Taherzadeh M.J. (2019) Mycoprotein: environmental impact and health aspects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **35**, 147. DOI: 10.1007/s11274-019-2723-9.
- Speicher A., Bomm V. & Eicher T. (1996) Dess-Martin-Periodinan (DMP). *Journal für praktische Chemie*, **338**, 588–590. DOI: 10.1002/prac.199633801112.
- Spinnler H.-E., de Jong E., Mauvais G., Semon E. & le Quere J.-L. (1994) Production of halogenated compounds by *Bjerkandera adusta*. *Applied microbiology and biotechnology*, **42**, 212–221. DOI: 10.1007/BF00902719.
- Stadler M., Mayer A., Anke H. & Sterner O. (1994) Fatty Acids and Other Compounds with Nematicidal Activity from Cultures of Basidiomycetes. *Planta medica*, **60**, 128–132. DOI: 10.1055/s-2006-959433.
- Stajic M., Persky L., Cohen E., Hadar Y., Brceski I., Wasser S.P. & Nevo E. (2004) Screening of Laccase, Manganese Peroxidase, and Versatile Peroxidase Activities of the Genus *Pleurotus* in Media With Some Raw Plant Materials as Carbon Sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **117**, 155–164. DOI: 10.1385/abab:117:3:155.
- Stajić M., Persky L., Friesem D., Hadar Y., Wasser S.P., Nevo E. & Vukojević J. (2006) Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 65–73. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.026.
- Stajich J.E., Berbee M.L., Blackwell M., Hibbett D.S., James T.Y., Spatafora J.W. & Taylor J.W. (2009) The fungi. *Current biology : CB*, **19**, R840-5. DOI: 10.1016/j.cub.2009.07.004.
- Stephan A., Ahlborn J., Zajul M. & Zorn H. (2018) Edible mushroom mycelia of *Pleurotus sapidus* as novel protein sources in a vegan boiled sausage analog system: functionality and sensory tests in comparison to commercial proteins and meat sausages. *European Food Research and Technology*, **244**, 913–924. DOI: 10.1007/s00217-017-3012-1.

- Stoffel F., Santana W.d.O., Fontana R.C. & Camassola M. (2021) Use of *Pleurotus albidus* mycoprotein flour to produce cookies: Evaluation of nutritional enrichment and biological activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **68**, 102642. DOI: 10.1016/j.ifset.2021.102642.
- Su W.-Y., Gao S.-Y., Zhan S.-J., Wu Q., Chen G.-M., Han J.-Z., Lv X.-C., Rao P.-F. & Ni L. (2022) Evaluation of Volatile Profile and In Vitro Antioxidant Activity of Fermented Green Tea Infusion With *Pleurotus sajor-caju* (Oyster Mushroom). *Frontiers in nutrition*, **9**, 865991. DOI: 10.3389/fnut.2022.865991.
- Sugano Y., Matsushima Y., Tsuchiya K., Aoki H., Hirai M. & Shoda M. (2009) Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Biodegradation*, **20**, 433–440. DOI: 10.1007/s10532-008-9234-y.
- Sugano Y. & Yoshida T. (2021) DyP-Type Peroxidases: Recent Advances and Perspectives. *International journal of molecular sciences*, **22**. DOI: 10.3390/ijms22115556.
- Swarts H.J., Teunissen P.J., Verhagen F.J., Field J.A. & Wijnberg J.B. (1997) Chlorinated Anisyl Metabolites Produced by Basidiomycetes. *Mycological Research*, **101**, 372–374. DOI: 10.1017/S0953756296003036.
- Swarts H.J., Verhagen F.J.M., Field J.A. & Wijnberg J.B.P.A. (1998) Identification and Synthesis of Novel Chlorinated *p*-Anisylpropanoid Metabolites from *Bjerkandera* Species. *Journal of Natural Products*, **61**, 1110–1114. DOI: 10.1021/NP980164H.
- Swarts H.J., Verhagen F.J.M., Field J.A. & Wijnberg J.B.P.A. (1996) Novel chlorometabolites produced by *Bjerkandera* species. *Phytochemistry*, **42**, 1699–1701. DOI: 10.1016/0031-9422(96)00191-4.
- Syvertsen J.P. & Smith M.L. (1983) Environmental Stress and Seasonal Changes in Proline Concentration of Citrus Tree Tissues and Juice. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **108**, 861–866. DOI: 10.21273/JASHS.108.5.861.
- Szabados L. & Savouré A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, **15**, 89–97. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009.
- Tacon A.G. & Metian M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, **285**, 146–158. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.015.
- Takahashi M., Inai Y., Miyazawa N., Kurobayashi Y. & Fujita A. (2013) Identification of the Key Odorants in Tahitian Cured Vanilla Beans (*Vanilla tahitensis*) by GC-MS and an Aroma Extract Dilution Analysis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **77**, 601–605. DOI: 10.1271/bbb.120840.
- Tasaki Y., Hayashi S. & Kato M. (2018) L-Phenylalanine supplementation increases the production of phenylalanine ammonia-lyase and methyl cinnamate in the mycelia of *Tricholoma matsutake*. *Mycoscience*, **59**, 8–11. DOI: 10.1016/j.myc.2017.07.001.

