

Biotechnologische Konversion von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu hochwertigen Aromastoffen durch Basidiomyceten

Dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

Katrin Kunkel

geboren am 24. Mai 1984 in Dieburg

2013

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerda Morlock

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, 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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, Januar 2013

Katrin Kunkel

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Zorn danke ich für die Bereitstellung des Themas, den gewährten Freiraum während dessen Bearbeitung sowie für die wissenschaftliche Betreuung und die tollen Arbeitsbedingungen am Institut. Frau Prof. Dr. Gerda Morlock danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Siegfried Schindler und Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell danke ich für die Mitarbeit in der Prüfungskommission.

Besonderer Dank gilt außerdem Dr. Marco Fraatz für die vielen wissenschaftlichen Gespräche, Anregungen und Tipps während der Zeit im Labor und beim Schreiben dieser Arbeit.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (AiF 299-ZN) danke ich für die finanzielle Förderung eines Teils dieser Arbeit. Bei Elbtal Tiefkühlkost und der Symrise AG bedanke ich mich für die Bereitstellung der eingesetzten Substrate.

M.Sc. Anika Portz danke ich für die praktische Unterstützung bei den Kopfraumuntersuchungen des β -Carotinabbaus durch MsP1.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie möchte ich mich für das freundschaftliche Miteinander und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders möchte ich mich bei meinen Büro- und Laborpartnern Alexander Heuger, Andrea Bosse, Christiane Lauber, Katharina Schmidt, Nicole Mika und Stephanie Riemer für eine schöne und lehrreiche gemeinsame Zeit bedanken.

Mein größter und herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die an mich glauben und mich auf meinem Weg durchs Leben immer unterstützen.

Veröffentlichungen

Publikationen

Kunkel K, Bosse AK, Fraatz MA, Zorn H (2011) Produktion natürlicher Aromen mit Basidiomyceten. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung. Jahrgang 63, Vol 11 (Seiten 383-384)

Schmidt K, Kunkel K, Szweda R, Portz A, Fraatz MA, Zorn H (2012) Biotechnological production of norisoprenoid aroma compounds. 243rd American Chemical Society National Meeting & Exposition, San Diego, USA *in press*

Zorn H, Berger RG, Kunkel K, Bosse A, Fraatz MA (2011) Biotechnological applications of production streams: basidiomycetes as aroma-producers. In: Häusser V, Kinkel D (Hrsg.) Industrielle Gemeinschaftsforschung: Instrument des Innovativen Mittelstands, Aktuelle Beiträge aus FEI-Projekten, Dokumentation der FEI-Jahrestagung. Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (Seiten 75-84)

Tagungsbeiträge

Kunkel K, Bosse AK, Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (2011) Biotransformation lignocellulose- und carotinoidhaltiger Substrate zu natürlichen Aromastoffen durch Basidiomyceten. Lebensmittelchemie 65:145-176 (Seite 169)

Fraatz MA, Kunkel K, Bosse A, Berger RG, Zorn H (2011) Novel fermentation concepts for natural flavour production. In: ECCE/ECAB, 1st European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, 25-29. September 2011

Kunkel K, Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (2011) Maßstabvergrößerung der biotechnologischen Darstellung natürlicher Aromen durch Fermentation von Karottenschalen mit dem Basidiomyceten *Wolfiporia cocos*. In: Häusser V, Kinkel D (Hrsg.) Industrielle Gemeinschaftsforschung: Instrument des Innovativen Mittelstands, Aktuelle Beiträge aus FEI-Projekten, Dokumentation der FEI-Jahrestagung. Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (Seiten 133-134)

Kunkel K, Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (2011) Biotransformation carotinoidhaltiger Substrate zu natürlichen Aromastoffen mit Hilfe von Basidiomyceten. Lebensmittelchemie 65:17-48 (Seite 32)

Zusammenfassung

29 Basidiomyceten wurden hinsichtlich der Bildung von natürlichen Aromastoffgemischen in Substrat-supplementierten Submerskulturen untersucht. Als Substrate dienten Karottenschalen, Blattspinat, Sellerietrester, Zwiebelschalen, Lauchtrester und Zitruspellets, die als Reststoffe in der lebensmittelverarbeitenden Industrie anfallen. Die Geruchseindrücke von 61 Biotransformationen wurden im Vergleich zu den Substrat- und Pilz-Blindwerten beurteilt und die Reproduzierbarkeit der ansprechendsten Biotransformationen überprüft. Die vielversprechendsten Geruchseindrücke wurden durch die Biotransformationen von Karottenschalen durch die essbaren Basidiomyceten *Lentinula edodes* und *Wolfiporia cocos* erhalten. Der Geruchseindruck der Transformation durch *W. cocos* wurde als „Orange, fruchtig, blumig, Nivea-Creme und frisch“ beschrieben. Die Analyse der gebildeten flüchtigen Verbindungen erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie und Gaschromatographie-Olfaktometrie.

In der Biotransformation durch *W. cocos* wurden von elf olfaktometrisch detektierten Verbindungen durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse für Linalool (FD-Faktor 64, 70 $\mu\text{g L}^{-1}$) und 2-Phenylethanol (FD-Faktor 64, 560 $\mu\text{g L}^{-1}$) die höchsten FD-Faktoren ermittelt. Das zur Biotransformation verwendete Medium wurde in Bezug auf die Kosten bei gleichbleibendem Geruchseindruck optimiert. Auf zusätzliche Stickstoffquellen in Form von Ammoniumnitrat oder Natriumascpartat konnte vollständig verzichtet werden. Ebenso war die Zugabe einer Vitamin-Lösung zur Bildung des Geruchseindrucks nicht notwendig. Die Kosten des Mediums wurden durch diese Maßnahmen um circa 98% gesenkt.

Drei β -Carotin-Abbauprodukte – β -Ionon, 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid – wurden in der Biotransformation massenspektrometrisch detektiert. β -Ionon wurde in der Biotransformation und im Substrat-Blindwert auch olfaktometrisch wahrgenommen. Die Dihydroactinidiolid-Konzentration wurde von ca. 240 $\mu\text{g L}^{-1}$ im Substrat-Blindwert auf ca. 440 $\mu\text{g L}^{-1}$ in der Biotransformation gesteigert.

Eine Maßstabsvergrößerung des optimierten Systems um den Faktor 30 zeigte einen identischen Geruchseindruck und vergleichbare Gehalte der olfaktometrisch detektierten Verbindungen und bestätigte damit die Möglichkeit einer Anwendung im technischen Maßstab.

Die Spaltung von β -Carotin durch die „DyP-type“-Peroxidase MsP1ⁱ zu β -Ionon, β -Cyclocitral, 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid im geschlossenen System wurde optimiert und ein Abbau von 97% β -Carotin erreicht. Die Ausbeute der gebildeten Norisoprenoide betrug ca. 15 mol%. Die Transformation unbehandelter Karottenschalen mit MsP1 in einem Ein-Enzym-System führte im Vergleich zu einem Blindwert nicht zu einem gesteigerten β -Carotin-Abbau.

ⁱaus *Mycetinis scorodonius*, in *Aspergillus niger* heterolog exprimiert

Abstract

To produce natural flavor mixtures, 29 basidiomycetes were cultivated in submerged culture with six different industrial by-products as sole carbon-source. Carrot peels, spinach leaves, celeriac pomace, bulb peels, leek pomace and citrus pulpe pellets served as substrates. The odor impressions were examined considering the substrate blanks and the fungus blanks.

The most pleasant aroma was obtained with the biotransformation of carrot peels by *Wolfiporia cocos*. The odor impression was described as “orange, creamy, fruity and fresh”. The volatile compounds were analyzed by means of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry.