- Taylor A.J., Beauchamp J.D. & Langford V.S. (2021) Non-destructive and High-Throughput—APCI-MS, PTR-MS and SIFT-MS as Methods of Choice for Exploring Flavor Release. *ACS Symposium Series*, **1402**, 1–16. DOI: 10.1021/bk-2021-1402.ch001.
- Teranishi R., Buttery R.G. & Guadagni D.G. (1974) Odor Quality and Chemical Structure in Fruit and Vegetable Flavors. *Annals New York Academy of Sciences*, **237**, 209–216. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb49855.x.
- Thaler K.M., Gilardi L., Weber M., Vohburger A., Toumasatos Z., Kontses A., Samaras Z., Kalliokoski J., Simonen P., Timonen H., Aurela M., Saarikoski S., Martikainen S., Karjalainen P., Dal Maso M., Keskinen J., Niessner R., Pang G.A. & Haisch C. (2021) HELIOS/SICRIT/mass spectrometry for analysis of aerosols in engine exhaust. *Aerosol Science and Technology*, **55**, 886–900. DOI: 10.1080/02786826.2021.1909699.
- Thaller V. & Turner J.L. (1972) Natural acetylenes. XXXV. Polyacetylenic acid and benzenoid metabolites from cultures of the fungus *Lepista diemii* Singer. *Journal of the Chemical Society. Perkin transactions 1*, **16**, 2032–2034. DOI: 10.1039/p19720002032.
- The Good Scents Company *Acetoin*. URL  
<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1007331.html> [accessed on 10 January 2023].
- The Good Scents Company *p-Anisaldehyde*. URL  
<http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1001272.html> [accessed on 28 May 2022].
- Theelen B., Cafarchia C., Gaitanis G., Bassukas I.D., Boekhout T. & Dawson T.L. (2018) *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical mycology*, **56**, S10-S25. DOI: 10.1093/mmy/myx134.
- Trapp T., Kirchner T., Birk F., Fraatz M.A. & Zorn H. (2019) Biosynthesis of Stereoisomers of Dill Ether and Wine Lactone by *Pleurotus sapidus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **67**, 13400–13411. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b07263.
- Trapp T., Zajul M., Ahlborn J., Stephan A., Zorn H. & Fraatz M.A. (2018) Submerged Cultivation of *Pleurotus sapidus* with Molasses: Aroma Dilution Analyses by Means of Solid Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, **66**, 2393–2402. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b05292.
- Tsukamoto J., Durán N. & Tasic L. (2013) Nanocellulose and Bioethanol Production from Orange Waste using Isolated Microorganisms. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. DOI: 10.5935/0103-5053.20130195.
- Ullrich F. & Grosch W. (1987) Identification of the Most Intense Volatile Flavour Compounds Formed During Autoxidation of Linoleic Acid. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **184**, 277–282. DOI: 10.1007/BF01027663.

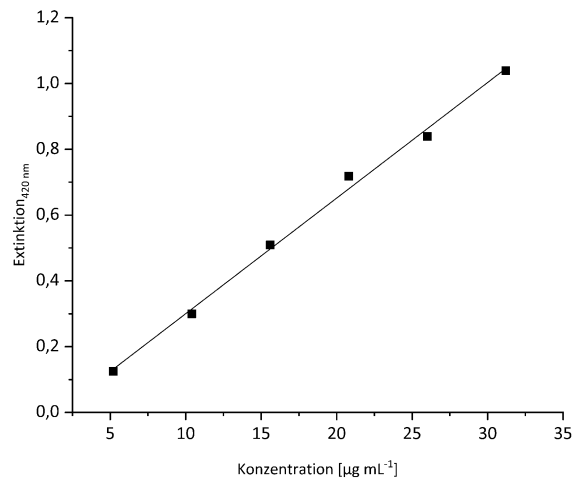
- Usami A., Motooka R., Nakahashi H., Marumoto S. & Miyazawa M. (2015) Chemical Composition and Character Impact Odorants in Volatile Oils from Edible Mushrooms. *Chemistry & biodiversity*, **12**, 1734–1745. DOI: 10.1002/cbdv.201400395.
- Usami A., Motooka R., Nakahashi H., Okuno Y. & Miyazawa M. (2014a) Characteristic odorants from bailingu oyster mushroom (*Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis*) and summer oyster mushroom (*Pleurotus cystidiosus*). *Journal of oleo science*, **63**, 731–739. DOI: 10.5650/jos.ess14043.
- Usami A., Nakaya S., Nakahashi H. & Miyazawa M. (2014b) Chemical composition and aroma evaluation of volatile oils from edible mushrooms (*Pleurotus salmoneostramineus* and *Pleurotus sajor-caju*). *Journal of oleo science*, **63**, 1323–1332. DOI: 10.5650/jos.ess14147.
- van den Dool H. & Dec. Kratz P. (1963) A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas—Liquid Partition Chromatography // A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, **11**, 463–471. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.
- van Wassenhove F., Dirinck P., Vulsteke G. & Schamp N. (1990) Aromatic Volatile Composition of Celery and Celeriac Cultivars. *HortScience*, **25**, 556–559. DOI: 10.21273/HORTSCI.25.5.556.
- Vandamme E.J. & Soetaert W. (2002) Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **77**, 1323–1332. DOI: 10.1002/jctb.722.
- Verdonk J.C., Haring M.A., van Tunen A.J. & Schuurink R.C. (2005) ODORANT1 regulates fragrance biosynthesis in petunia flowers. *The Plant cell*, **17**, 1612–1624. DOI: 10.1105/tpc.104.028837.
- Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln: VO (EG) Nr. 152/2009 (2009).
- Wang D., Sakoda A. & Suzuki M. (2001) Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource technology*, **78**, 293–300. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00002-5.
- Wang F., Xu L., Zhao L., Ding Z., Ma H. & Terry N. (2019a) Fungal Laccase Production from Lignocellulosic Agricultural Wastes by Solid-State Fermentation: A Review. *Microorganisms*, **7**. DOI: 10.3390/microorganisms7120665.
- Wang L., Guo H., Liu X., Jiang G., Li C., Li X. & Li Y. (2019b) Roles of *Lentinula edodes* as the pork lean meat replacer in production of the sausage. *Meat science*, **156**, 44–51. DOI: 10.1016/j.meatsci.2019.05.016.
- Wardencki W., Chmiel T., Dymerski T., Biernacka P. & Plutowska B. (2009) Application of Gas Chromatography, Mass Spectrometry and Olfactometry for Quality Assessment of Selected Food Products. *Ecological Chemistry and Engineering S*, **16**.

- Wei M., Liu X., Xie P., Lei Y., Yu H., Han A., Xie L., Jia H., Lin S., Bai Y., Sun B. & Zhang S. (2022) Characterization of Volatile Profiles and Correlated Contributing Compounds in Pan-Fried Steaks from Different Chinese Yellow Cattle Breeds through GC-Q-Orbitrap, E-Nose, and Sensory Evaluation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **27**. DOI: 10.3390/molecules27113593.
- Wells M.J.M. (2003) Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids. In: *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (ed. by S. Mitra), pp. 37–138. John Wiley & Sons, Inc, John Wiley & Sons, Inc.
- Widmer W., Zhou W. & Grohmann K. (2010) Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, **101**, 5242–5249. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.038.
- Wilcocks R. & Ward O.P. (1992) Factors affecting 2-hydroxypropiophenone formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, 1058–1063. DOI: 10.1002/bit.260391010.
- Wilkins M.R., Widmer W.W., Grohmann K. & Cameron R.G. (2007) Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource technology*, **98**, 1596–1601. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.06.022.
- Wood W.F., DeShazer D.A. & Largent D.L. (1988) The Identity and Metabolic Fate of Volatiles Responsible for the Odor of *Hydnellum Suaveolens*. *Mycologia*, **80**, 252–255. DOI: 10.1080/00275514.1988.12025530.
- Wu J., Cheung P.C., Wong K. & Huang N. (2004) Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry*, **85**, 101–105. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.06.009.
- Xiao Z. & Lu J.R. (2014) Generation of acetoin and its derivatives in foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, **62**, 6487–6497. DOI: 10.1021/jf5013902.
- Yan J., Wang H., Wang Y., Xu S., Wan Y., He L., Yu L. & Zhu W. (2021) Integrated metabolome and transcriptome analysis reveals candidate genes involved in metabolism of terpenoids and phthalides in celery seeds. *Industrial Crops and Products*, **172**, 114011. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114011.
- Yin C., Fan X., Fan Z., Shi D., Yao F. & Gao H. (2019) Comparison of non-volatile and volatile flavor compounds in six *Pleurotus* mushrooms. *Journal of the science of food and agriculture*, **99**, 1691–1699. DOI: 10.1002/jsfa.9358.
- Zabetakis I. & Holden M.A. (1997) Strawberry Flavour: Analysis and Biosynthesis. *Journal of the science of food and agriculture*, **74**, 421–434. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(199708)74:4<421::AID-JSFA817>3.0.CO;2-6.

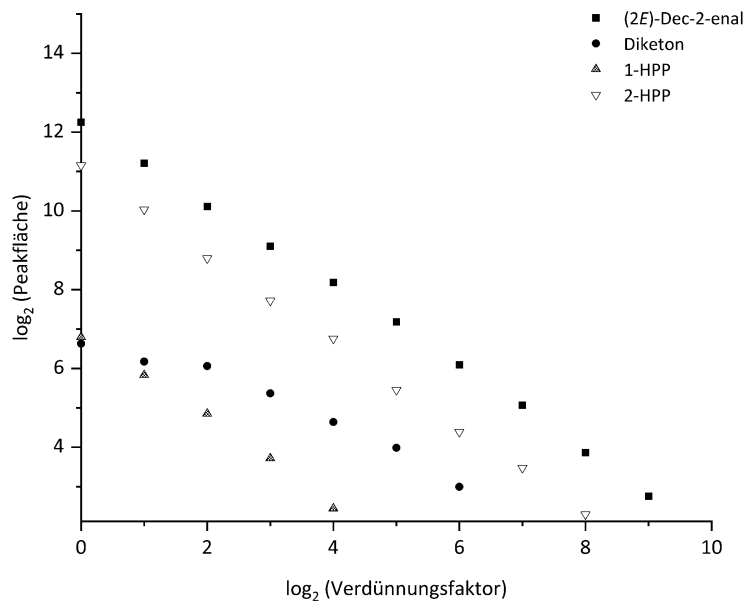
- Zamorska I. (2023) Volatile Components of Strawberries. In: *Recent Studies on Strawberries* (ed. by N. Ebru Kafkas). IntechOpen, IntechOpen.
- ZBS Food UG (2023). URL <https://zbs-food.com/> [accessed on 28 March 2023].
- Zeller A. & Rychlik M. (2006) Character Impact Odorants of Fennel Fruits and Fennel Tea. *Journal of agricultural and food chemistry*, **54**, 3686–3692. DOI: 10.1021/jf052944j.
- Zeller A. & Rychlik M. (2007) Impact of Estragole and Other Odorants on the Flavour of Anise and Tarragon. *Flavour and Fragrance Journal*, **22**, 105–113. DOI: 10.1002/ffj.1765.
- Zeng J., Christen A., Dev Singh K., Frey U. & Sinues P. (2022) Comparison of Plasma Ionization- and Secondary Electrospray Ionization- High-resolution Mass Spectrometry for Real-time Breath Analysis. *CHIMIA*, **76**, 127. DOI: 10.2533/chimia.2022.127.
- Zeppa G., Conterno L. & Gerbi V. (2001) Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, **49**, 2722–2726. DOI: 10.1021/jf0009403.
- Zhang C., Chen X., Lee R.T.C., T R., Maurer-Stroh S. & Rühl M. (2021) Bioinformatics-aided identification, characterization and applications of mushroom linalool synthases. *Communications biology*, **4**, 223. DOI: 10.1038/s42003-021-01715-z.
- Zhang H., Xie Y., Liu C., Chen S., Hu S., Xie Z., Deng X. & Xu J. (2017) Comprehensive comparative analysis of volatile compounds in citrus fruits of different species. *Food Chemistry*, **230**, 316–326. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.040.
- Zhang R., Li X. & Fadel J.G. (2002) Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresource technology*, **82**, 277–284. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00188-2.
- Zhang S. & Mueller C. (2012) Comparative Analysis of Volatiles in Traditionally Cured Bourbon and Ugandan vanilla bean (*Vanilla planifolia*) Extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, **60**, 10433–10444. DOI: 10.1021/jf302615s.
- Zhang W., Zhang Y., Yuan X. & Sun E. (2015a) Determination of Volatile Compounds of *Illicium verum* Hook. f. Using Simultaneous Distillation-Extraction and Solid Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **14**, 1879. DOI: 10.4314/tjpr.v14i10.20.
- Zhang Y., Fraatz M.A., Müller J., Schmitz H.-J., Birk F., Schrenk D. & Zorn H. (2015b) Aroma Characterization and Safety Assessment of a Beverage Fermented by *Trametes versicolor*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **63**, 6915–6921. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02167.
- Zhang Y., Hartung N.M., Fraatz M.A. & Zorn H. (2015c) Quantification of key odor-active compounds of a novel nonalcoholic beverage produced by fermentation of wort by shiitake (*Lentinula edodes*) and aroma genesis studies. *Food Research International*, **70**, 23–30. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.01.019.