By means of aroma extract dilution analysis, linalool (FD-factor 64, 70 $\mu\text{g L}^{-1}$) and 2-phenylethanol (FD-factor 64, 560 $\mu\text{g L}^{-1}$) were found to have the highest flavor dilution factor. With regard to the costs, the biotransformation medium was optimized while maintaining the flavor impression. The addition of ammonium nitrate and sodium aspartate as nitrogen-sources was not necessary. Likewise, the addition of the vitamine solution could be omitted. Finally, the total costs of the medium were reduced by approximately 98%.

Three degradation products of β -carotene – β -ionone, 5,6-epoxy- β -ionone and dihydroactinidiolide – were detected by means of gas chromatography-mass spectrometry. β -Ionone was olfactometrically detected in the biotransformation as well as in the substrate blank. An increase of the concentration of dihydroactinidiolide from about 240 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the blank to about 440 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the biotransformation with *W. cocos* was determined.

A scale-up of the optimized system by a factor of 30 with comparable yields of the same olfactometrically detected compounds confirmed the possibility of using an industrial scale.

The cleavage of β -carotene by the “*DyP-type*” peroxidase MsP1ⁱⁱ was studied in an enclosed system. β -Ionone, β -cyclocitral, 5,6-epoxy- β -ionone and dihydroactinidiolide were detected as degradation products. Under optimized conditions, 97% of the β -carotene were degrade. The yields of the norisoprenoid compounds amounted to 15 mol%. The differences between biotransformation in submerged culture and transformation of carrot peels in a single-enzyme-system were examined. The gas

ⁱⁱfrom *Mycetinis scorodonius*; heterologously expressed in *Aspergillus niger*

chromatographic-mass spectrometric analysis of the transformation with MsP1 showed no differences to the blank-system without enzyme. MsP1 was not able to degrade β -carotene in a complex matrix like carrot peels.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Bisherige Kenntnisse.....	1
1.2 Zielsetzung.....	5
2 Material und Methoden	7
2.1 Chemikalien	7
2.1.1 Bestandteile der Nährmedien.....	7
2.1.2 Referenzsubstanzen	8
2.1.3 Sonstige Chemikalien und Lösungsmittel.....	9
2.1.4 Gase.....	10
2.2 Geräte und sonstige Hilfsmittel	10
2.2.1 Rührkesselreaktor	11
2.3 Verwendete Mikroorganismen.....	12
2.4 Substrate.....	14
2.4.1 Substratvorbehandlung	15
2.4.2 Bestimmung der Restfeuchte	16
2.4.3 Bestimmung des Gehaltes an direkt reduzierenden Zuckern nach Luff-Schoorl.....	16
2.4.4 Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl.....	17
2.5 Kultivierung von Basidiomyceten	18
2.5.1 SNL-H-Medium und SNL-H-Agar	18
2.5.2 Spurenelementlösung	18
2.5.3 Biotransformation carotinoidreicher Substrate und Substrat-Blindwerte ..	18
.....	18
2.5.4 Biotransformation weiterer Substrate und Substrat-Blindwerte	19
2.5.5 Pilz-Blindwert	19
2.5.6 Reduzierte Medien für die Biotransformation	20
2.5.7 Stammhaltung Basidiomyceten.....	20
2.5.8 Vorkultur.....	21
2.5.9 Kulturführung Biotransformation und Substrat-Blindwert.....	22

2.5.10	Kulturführung Pilz-Blindwert	22
2.6	Biotransformation im 7,5-L-Fermenter.....	23
2.6.1	Vorkultur.....	23
2.6.2	Hauptkultur.....	23
2.7	Screening.....	23
2.7.1	Kulturbegleitende sensorische Analyse.....	24
2.7.2	Gesamtsensorik	24
2.8	Bestimmung des Kulturparameters pH-Wert.....	24
2.9	Probenvorbereitung.....	24
2.9.1	Extraktion der Submerskulturen	25
2.9.2	Festphasenmikroextraktion im Kopfraum von Kulturkolben	25
2.9.3	Festphasenmikroextraktion nach Transformation mit MsP1.....	26
2.10	Gaschromatographie.....	26
2.10.1	Gaschromatographie mit on-column-Injektion, Olfaktometrie Detektor Port und Flammenionisationsdetektor (GC-FID-O)	27
2.10.2	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor (GC-MS).....	27
2.10.3	Gaschromatographie-Olfaktometrie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (GC-MS-MS-O).....	28
2.10.4	Berechnung des Retentionsindex nach Kováts.....	30
2.10.5	Bestimmung der Response-Faktoren.....	31
2.10.6	Quantifizierung ausgewählter Aromastoffe.....	32
2.11	Bestimmung der Hauptaromakomponenten durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA).....	33
2.12	Berechnung der Aromawerte (<i>odor activity value</i> , OAV).....	33
2.13	Aromarekombination	34
2.14	Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten.....	34
2.14.1	Isolierung genomischer DNA.....	34
2.14.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.14.3	DNA-Fragmentisolierung.....	35
2.15	MsP1-katalysierte Umsetzung von β -Carotin	36
2.15.1	Bestimmung der Enzymaktivität (β -Carotin-Assay).....	36

2.15.2	Photometrische Bestimmung des β -Carotin-Verbrauchs.....	37
2.15.3	Transformation mit MsP1	38
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Substratanalytik.....	41
3.1.1	Restfeuchte	41
3.1.2	Direkt reduzierende Zucker nach Luff-Schoorl	42
3.1.3	Rohprotein nach Kjeldahl	43
3.2	Screening.....	44
3.2.1	Carotinoidreiche Substrate.....	44
3.2.2	Weitere Substrate.....	47
3.2.3	Pilz-Blindwerte	49
3.3	Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten.....	50
3.3.1	Molekularbiologische Identifizierung von Stamm 389.89.....	50
3.3.2	Molekularbiologische Identifizierung von Stamm 279.55.....	51
3.4	Biotransformation von Karottenschalen durch <i>L. edodes</i>	52
3.4.1	Gesamtsensorik	52
3.4.2	Kulturparameter	52
3.4.3	Detektion und Identifizierung aromaaktiver Verbindungen	53
3.5	Biotransformation von Karottenschalen durch <i>W. cocos</i>	57
3.5.1	Gesamtsensorik	57
3.5.2	Kulturparameter	58
3.5.3	Detektion und Identifizierung aromaaktiver Verbindungen	59
3.5.4	FD-Faktoren und Aromawerte.....	61
3.5.5	Vergleich mit Blindwerten.....	62
3.6	Optimierung der Kulturparameter	65
3.6.1	Verwendung unbehandelter Karottenschalen	65
3.6.2	Medienoptimierung.....	70
3.6.3	Dotierung mit L-Phenylalanin.....	81
3.6.4	Maßstabsvergrößerung	82
3.7	Rekombination	85

3.8	Festphasenmikroextraktion	85
3.8.1	Methodenvergleich	85
3.8.2	Kinetik der Aromabildung	88
3.9	β -Carotin-Abbau durch die „DyP-type“-Peroxidase MsP1	91
3.9.1	Umsetzung von β -Carotin.....	91
3.9.2	Transformation unbehandelter Karottenschalen	96
4	Diskussion	99
4.1	Biotransformationen	101
4.2	Biosynthesewege	112
4.3	β -Carotin-Abbau	118
4.4	Optimierung der Biotransformation von Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> .	122
4.4.1	Optimierung der Medienzusammensetzung.....	123
4.4.2	Dotierung mit L-Phenylalanin.....	125
4.5	Maßstabsvergrößerung	127
4.6	β -Carotin-Abbau durch MsP1	127
5	Ausblick	131
6	Literatur.....	133
7	Anhang.....	145