- Zhang Y., Li S., Wang X., Zhang L. & Cheung P.C. (2011) Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids*, **25**, 196–206. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.02.001.
- Zhong S., Ren J., Chen D., Pan S., Wang K., Yang S. & Fan G. (2014) Free and Bound Volatile Compounds in Juice and Peel of Eureka Lemon. *Food Science and Technology Research*, **20**, 167–174. DOI: 10.3136/fstr.20.167.
- Zorn H., Schüler M. & Berger R.G. (2003) Pyruvate Decarboxylase Catalysed Formation of Terpenoid  $\alpha$ -Hydroxy Ketones. *Biocatalysis and Biotransformation*, **21**, 341–347. DOI: 10.1080/10242420310001630173.

## 7 Anhang



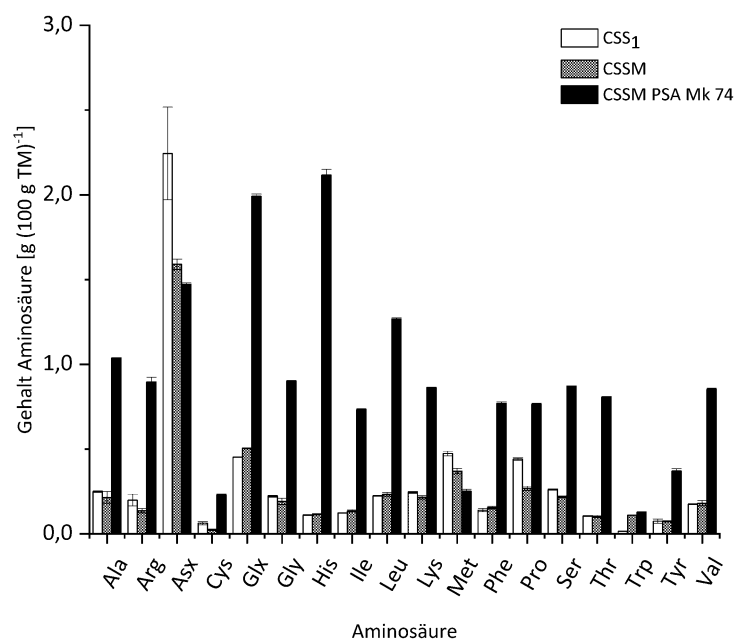
**Abbildung A 1: Kalibriergerade zur Abschätzung des Gesamtkohlenhydratgehaltes anhand des Orcinol-Schwefelsäure-Assays, beispielhaft dargestellt für die Berechnung von citrus side stream 3**

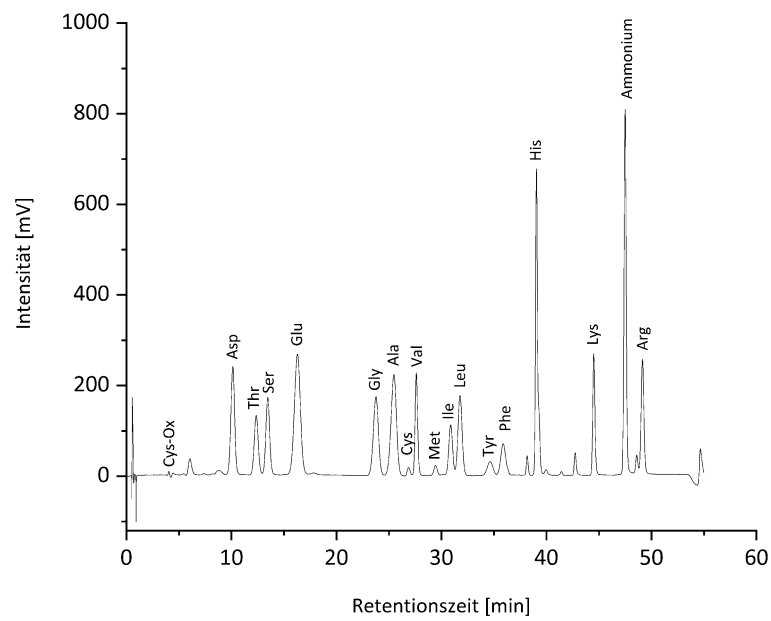


**Abbildung A 2: Log<sub>2</sub>-Auftragung der Peakflächen der detektierten Verbindungen gegen den Verdünnungsfaktor, analysiert mittels GC-FID-O**

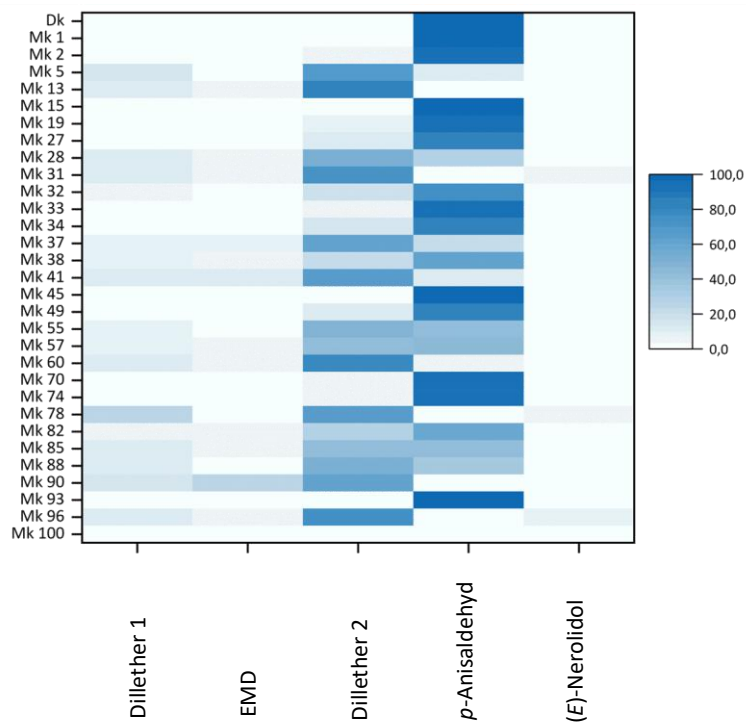
**Tabelle A 1: Retentionszeiten des Fettsäuremethylesterstandards und der Probe**

<b>Fettsäuremethylester</b>		<b>Retentionszeit Standard [min]</b>	<b>Retentionszeit Probe [min]</b>
<b>C4:0</b>	Buttersäuremethylester	3,39	n.d.
<b>C6:0</b>	Hexansäuremethylester	7,87	n.d.
<b>C8:0</b>	Octansäuremethylester	13,15	n.d.
<b>C10:0</b>	Decansäuremethylester	18,11	n.d.
<b>C12:0</b>	Laurinsäuremethylester	22,61	n.d.
<b>C14:0</b>	Myristinsäuremethylester	26,73	n.d.
<b>C16:0</b>	Palmitinsäuremethylester	30,50	30,51
<b>C18:0</b>	Stearinsäuremethylester	34,0	34,0
<b>C18:1</b>	Ölsäuremethylester	34,25	34,26
<b>C18:2</b>	Linolsäuremethylester	34,96	34,99
<b>C18:3</b>	Linolensäuremethylester	35,96	35,96
<b>C20:0</b>	Arachinsäuremethylester	37,23	n. d.
<b>C22:0</b>	Behensäuremethylester	40,24	n. d.

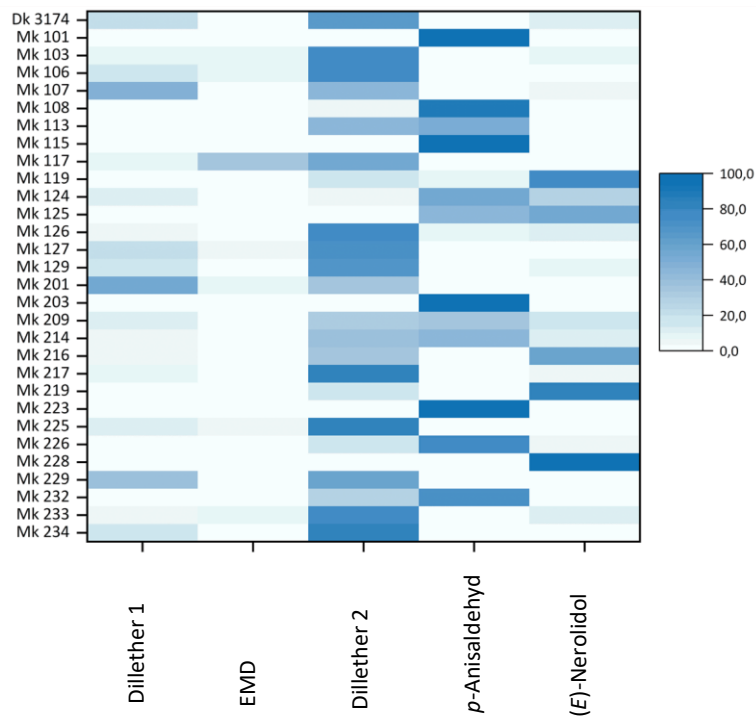
**Abbildung A 3: Aminosäureprofile des Substrats CSS<sub>1</sub>, des Mediums CSSM und des Fermentationsproduktes CSSM PSA Mk 74**