Abkürzungsverzeichnis

AD	Außendurchmesser
AEVA	Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse
Biotrans.	Biotransformation
BS	Blattspinat
BW	Blindwert
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CCO	carotinoid-spaltende Oxygenasen
CPP	Zitruspellets
d	Tage
dest.	destilliert
DHA	Dihydroactinidiolid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronenvolt
FD-Faktor	Verdünnungsfaktor (<i>flavor dilution</i>)
FID	Flammenionisationsdetektor
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GC-FID-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS-MS-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie mit Tandemmassenspektrometrie
HS	Kopfraum (<i>headspace</i>)
ID	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Region</i>
KI	Retentionsindex nach Kováts
Konz.	Konzentration
KS	Karottenschalen
lit.	Buchstabe

LT	Lauchtrester
M1	Medium für Biotransformation und Substrat-Blindwert
M2	Medium für Pilz-Blindwert
M9	optimiertes Medium für Biotransformation und Substrat-Blindwert
M11	optimiertes Medium für Pilz-Blindwert
MS	Massenspektrometrie
MsP1	Peroxidase 1 aus <i>Mycetinis scorodonius</i>
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
OAV	Aromawert (<i>odor activity value</i>)
ODP	Olfaktometrie Detektor Port
VO	Verordnung
pA	Pikoampère
p. a.	<i>pro analysi</i> (für analytische Zwecke)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
Skt	Skalenteile
SNL-H	Standardnährlösung
SPME	Festphasenmikroextraktion (<i>solid phase microextraction</i>)
S/SL	split/splitless
ST	Sellerietrester
sublit.	Unterbuchstabe
TM	Trademark
TM	Trockenmasse
U	<i>Unit</i>
v/v	Volumen pro Volumen
ZS	Zwiebelschalen

Die Abkürzungen der untersuchten Basidiomyceten sind in Abschnitt 2.3 aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Bisherige Kenntnisse

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts nehmen biotechnologische Anwendungen in der chemischen Industrie stetig zu. Die industrielle Biotechnologie – auch Weiße Biotechnologie genannt – liefert alternative Verfahren zu den gängigen chemischen Syntheseverfahren unter Nutzung von lebenden Zellen und Enzymen (Frazzetto 2003). 1908 wurde Oropon, eine Enzymmischung zum Abbau von Proteinen als Trockenpräparat auf Holzmehl erstmals zur Ledergerbung eingesetzt und löste Beizen aus Hundekot und Taubenmist ab (Marschall 2000).

Heutzutage werden Enzyme in vielen weiteren Bereichen eingesetzt. In der Lebensmittelindustrie finden sie unter anderem zur Stabilisierung von Schäumen, zum Klären von Fruchtsäften, zur Bildung von Aromen und zur Stärkeverzuckerung Anwendung. Bei der Kontaktlinsenreinigung werden Enzyme zur Zersetzung von Ablagerungen aus dem Tränenfilm des Auges genutzt und in Waschmitteln sorgen sie dafür, dass Fett- oder Eiweißflecken bei niedrigen Temperaturen entfernt werden.

Bei der Käseherstellung (z. B. Cheddar-Herstellung) fallen große Mengen gefärbter Molke als Nebenprodukt an, die ohne Entfärbung nicht weiter verwendet werden können. Das Enzym MaxiBright™ (Royal DSM, Delft, Niederlande) ist in der Lage, die zugesetzten Farbstoffe (z. B. Annatto) zu spalten und somit die Molke zu entfärben. Bei MaxiBright™ handelt es sich um die „DyP-type“-Peroxidase MsP1 (dye decolorizing = Farbstoff entfärbend), die ursprünglich aus dem Basidiomyceten *Mycetinis scorodonius* (Echter Knoblauchschwinding) isoliert wurde (Scheibner *et al.* 2008). Die Fähigkeit von *M. scorodonius*, β -Carotin zu spalten, wurde durch Arbeiten von Zorn *et al.* (2003a) in einem Screening von mehr als 50 Pilzen auf β -carotinhaltigen Agar-Platten festgestellt. Die Abbauprodukte der Umsetzung von β -Carotin mit MsP1 sind unter anderem die Aromastoffe β -Ionon, 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid (Zelena *et al.* 2009). Die erfolgreiche Isolierung, Reinigung und Charakterisierung des Enzyms ermöglichte die heterologe Expression und somit die industrielle Nutzung (Scheibner *et al.* 2008).

Die Synthese von Aromastoffen durch Basidiomyceten kann entweder durch Bio-transformation spezifischer Substrate oder *de novo* stattfinden (Janssens *et al.*

1992). *Ischnoderma benzoinum* (Schwarzgebänderter Harzporling) ist in der Lage, die bekannten Aromastoffe Benzaldehyd und Anisaldehyd *de novo* zu synthetisieren (Berger *et al.* 1987). In Flüssigkulturen von *Pleurotus euosmus* werden Linalool und Cumarin *de novo* gebildet und prägen maßgeblich das Aroma (Drawert *et al.* 1983). Bei den *de novo* oder durch Biotransformation gebildeten Aromastoffen handelt es sich um natürliche Aromastoffe gemäß Art. 3 Abs. 2 lit. c der Verordnung (EG) 1334/2008. Da der Verbraucher immer mehr Wert auf Natürlichkeit seiner Lebensmittel und Konsumgüter legt, gewinnen alternative Synthesewege zu natürlichen Inhaltsstoffen für die Industrie zunehmend an Bedeutung.

Verglichen mit den Aromen anderer Mikroorganismen ist das Spektrum der von Basidiomyceten gebildeten Aromastoffe dem der Pflanzen am nächsten und wird durch die Möglichkeit der Biotransformation von Aromavorstufen wie z. B. β -Carotin noch vergrößert (Abraham und Berger 1994; Krings *et al.* 1995). Basidiomyceten verfügen über eine einzigartige Enzymausstattung, mit der sie sich an unterschiedliche Kohlen- oder Stickstoffquellen anpassen und so komplexe Substrate wie Holz oder Stroh abbauen können (Bouws *et al.* 2008).

Ein Beispiel für die biotechnologische Herstellung eines Aromastoffes durch Transformationen von spezifischen Vorläufermolekülen durch Mikroorganismen ist Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd). Vanillin ist der mengenmäßig wichtigste Aromastoff und kann über einen Zwei-Stufen-Prozess aus Ferulasäure gewonnen werden. Dazu erfolgt zuerst die Transformation der Ferulasäure zu Vanillinsäure durch *Aspergillus niger* und im Anschluss die Reduktion zu Vanillin durch *Pycnoporus cinnabarinus* (Lesage-Meessen *et al.* 1996). Durch Optimierung der Reduktionsbedingungen und die Adsorption von Vanillin wurde die Ausbeute von ursprünglich ca. 200 mg L⁻¹ auf ca. 1.500 mg L⁻¹ gesteigert (Stentelaire *et al.* 2000).

Das Interesse der Aromenindustrie an der biotechnologischen Herstellung von Aromen als kostengünstige Alternative zu herkömmlichen Verfahren ist in den Fällen besonders groß, in denen traditionelle Methoden sehr teuer sind. Da die gewünschten natürlichen Aromastoffe meist nur in sehr geringen Konzentrationen in Pflanzen vorkommen, ist der Preis für deren Extraktion aufgrund des Bedarfs großer Mengen Pflanzenmaterials entsprechend hoch. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass die Qualität des Pflanzenmaterials durch wechselnde klimatische Gegebenheiten jährlich schwankt. Auch Missernten wegen schlechten Wetters oder Schädlingsbefall führen zu einer Erhöhung der Kosten.