**Abbildung A 4: Beispielchromatogramm der Gesamtaminosäuren des Fermentationsproduktes CSSM<sub>4</sub> PSA Mk 37 150-L-Bioreaktor bei 570 nm**



**Abbildung A 5: Peakflächenverteilung ausgewählter geruchsaktiver Substanzen in SNL-Kulturüberständen der PSA-Stämme der ersten Generation nach HS-SPME-GC-MS-Analyse**



**Abbildung A 6:** Peakflächenverteilung ausgewählter geruchsaktiver Substanzen in SNL-Kulturüberständen der PSA-Stämme der zweiten Generation nach HS-SPME-GC-MS-Analyse

**Tabelle A 2:** Verteilung der Peakflächen ausgewählter volatiler Verbindungen in SNL-Kulturüberständen des PSA Mk 37

PSA Mk 37 Kulturtag	Ansatz	Dillether 1	EMD	Dillether 2	p-Anisaldehyd	(E)-Nerolidol
<b>3d</b>	A	14	1	38	47	0
	B	10	5	83	2	0
	C	11	7	81	1	0
	D	nicht analysiert				
<b>4d</b>	A	15	0	48	35	0
	B	9	4	87	0	0
	C	10	5	84	0	0
	D	12	6	79	3	0
<b>5d</b>	A	14	0	53	31	2
	B	9	4	83	4	1
	C	10	4	82	4	0
	D	12	7	79	1	2
<b>6d</b>	A	14	0	66	17	3
	B	12	3	82	3	1
	C	11	3	82	4	0
	D	17	6	76	0	1
<b>7d</b>	A	14	1	57	25	3
	B	13	2	81	4	1
	C	12	2	81	5	0
	D	nicht analysiert				

**Tabelle A 3: Verteilung der Peakflächen ausgewählter volatiler Verbindungen in SNL-Kulturüberständen des PSA Mk 93**

PSA Mk 93 Kulturtag	Ansatz	Dillether 1	EMD	Dillether 2	<i>p</i> -Anisaldehyd	( <i>E</i> )-Nerolidol
3d	A	0	0	0	100	0
	B	0	0	0	100	0
	C	0	0	0	99	1
	D	0	0	0	100	0
4d	A	0	0	0	100	0
	B	0	0	0	100	0
	C	0	0	0	99	1
	D	0	0	0	100	0
5d	A	0	0	0	100	0
	B	0	0	0	100	0
	C	0	0	0	100	0
	D	0	0	0	99	0
6d	A	0	0	0	100	0
	B	0	0	0	100	0
	C	0	0	2	97	0
	D	0	0	0	99	0
7d	A	0	0	0	100	0
	B	0	0	1	98	0
	C	0	0	3	97	0
	D	0	0	1	98	0

**Tabelle A 4: relative Intensitäten der jeweils 5 intensivsten *m/z* von Referenzstandards im Vergleich zu denen der identifizierten Substanzen in den Proben**

#	RI Standard		Verbindung	<i>m/z</i> (relative Intensität [%])	
	VF-WAXms	DB-5 ms		MS-Spektrum Probe	MS-Spektrum Standard
1	1016	931	$\alpha$ -Pinen	93 (100), 92 (55), 91 (54), 45 (34), 77 (30)	93 (100), 91 (44), 92 (38), 77 (29), 79 (23)
2	1038	< 800	2-Methylbut-3-en-2-ol	71 (100), 43 (30), 59 (21), 41 (9), 58 (6)	71 (100), 43 (30), 59 (22), 41 (9), 58 (6)
4	1101	975	$\beta$ -Pinen	93 (100), 91 (27), 79 (21), 77 (17), 69 (16)	93 (100), 91 (29), 41 (28), 69 (26), 79 (24)
5	1116	970	Sabinen	93 (100), 77 (42), 91 (29), 73 (23), 44 (21)	93 (100), 91 (36), 77 (27), 79 (20), 136 (19)

Fortsetzung Tabelle A 4

#	RI Standard		Verbindung	<i>m/z</i> (relative Intensität [%])	
	VF-WAXms	DB-5 ms		MS-Spektrum Probe	MS-Spektrum Standard
6	1196	1027	( <i>R</i> )-Limonen	93 (100), 68 (95), 67 (67), 136 (38), 121 (37)	93 (100), 68 (100), 67 (73), 94 (40), 121 (37)
7	1206		2-Methyl- <i>n</i> -butanol	70 (100), 56 (91), 57 (76), 41 (59), 55 (52)	56 (100), 57 (83), 70 (64), 41 (48), 55 (23)
8	1265	1023	<i>p</i> -Cymen	119 (100), 134 (35), 43 (32), 91 (20), 117 (13)	119 (100), 134 (32), 91 (17), 117 (12), 120 (10)
11	1345	913	Anisol	108 (100), 78 (43), 65 (27), 43 (16), 77 (12)	108 (100), 78 (40), 65 (22), 77 (12), 93 (10)
15	1445	1131	( <i>Z</i> )-Limonenoxid	137 (100), 109 (87), 43 (74), 67 (71), 93 (66)	67 (100), 109 (96), 137 (84), 93 (78), 43 (73)
16	1471	1085	( <i>Z</i> )-Linalooloxid (furanoid)	94 (100), 59 (91), 43 (86), 93 (68), 111 (61)	94 (100), 59 (97), 93 (65), 111 (64), 68 (42)
17	1512	1187	3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobenzofuran (Dillether)-isomer	137 (100), 109 (26), 95 (22), 43 (20), 69 (16)	137 (100), 109 (31), 69 (22), 91 (16), 79 (16)
18	1528	959	Benzaldehyd	106 (100), 105 (91), 77 (47), 51 (11), 78 (8)	106 (100), 105 (94), 77 (64), 51 (14), 78 (9)
19	1549	1098	Linalool	93 (100), 71 (97), 69 (40), 80 (37), 43 (36)	93 (100), 71 (92), 80 (38), 55 (34), 69 (34)
20	1598	1233	3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobenzofuran (Dillether)-isomer	137 (100), 109 (21), 138 (13), 93 (11), 69 (11)	137 (100), 109 (46), 93 (46), 41 (44), 69 (43)
21	1602	1179	Terpinen-4-ol	71 (100), 111 (96), 93 (76), 154 (35), 86 (30)	71 (100), 93 (77), 111 (60), 43 (38), 91 (32)
22	1609	1196	Dihydrocarvon	95 (100), 109 (86), 97 (85), 67 (81), 69 (63)	95 (100), 67 (88), 109 (62), 82 (53), 81 (52)
25	1698	1193	$\alpha$ -Terpineol	136 (100), 93 (94), 121 (91), 59 (73), 81 (50)	59 (100), 93 (95), 121 (68), 136 (52), 81 (47)
26	1728	1253	Piperiton	110 (100), 82 (80), 137 (51), 95 (45), 152 (36)	82 (100), 110 (92), 95 (43), 109 (29), 137 (27)

Fortsetzung Tabelle A 4

# (AEVA)	RI Standard		Verbindung	<i>m/z</i> (relative Intensität [%]) MS-Spektrum	
	VF- WAXms	DB-5 ms		Probe	Standard
27	1763	1182	<i>p</i> -Methylacetophenon	119 (100), 91 (37), 134 (33), 112 (9), 120 (8)	119 (100), 91 (67), 134 (31), 65 (17), 120 (9)
29	1848	1185	<i>p</i> -Cymen-8-ol	135 (100), 43 (46), 91 (17), 150 (18), 136 (11)	135 (100), 43 (45), 91 (18), 150 (15), 136 (9)
33	2031	1252	<i>p</i> -Anisaldehyd	135 (100), 136 (78), 77 (14), 107 (11), 92 (8)	135 (100), 136 (75), 77 (16), 107 (12), 92 (9)
34	2078	1384	( <i>E</i> )-Methylcinnamat	131 (100), 162 (63), 103 (47), 161 (35), 77 (17)	131 (100), 103 (63), 162 (49), 77 (36), 161 (28)
35	2095	1371	Methyl- <i>p</i> -anisat	135 (100), 166 (45), 143 (13), 136 (12), 107 (11)	135 (100), 166 (45), 136 (10), 77 (10), 107 (9)
37	2157	1379	<i>p</i> -Methoxyphenylacetone	121 (100), 164 (17), 109 (12), 122 (10), 127 (6)	121 (100), 164 (16), 122 (9), 77 (5), 91 (4)
38	2210	1447	<i>p</i> -Methoxypropiophenon	135 (100), 164 (14), 136 (9), 77 (8), 107 (7)	135 (100), 164 (13), 77 (11), 136 (8), 92 (7)
39	2231	1447	3,6-Dimethyl-3a,4,5,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(3 <i>H</i> )-on (Weinlacton)-isomer	151 (100), 93 (27), 166 (22), 91 (16), 107 (13)	151 (100), 93 (99), 91 (54), 107 (47), 79 (47)
40	2279	1280	<i>p</i> -Methoxybenzylalkohol	138 (100), 109 (40), 137 (25), 77 (19), 107 (17)	138 (100), 137 (66), 109 (57), 121 (39), 77 (26)
43	2396	1474	3,4-Dimethoxybenzaldehyd	166 (100), 165 (62), 85 (20), 95 (13), 151 (10)	166 (100), 165 (61), 95 (13), 77 (10), 151 (10)
	1243	1057	$\gamma$ -Terpinen	93 (100), 136 (42), 121 (38), 91 (31), 77 (29)	93 (100), 136 (47), 91 (46), 121 (32), 77 (25)
	1561	1189	3,9-Epoxy- <i>p</i> -mentha-1,8-(10)-dien (EMD)	135 (100), 122 (27), 79 (17), 91 (12), 150 (9)	135 (100), 79 (48), 122 (32), 91 (28), 77 (19)
	2035	n. b.	( <i>E</i> )-Nerolidol	93 (100), 107 (82), 161 (66), 69 (53), 136 (48)	69 (100), 93 (96), 107 (61), 71 (47), 136 (46)
	2198	1381	4-Chlor-3-methoxybenzaldehyde	169 (100), 170 (87), 171 (36), 172 (31), 141 (15)	169 (100), 170 (84), 171 (39), 172 (31), 45 (21)