Die C13-Norisoprenoide wie β -Ionon oder β -Damascenon gehören ebenfalls zu der Gruppe interessanter Aromastoffe, für die eine biotechnologische Alternative zur Herstellung gesucht wird. Auf Grund ihres niedrigen Schwellenwertes von 0,007 ppb (β -Ionon) und 0,002 ppb (β -Damascenon) sind sie sehr potente Aromastoffe mit einem angenehm blumig, fruchtigen Geruch (Winterhalter und Rouseff 2002). Die C13-Norisoprenoide entstehen durch oxidativen Abbau, zum Teil über mehrere Zwischenstufen, aus Carotinoiden. Neben Verbindungen mit einem C13-Grundgerüst, die durch die Spaltung zwischen den Kohlenstoffatomen 9 und 10 bzw. 9' und 10' entstehen, führt der Bindungsbruch an anderen Stellen z. B. zu C10- oder C11-Körpern (Abb. 1.1).

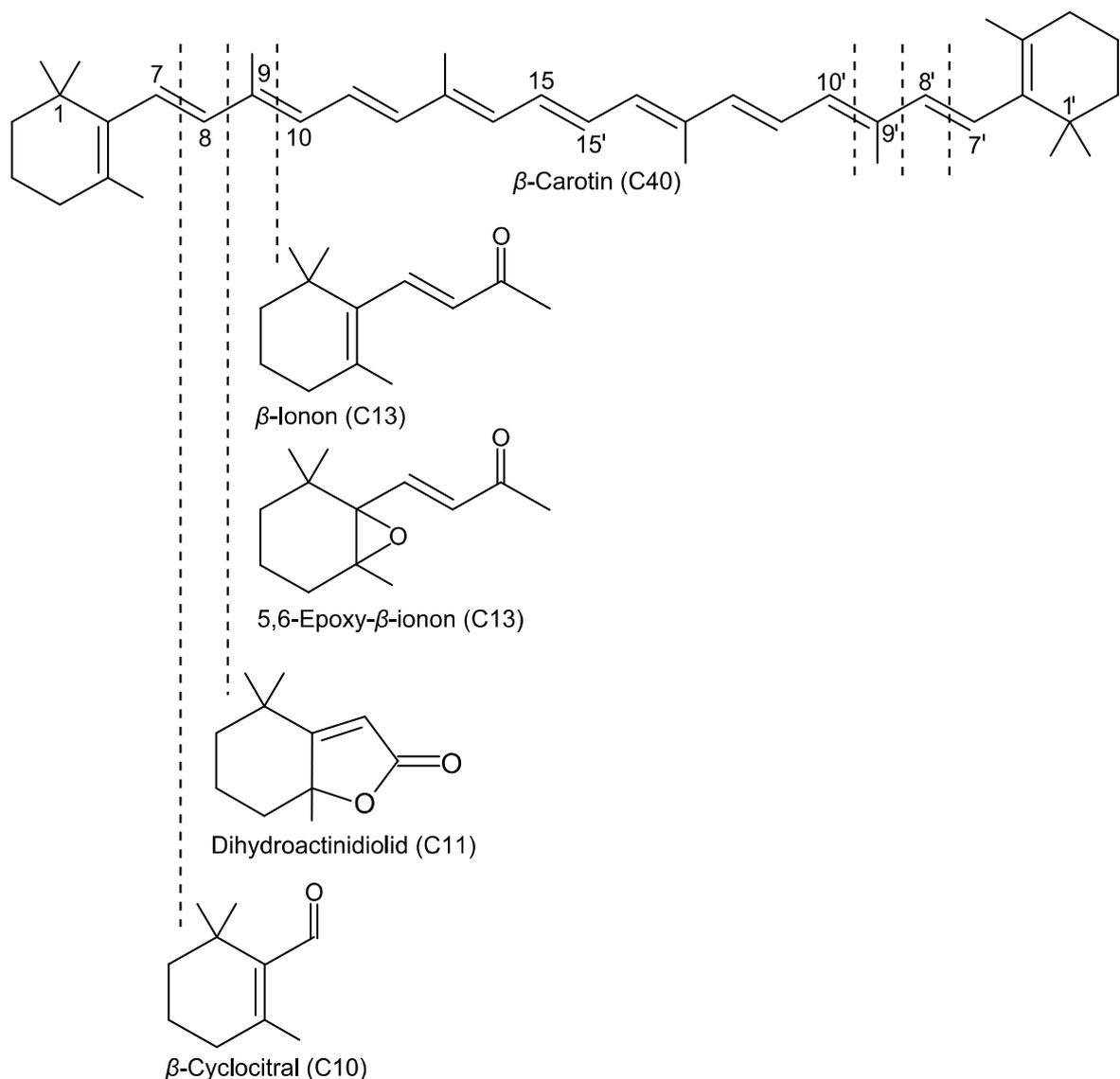


Abb. 1.1: Übersicht möglicher β -Carotin-Abbauprodukte mit C10-, C11- und C13-Grundgerüst

Der Abbau von Carotinoiden kann enzymatisch und/oder nicht-enzymatisch ablaufen. Der nicht-enzymatische Abbau erfolgt meist unspezifisch durch Autoxidation, Photooxygenierung oder durch thermischen Abbau. Am enzymatischen Abbau von Carotinoiden sind carotinoid-spaltende Oxygenasen (CCO), Lipoxygenasen, Xanthinoxidasen und/oder Peroxidasen beteiligt (Wu *et al.* 1990, Bosser und Belin 1994, Waché *et al.* 2002). Jedoch ist über den genauen Syntheseweg bisher wenig bekannt. Kloer und Schulz (2006) beschreiben den möglichen Abbau von Carotinoiden durch CCOs über ein Epoxid als Zwischenstufe für Monooxygenasen und über ein Dioxetan als Intermediat für Dioxygenasen. Für die versatile Peroxidase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus eryngii* wird der Abbau über ein Hydroperoxid mit anschließender Hock-Umlagerung und Kettenbruch vermutet (Zorn *et al.* 2003b).

In den meisten Fällen läuft die Bildung von Aromastoffen aus Carotinoiden durch Oxygenasen in drei Stufen ab. Der erste Schritt ist die Spaltung des Carotinoids, gefolgt von der Transformation der Aromapräkursoren und anschließender Konversion in die aromaaktive Form. Die Synthese von β -Damascenon aus Neoxanthin erfolgt z. B. nach diesem Schema, bei der als erstes Zwischenprodukt das Gras- β -hüpf-Keton entsteht. Säurekatalysiert wird dann im zweiten Schritt aus dem Keton das β -Damascenon gebildet. α - oder β -Ionon hingegen werden direkt durch die Spaltung an C9-10 erhalten (Winterhalter und Rouseff 2002).

In vielen Pflanzen sind Carotinoide verantwortlich für die Farben der Blüten oder der Früchte (Tomaten, Karotten, Paprika, Spinat). Die Farbvielfalt ist abhängig von der Zusammensetzung der Carotinoide und reicht von gelb, orange, zu rot oder auch pink (Lewinsohn *et al.* 2005). In Karotten liegt der Carotinoidgehalt (Summe aus Lycopin, Lutein, α - und β -Carotin) bei ca. $80 \text{ mg (100 g)}^{-1}$ Trockenmasse, wobei α - und β -Carotin mengenmäßig dominieren (Sun *et al.* 2009). In Spinat liegt der Carotinoidgehalt (Lutein und β -Carotin) zwischen vier und acht mg (100 g)^{-1} Feuchtmasse, was ca. 44 bis $88 \text{ mg (100 g)}^{-1}$ Trockenmasse entspricht (Reif *et al.* 2012).