## Fortsetzung Tabelle A 4

# (AEVA)	RI Standard		Verbindung	$m/z$ (relative Intensität [%]) MS-Spektrum	
	VF-WAXms	DB-5 ms		Probe	Standard
2303		1456	1-(4-Methoxyphenyl)- 1,2-propandion	135 (100), 136 (14), 77 (15), 107 (13), 63 (5)	135 (100), 77 (15), 92 (9), 136 (9), 107 (9)
2867			<i>p</i> -Anissäure	152 (100), 135 (96), 137 (33), 77 (12), 92 (9)	152 (100), 135 (62), 58 (29), 77 (16), 45 (13)
3062		1807	4,6-Dimethoxyphthalid	165 (100), 194 (72), 137 (17), 43 (12), 77 (11)	165 (100), 194 (68), 137 (18), 193 (10), 166 (10)

n. b. nicht bestimmt

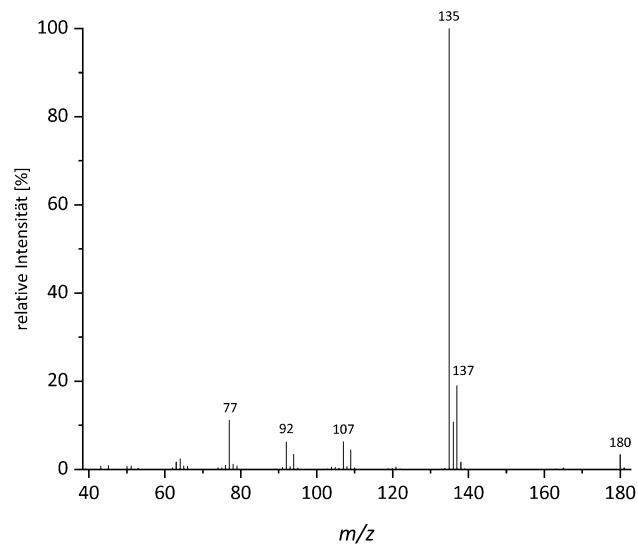
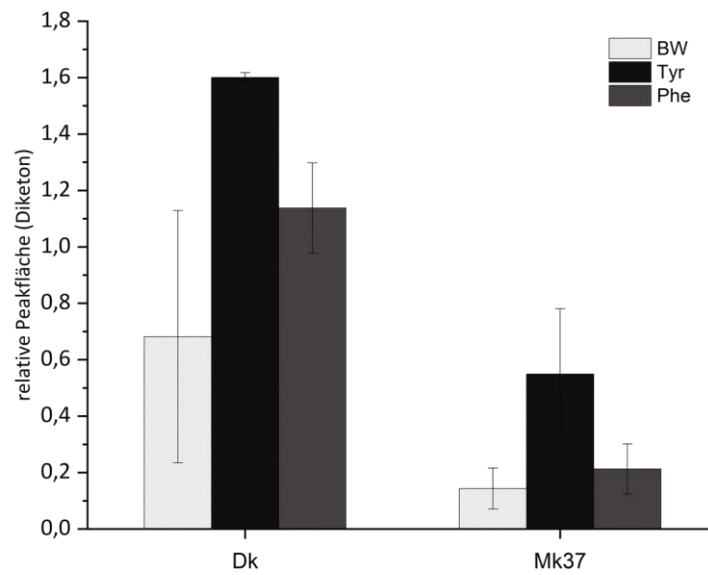
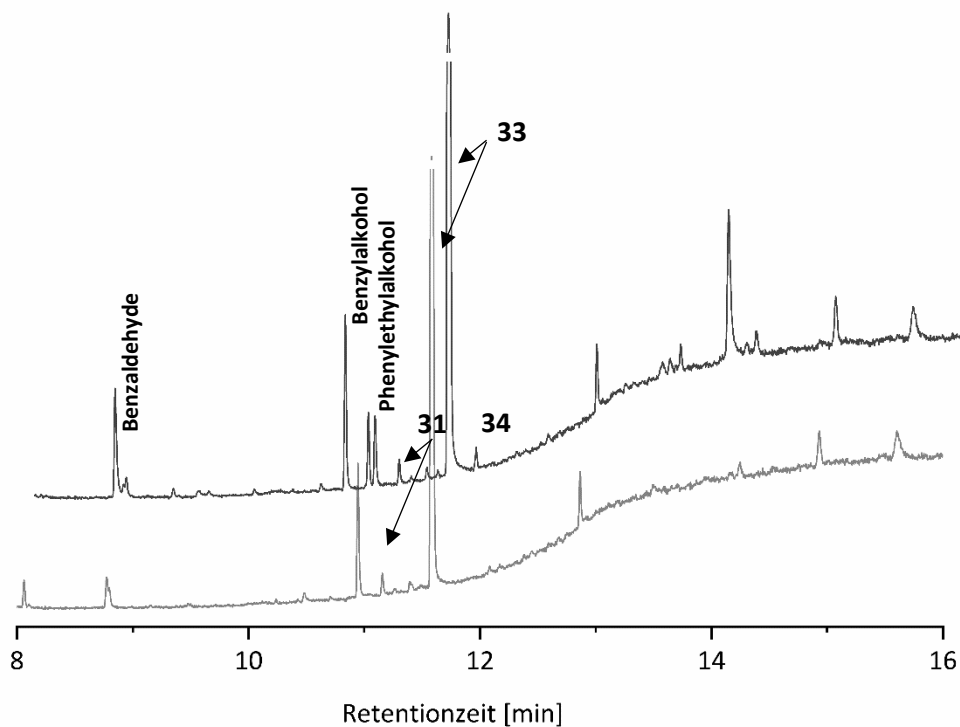


Abbildung A 7: Massenspektrum des 2-HPP



**Abbildung A 8: Induktion der Bildung des Diketons durch PSA Dk und PSA Mk 37 unter Zusatz von L-Phenylalanin (Phe) und L-Tyrosin (Tyr) in statischer Kultivierung**



**Abbildung A 9: Ausschnitte der Chromatogramme der Schüttelkultivierung des PSA Dk unter Zusatz von L-Phenylalanin (hinten) im Vergleich zur Kultivierung ohne Supplementation von L-Phenylalanin (vorn)**