Bei der Verarbeitung zu Lebensmitteln fallen jährlich viele Tonnen carotinoidreicher Reststoffe in der Lebensmittelindustrie an, die zurzeit thermisch entsorgt werden oder als Futtermittel Verwendung finden. Diese Reststoffe können als günstige Rohstoffquellen für Carotinoide verwendet werden und z. B. für die Biotransformation durch Mikroorganismen eingesetzt werden. Dass die Nebenprodukte zur Biotransformation durch Basidiomyceten geeignet sind, zeigt die Transformation von

(+)-Valencen, einem Sesquiterpen, das bei der Orangensafttherstellung anfällt, zu dem hochwertigeren Aromastoff (+)-Nootkaton durch *Pleurotus sapidus* (Fraatz *et al.* 2009).

1.2 Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Gewinnung natürlicher Aromagemische durch Biotransformation carotinoidreicher Reststoffe der Industrie mit Basidiomyceten. Dazu sollten in einem Screening Basidiomyceten ermittelt werden, die in der Lage sind, durch Biotransformation der eingesetzten Substrate wohlriechende Aromen zu generieren. Die carotinoidreichen Reststoffe Karottenschalen und Blattspinat sowie die Nebenströme Sellerietrester, Zwiebelschalen, Lauchtrester und Zitruspellets wurden als Substrate eingesetzt.

Zur Erfassung geruchsaktiver Verbindungen sollten die Proben mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie untersucht werden. Mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie sollten die sensorisch detektierten Verbindungen identifiziert und die Hauptaromakomponenten durch eine Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse bestimmt werden. Eine Medienoptimierung zur Verschlinkung und Kostenreduzierung des Nährmediums wurde aus ökonomischen Gründen angestrebt. Die Aromawerte sollten errechnet und auf den Grundlagen der Analysenergebnisse durch Rekombination das Aromaprofil rekonstruiert werden. Abschließend sollte durch Maßstabsvergrößerung die Möglichkeit der industriellen Anwendung überprüft werden.

Zum anderen sollte der β -Carotin-Abbau durch die „DyP-type“-Peroxidase MsP1 im geschlossenen System untersucht und optimiert werden. Die Erfassung der flüchtigen Abbauprodukte sollte mittels Kopfraum-Festphasenmikroextraktion mit anschließender gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

2.1.1 Bestandteile der Nährmedien

Tab. 2.1: Bestandteile der Nährmedien

Substanz	Reinheit	Hersteller
Agar-Agar Kobe I		Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumnitrat	98%	Acros Organics, Nidderau
L-Asparagin-Monohydrat	<i>research grade</i>	Serva, Heidelberg
BME Vitamin 100x Lösung*		Sigma Aldrich, Taufkirchen
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	p. a.	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	≥ 99%	Carl Roth
D-(+)-Glucose-Monohydrat	für die Mikrobiologie	Carl Roth
Hefeextrakt	reinst	Fisher Scientific, Schwerte
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p. a.	Carl Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	p. a.	AppliChem
Magnesiumsulfat-Monohydrat	reinst	Carl Roth
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	p. a.	AppliChem
Natriumaspargat-Monohydrat	für biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen	p. a.	AppliChem
L-Phenylalanin	99%	Carl Roth
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	p. a.	AppliChem

*enthält: Natriumchlorid, D-Biotin, Cholinchlorid, Folsäure, myo-Inositol, Nicotinamid, Riboflavin, D-Pantothensäure-Calciumsalz, Pyridoxal-Hydrochlorid, Thiamin-Hydrochlorid

2.1.2 Referenzsubstanzen

Tab. 2.2: Referenzsubstanzen

Substanz	Reinheit	Hersteller
Benzylalkohol	reinst Ph. Eur., NF	AppliChem
β -Caryophyllen	Rotichrom GC	Carl Roth
β -Cyclocitral	90%	Sigma Aldrich
2-Decanon	98%	Sigma Aldrich
Essigsäure	100%	Fischer Scientific
2-Furanmethanol	99%	Sigma Aldrich
(<i>E</i>)-Geraniol	97%	Alfa Aesar, Karlsruhe
Heptanal	97%	Alfa Aesar
2-Heptanol	98%	Sigma Aldrich
2-Heptanon	99%	Sigma Aldrich
Hexanal	98%	Alfa Aesar
1-Hexanol	98%	Acros Organics
α -Ionon	rein	Carl Roth
β -Ionon	purum $\geq 95\%$ (GC)	Sigma Aldrich
Linalool	97%	Acros Organics
DL-2-Methyl-1-butanol	100%	Acros Organics
3-Methyl-1-butanol	98%	Sigma Aldrich
3-Methyl-3-buten-1-ol	97%	Sigma Aldrich
Nerol	97%	Acros Organics
2-Nonanol	99%	Sigma Aldrich
2-Nonanon	99%	Acros Organics
Octanal	99%	Fischer Scientific
1-Octanol	puriss. $\geq 99,5\%$ (GC)	Fluka
DL-3-Octanol	97%	Acros Organics
2-Octanon	98%	Sigma Aldrich
3-Octanon	98%	Alfa Aesar
1-Octen-3-ol	98%	Sigma Aldrich

Substanz	Reinheit	Hersteller
2-Phenylethanol	99%	Acros Organics
Thymol	Rotichrom [®] GC	Carl Roth

2.1.3 Sonstige Chemikalien und Lösungsmittel

Tab. 2.3: Sonstige Chemikalien und Lösungsmittel

Substanz	Reinheit	Hersteller
Agarose LE	-	Biozym, Hessisch Oderdorf
Borsäure	≥ 99,5%, Ph. Eur.	Carl Roth
β -Carotin	≥ 97%	Sigma Aldrich
Citronensäure-Monohydrat	100%	Carl Roth
Dichlormethan	≥ 99,5%	Carl Roth
Diethylether	Rotipur [®] ≥ 99,5% p. a.	Carl Roth
Essigsäure	100%	Fisher Scientific
Iod	reinst.	AppliChem
Kaliumhexacyanoferrat(III)- Trihydrat	≥ 99%	Carl Roth
Kaliumiodid	100%	Carl Roth
Kjeldahl-Katalysatortabletten	quecksilber- und selenfrei	Carl Roth
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	≥ 99%	Carl Roth
Natriumacetat	p. a.	AppliChem
Natriumhydrogencarbonat	100%	Fisher Scientific
Natriumsulfat	≥ 99%	Carl Roth
Natriumthiosulfat Maßlösung 0,1 M	-	Carl Roth
Pentan	99%	Fisher Scientific
1,2-Propandiol	100%	Sigma Aldrich
Rot [®] -Nanoquant	-	Carl Roth
Salzsäure	25%	Carl Roth
Salzsäure Maßlösung 0,1 M	-	Carl Roth
Schwefelsäure	98%	Carl Roth

Substanz	Reinheit	Hersteller
Sher-Indikator	-	Büchi Labor-technik, Essen
Stärke, löslich	-	Carl Roth
Tween [®] 80	reinst	Carl Roth
Wasserstoffperoxid	30%	Sigma Aldrich
Zinkacetat-Dihydrat	reinst	AppliChem

Pentan und Diethylether wurden vor der Verwendung destilliert.

2.1.4 Gase

Tab. 2.4: Gase

Gas	Qualität	Lieferant
Helium	5.0	Praxair, Düsseldorf
Stickstoff	5.0	Praxair
Wasserstoff	5.0	Praxair

2.2 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Hier nicht aufgeführte Geräte werden in den jeweiligen Methoden spezifiziert.

Tab. 2.5: Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik, Magdeburg
Autoklav	Laboklav 150 MSL	SHP Steriltechnik
Dispergiergerät	T 25 digital Ultra-Turrax [®]	IKA, Staufen
Dispergierwerkzeug	S 25 N – 18 G	IKA
Feuchtebestimmer	MA 35	Sartorius, Göttingen
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD plus	Christ, Osterode am Harz
Geldokumentation	DeVision G	Decon Science Tec, Hohengarten

Gerät	Modell	Firma
Gelkammer	PerfectBlue Mini S	Peqlab, Erlangen
Inkubationsschüttler	Multitron	Infors, Einsbach
Inkubator	INE 500	Memmert, Schwabach
Kjeldahl Absaugung	behrosog S3	Behr, Düsseldorf
Kjeldahl Aufschlussblock	K 12	Behr
Kjeldahl Wasserdampfdestillation	behr S3	Behr
Mikroplatten-Reader	Synergy2	Bio Tek Instruments, Friedrichshall
PCR-Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	SevenEasy™ pH	Mettler-Toledo, Gießen
Pipette 2-20 µL	Transferpette	Brand, Wertheim
Pipette 20-200 µL	Transferpette	Brand
Pipette 100-1000 µL	Transferpette	Brand
Reinstwassersystem	arium 611 VF	Sartorius
Schüttelwasserbad	Typ WB 20mT	PD-Industriegesellschaft, Dresden
Schwingmühle	MM 400	Retsch, Haan
Spannungsquelle	EV231	Peqlab
Sterilwerkbank	HeraSafe KS II	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Strohmühle	PX-MFC 90 D	Kinematica, Littau-Luzern
Ultraschallwasserbad		VWR, Darmstadt
Zentrifuge	Allegra X-15 R	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Microfuge 22R	Beckman Coulter

2.2.1 Rührkesselreaktor

Tab. 2.6: Bioreaktor

Bioreaktor	Labfors 3 (Infors, Einsbach)
Nennvolumen Kulturgefäß	7,5 L
Druckluft	Hausleitung (2,1 bar), sterilfiltriert über PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm)

Abluft	PTFE-Membranfilter (Sartorius, Midisart 2000, 0,2 µm)
Kulturparameter	24 °C, 150 rpm–180 rpm (Schrägblattrührer)
Belüftung	Luftrohr (AD 8 mm), 0,3 L min ⁻¹
pH-Elektrode	Schott Steamline SL 80-325 pH

2.3 Verwendete Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen (Tab. 2.7) wurden entweder über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, das Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) in Utrecht (Niederlande) oder die Friedrich-Schiller-Universität (FSU) in Jena bezogen.

Tab. 2.7: Zum Screening eingesetzte Basidiomyceten mit Stammnummer, Trivialname, Herkunft, Abkürzung (Abk.) sowie deren Genießbarkeit (G.); S = Speisepilz mit kulinarischem Wert, E = essbar (ungiftig), M = Medizinalpilz, n.b. = nicht bekannt, n.e. = nicht essbar

	Stamm	Trivialname	Abk.	Herkunft	G.
1	<i>Bjerkandera adusta</i> 4708	Angebrannter Rauchporling	BAD	DSMZ	n.b.
2	<i>Clitocybe lignatilis</i> 8332	Holztrichterling	CLI	DSMZ	n.b.
3	<i>Clitopilus passeckerianus</i> 901	Katzenohrräsling	CLP	DSMZ	n.b.
4	<i>Cyathus helenae</i> 372.80	-	CHE	CBS	n.b.
5	<i>Ganoderma applanatum</i> 3800	Flacher Lackporling	GAP	DSMZ	M ¹
6	<i>Hypholoma capnoides</i> 3715	Graublättriger Schwefelkopf	HCA	DSMZ	S ¹
7	<i>Ischnoderma benzoinum</i> 311.29	Schwarzgebänderter Harzporling	IBE	CBS	n.b.
8	<i>Kuehneromyces mutabilis</i> 1013	Gemeines Stockschwämmchen	KUM	DSMZ	S ²
9	<i>Lentinula edodes</i> 389.89	Shiitake	LED	CBS	S ¹

	Stamm	Trivialname	Abk.	Herkunft	G.
10	<i>Lentinus squarrosulus</i> 9877	Feinsparriger Sägeblättling	LSQU	DSMZ	S ²
11	<i>Marasmius cohortalis</i> 8257	-	MCO	DSMZ	n.b.
12	<i>Mycetinis scorodonius</i> 137.83	Echter Knoblauch- schwindling	MSC	CBS	S ¹
13	<i>Nidula niveo-tomentosa</i> 380.80	-	NNI	CBS	n.b.
14	<i>Panellus serotinus</i> 5204	Gelbstieliger Muschelseitling	PSER	DSMZ	S ¹
15	<i>Phanerochaete</i> <i>chryso sporium</i> L 13-2	Weißrostpilz	PCH	FSU	n.b.
16	<i>Pleurotus citrinopileatus</i> 5341	Limonenpilz	PCI	DSMZ	S ¹
17	<i>Pleurotus eous</i> 5331	Rosa Austernseitling	PEO	DSMZ	S ³
18	<i>Pleurotus eryngii</i> 8264	Kräuterseitling	PER	DSMZ	S ²
19	<i>Pleurotus ostreatus</i> 1020	Austernseitling	POS	DSMZ	S ¹
20	<i>Pleurotus sapidus</i> 8266	-	PSA	DSMZ	S ²
21	<i>Polyporus melanopus</i> 5109	Schwarzstieliger Porling	PME	DSMZ	n.b.
22	<i>Polyporus sp.</i>	-	PSP	Eigen- isolat	n.b.
23	<i>Postia caesia</i> 5124	Blauender Saftporling	POCA	DSMZ	n.b.
24	<i>Pycnoporus sanguineus</i> 3023	Tropischer Zinnoberschwamm	PYS	DSMZ	M ¹
25	<i>Trametes suaveolens</i> 5237	Anistramete	TSU	DSMZ	M ²
26	<i>Trametes versicolor</i> 480.63	Schmetterlings- tramete	TVE	CBS	E ²
27	<i>Trametes versicolor</i> 11269	Schmetterlings- tramete	TVE	DSMZ	E ²
28	<i>Tyromyces chioneus</i> 5242	Kurzröhriger Saftporling	TCH	DSMZ	M ⁴

	Stamm	Trivialname	Abk.	Herkunft	G.
29	<i>Wolfiporia cocos</i> 279.55	Lu Fing, Indian Bread	WCO	CBS	E ^{1, 5}

¹(Kreisel 2005), ²(Boa 2004), ³(Rani *et al.* 2008), ⁴(Liu *et al.* 2007), ⁵(Cheung 1997)

2.4 Substrate

Die carotinoidreichen Substrate Karottenschalen und Blattspinat (Abb. 2.1) wurden von der Firma Elbtal Tiefkühlkost in Lommatzsch zur Verfügung gestellt. Bei den Karottenschalen handelte es sich um Schalenabrieb nach dem Waschen der Karotten. Der Blattspinat fiel als Reststoff durch Abwurf vom Transportband in der Spinatverarbeitung an. Die Substrate Sellerietrester, Zwiebelschalen, Lauchtrester und Zitruspellets (Abb. 2.2) wurden von der Firma Symrise AG aus Holzminden erhalten. Die Zitruspellets entstammten der Herstellung von Orangensaft.

Die Substrate wurden – mit Ausnahme der Zitruspellets – bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Zitruspellets wurden bei Raumtemperatur gelagert.



Abb. 2.1: Frische unbehandelte Karottenschalen (A1), lyophilisierte Karottenschalen (A2), frischer unbehandelter Blattspinat (B1) und lyophilisierter Blattspinat (B2)



Abb. 2.2: Sellerietrester (A), Zwiebelschalen (B), Lauchtrester (C), unbehandelte Zitruspellets (D1) und gemahlene Zitruspellets (D2)

2.4.1 Substratvorbehandlung

Die Karottenschalen und der Blattspinat wurden eingefroren und anschließend mittels Gefriertrocknung bis zu einer Restfeuchte kleiner 10% getrocknet. Anschließend wurde der trockene Blattspinat mit einer Strohühle (Siebgröße 5,0 mm) zerkleinert und bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Die getrockneten Karottenschalen wurden mit einer Strohühle (Siebgröße 5,0 mm und 2,0 mm) zerkleinert. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Zitruspellets wurden in einer Schwingmühle (Frequenz 30 s^{-1} , 2 min) zerkleinert und mit Hilfe eines Siebs (Prüfsieb DIN 4188, Korngröße 1 mm) eingestellt. Sellerietrester, Zwiebelschalen und Lauchtrester wurden ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt.

Tab. 2.8: Zum Screening eingesetzte carotinoide Substrate, deren Abkürzungen und Korngröße, n. b.: nicht bestimmt

Substrat	Abkürzung	Korngröße [mm]
Karottenschalen (lyophilisiert, gemahlen)	KS	2
Karottenschalen (unbehandelt)	KS _u	n. b.
Blattspinat (lyophilisiert, gemahlen)	BS	5

Tab. 2.9 Weitere zum Screening eingesetzte Substrate, deren Abkürzungen und Korngröße, n. b.: nicht bestimmt

Substrat	Abkürzung	Korngröße [mm]
Sellerietrester	ST	n. b.
Zwiebelschalen	ZS	n. b.
Lauchtrester	LT	n. b.
Zitruspellets	CPP	1

2.4.2 Bestimmung der Restfeuchte

Die Restfeuchte der Substrate wurde als Doppelbestimmung mit einem Feuchtebestimmer (MA 35, Sartorius) nach Herstelleranweisung ermittelt.

2.4.3 Bestimmung des Gehaltes an direkt reduzierenden Zuckern nach Luff-Schoorl

Der Gehalt an direkt reduzierenden Zuckern wurde nach der Methode nach Luff-Schoorl (Luff und Schoorl 1929; Schoorl 1929, modifiziert nach Matissek *et al.* 2010b) in einer Doppelstimmung bestimmt. Dazu wurden 3–5 g Karottenschalen (getrocknet oder unbehandelt), Blattspinat (lyophilisiert, gemahlen), Sellerietrester, Zwiebelschalen oder Lauchtrester in einen 100-mL-Messkolben gegeben, ca. 75 mL dest. Wasser hinzugefügt und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde eine Klärung nach Carrez durchgeführt, ad Marke aufgefüllt und 25 mL des Filtrats zur Bestimmung eingesetzt. Ein Blindwert mit 25 mL Wasser wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Durch die Differenz des Verbrauchs von

0,1 M Natriumthiosulfatlösung zwischen Blindwert und Probe ergab sich der Verbrauch, der der Menge an direkt reduzierenden Zuckern in der Probe entsprach. Unter Berücksichtigung der Verdünnung sowie der Probeneinwaage wurde der Gehalt an direkt reduzierenden Zuckern Z [g (100 g)^{-1}] nach Gleichung 1 berechnet.

$$Z = \frac{F \times Vf}{E \times 10} \quad (1)$$

F = direkt reduzierende Zucker als Invertzucker [mg] in 25 mL Probelösung (entnommen aus Matissek *et al.* 2010b, Seite 142, Tabelle 4.2)

Vf = Verdünnungsfaktor

E = Einwaage [g]

10 = Faktor zur Berücksichtigung der Maßeinheiten (Umrechnung auf 100 g Probe, Umrechnung des Faktors F in g)

2.4.4 Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Kjeldahl

Der Rohproteingehalt wurde in einer Dreifachbestimmung nach Kjeldahl (Kjeldahl 1883, modifiziert nach Matissek *et al.* 2010a) bestimmt. Dazu wurden ca. 0,5 g Blattspinat (lyophilisiert, gemahlen), 2–3 g Karottenschalen (getrocknet oder unbehandelt), Sellerietrester, Zwiebschalen und Lauchtrester in stickstofffreie Pergamentschiffchen eingewogen und anschließend mit einer Siedeperle, einer halben Katalysator-Tablette und 15 mL konzentrierter Schwefelsäure in die Aufschlusskolben gegeben. Der Aufschluss erfolgte in einem temperaturgesteuerten Heizblock für ca. 5 h. Nach Abkühlen der Proben wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt. Vor Beginn der Destillation wurden Sher-Indikator und Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion hinzugefügt. Der gebildete Ammoniak wurde durch die Destillation in eine borsäurehaltige Vorlage getrieben und anschließend mit 0,1 M Salzsäure-Maßlösung titriert.

Der Rohproteingehalt P [g (100 g)^{-1}] berechnete sich nach Gleichung 2.

$$P = \frac{a \times 1,4008 \times F}{E \times 10} \quad (2)$$

a = Verbrauch 0,1 M Salzsäure-Maßlösung [mL]

F = Umrechnungsfaktor zur Errechnung des Rohproteingehaltes für Gemüse = 6,25

E = Einwaage [g]

1,4008 = 1 mL Salzsäure (0,1 M) entspricht 1,4008 mg Stickstoff

10 = Faktor zur Berücksichtigung der Maßeinheiten

(Umrechnung auf 100 g Probe, Umrechnung von mg Stickstoff auf g)

2.5 Kultivierung von Basidiomyceten

2.5.1 SNL-H-Medium und SNL-H-Agar

D-(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (2.5.2)	1,0 mL L ⁻¹

Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

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

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

modifiziert nach Sprecher (1959)

2.5.2 Spurenelementlösung

Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	80 mg L ⁻¹
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	90 mg L ⁻¹
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	30 mg L ⁻¹
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	5 mg L ⁻¹
EDTA	400 mg L ⁻¹

steril filtrieren

2.5.3 Biotransformation carotinoidreicher Substrate und Substrat-Blindwerte

Medium M1:

Natriumaspargat-Monohydrat	6,2 g L ⁻¹
Ammoniumnitrat	2,4 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (2.5.2)	1,0 mL L ⁻¹

Das Substrat wurde direkt in 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben eingewogen:

lyophilisierte, gemahlene Karottenschalen	2,5 g
lyophilisierter, gemahlener Blattspinat	3,0 g
unbehandelte Karottenschalen	27,6 g

Zugabe von 100 mL Medium M1

Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

Die Substrateinwaage entsprach, wenn möglich einem Kohlenhydratgehalt von 15 g L^{-1} , wurde jedoch je nach Substrat angepasst, um eine zu hohe Viskosität des mit Substrat supplementierten Mediums zu verhindern.

2.5.4 Biotransformation weiterer Substrate und Substrat-Blindwerte

2.5.4.1 Trester

Die Substrate wurden direkt in 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben eingewogen:

Sellerietrester	15,0 g
Zwiebelschalen	15,0 g
Lauchtrester	10,0 g

Zugabe von 100 mL dest. Wasser

Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

2.5.4.2 Zitruspellets

5 g der gemahlenden Pellets wurden direkt in einen 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben eingewogen.

Zugabe von 100 mL Medium M1 (2.5.3)

Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

2.5.5 Pilz-Blindwert

Medium M2:

Natriumaspartat-Monohydrat	$6,9 \text{ g L}^{-1}$
Ammoniumnitrat	$2,7 \text{ g L}^{-1}$
Kaliumdihydrogenphosphat	$1,7 \text{ g L}^{-1}$
Magnesiumsulfat-Hydrat	$0,6 \text{ g L}^{-1}$
Spurenelementlösung (2.5.2)	$1,1 \text{ mL L}^{-1}$

2.5.8 Vorkultur

Die Anzucht der Vorkultur erfolgte in 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben, die mit 100 mL SNL-H-Medium (2.5.1) befüllt waren. Inokuliert wurde mit einem ca. 1 cm² großen, mit Myzel bewachsenem Agarstück (2.5.7), welches mit einem Ultra-Turrax-Dispergiergerät (15 s, 9.800 U min⁻¹) zerkleinert wurde. Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss für 4 bis 19 Tage (Tab. 2.11) im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 rpm).

Tab. 2.11: Vorkulturdauer [d] der im Screening verwendeten Mikroorganismen

Mikroorganismus	Vorkultur [d]
<i>B. adusta</i>	6
<i>C. lignatilis</i>	7
<i>C. passeckerianus</i>	5
<i>C. helenae</i>	4
<i>G. applanatum</i>	9
<i>H. capnoides</i>	5
<i>I. benzoinum</i>	14
<i>K. mutabilis</i>	7
<i>L. edodes</i>	11
<i>L. squarrosulus</i>	6
<i>M. cohortalis</i>	6
<i>M. scorodonius</i>	12
<i>N. niveo-tomentosa</i>	11
<i>P. serotinus</i>	6
<i>P. chrysosporium</i>	4
<i>P. citrinopileatus</i>	6
<i>P. eous</i>	6
<i>P. eryngii</i>	5
<i>P. ostreatus</i>	6
<i>P. sapidus</i>	6
<i>P. melanopus</i>	10
<i>P. sp.</i>	6
<i>P. caesia</i>	19
<i>P. sanguineus</i>	4
<i>T. suaveolens</i>	6
<i>T. versicolor</i>	6
<i>T. chioneus</i>	9
<i>W. cocos</i>	6–7

2.5.9 Kulturführung Biotransformation und Substrat-Blindwert

2.5.9.1 Carotinoidreiche Substrate

Die Anzucht der Hauptkulturen (Biotransformation und Substrat-Blindwert) erfolgte in 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben, die entsprechend Kapitel 2.5.3 befüllt waren. Vor der Inokulation wurde je 1 mL sterile BME-Lösung hinzugefügt.

Die Vorkultur (2.5.8) wurde mit einem Ultra-Turrax-Dispergiergerät (15 s, 9.800 U min⁻¹) homogenisiert. 10 mL der homogenisierten Vorkultur dienten als Inokulum. Die Substrat-Blindwerte wurden nicht inokuliert. Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 rpm) bis zum Zeitpunkt des interessantesten Geruchseindrucks (2.7.1).

2.5.9.2 Weitere Substrate

Für die Anzucht der Hauptkulturen mit Sellerietrester, Zwiebelschalen und Lauchtrester (Biotransformation und Blindwert) wurden 100 mL destilliertes Wasser in einem 250-mL-Erlenmeyerkolben verwendet (2.5.4.1). Die Kultivierungen mit Zitruspellets erfolgte analog der carotinoidreichen Substrate in Medium M1 (2.5.3, 2.5.9.1). Die Vorbereitung der Vorkultur, die Inokulierung sowie die Kulturführung erfolgten entsprechend 2.5.9.1.

2.5.10 Kulturführung Pilz-Blindwert

2.5.10.1 Pilz-Blindwert in Medium M2

Für die Hauptkultur der Pilz-Blindwerte wurden 250-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben mit 90 mL Medium M2 (2.5.4) verwendet. Vor der Inokulation wurden je 1 mL steril filtrierte BME-Lösung und 10 mL sterile Glucoselösung (150 g L⁻¹) hinzugegeben. Die entsprechende Vorkultur (2.5.8) wurde mit einem Ultra-Turrax-Dispergiergerät (15 s, 9.800 U min⁻¹) homogenisiert. Mit 10 mL der homogenisierten Vorkultur wurde inokuliert. Die Kultivierung erfolgte parallel zu den mit Substrat supplementierten Hauptkulturen (2.5.9).

2.5.10.2 Pilz-Blindwert in reduziertem Medium M11

Die Hauptkultur der Pilz-Blindwerte im reduzierten Medium M11 erfolgte – bis auf die Zugabe der BME-Lösung – analog 2.5.10.1.

2.6 Biotransformation im 7,5-L-Fermenter

2.6.1 Vorkultur

Die Anzucht der Vorkultur erfolgte analog zu 2.5.8.

2.6.2 Hauptkultur

Für die Hauptkultur wurde das Medium M9 (2.5.6) mit 276 g L^{-1} unbehandelten Karottenschalen verwendet. Der Bioreaktor wurde mit 3 L Medium und unbehandelten Karottenschalen befüllt, autoklaviert und mit 300 mL homogenisierter Vorkultur (2.6.1) inokuliert. Die Biotransformation erfolgte bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$, einer Belüftung von $0,3 \text{ L min}^{-1}$ und einer Rührerdrehzahl von 150 rpm bis Tag 3 und 180 rpm von Tag 3 bis Tag 6 (Tab. 2.6). Nach 6 Tagen wurde der Reaktorinhalt geerntet. Der pH-Wert wurde während der Kultivierung mit einer integrierten pH-Elektrode gemessen. Der Verlauf der Kulturparameter pH-Wert, Belüftung, Rührerdrehzahl und Temperatur sind im Anhang angegeben (Abb. 7.3).

2.7 Screening

Für das Screening nach interessanten Geruchseindrücken durch Biotransformation wurden 29 Basidiomyceten (Tab. 2.7) in einem mit Substrat supplementierten Medium M1 (Karottenschalen, Blattspinat und Zitruspellets) (2.5.3) oder in destilliertem Wasser (Sellerietrester, Zwiebschalen und Lauchtrester) (2.5.4) kultiviert. Die verwendeten Substrate stellten jeweils die einzige Kohlenhydratquelle des Pilzes dar. Zur Bestimmung des geeigneten Kulturabbruchtages wurden die Biotransformationen kulturbegleitend olfaktometrisch untersucht (2.7.1). Die Kultivierung des Substrat-Blindwertes erfolgte im selben Medium wie die Biotransformation. Der Pilz-Blindwert wurde im Medium M2 mit Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert.

In der ersten Screeningphase wurde der Zeitpunkt des interessantesten und intensivsten Geruchseindrucks der Biotransformation im Vergleich zu den Substrat- und Pilz-Blindwerten bestimmt. Die nach der ersten Phase ausgewählten Biotransformationen wurden in der zweiten Phase wiederholt, um die Reproduzierbarkeit des Geruchseindrucks am ausgewählten Kulturabbruchtag zu überprüfen.

2.7.1 Kulturbegleitende sensorische Analyse

In der ersten Screeningphase wurden aus den Hauptkulturkolben (2.5.9, 2.5.10) jeden zweiten Tag je 4 mL Probe steril entnommen und in ein 20-mL-Schnappdeckelglas überführt. Die Proben wurden in einem Schüttelwasserbad auf 40 °C temperiert und anschließend sensorisch beurteilt. Die Beurteilung wurde jeweils von mindestens drei Personen durchgeführt.

2.7.2 Gesamtsensorik

Der Gesamtgeruchseindruck wurde am Kulturabbruchtag direkt am Kulturkolben bestimmt. Die Beurteilung des Aromas erfolgte bei Raumtemperatur direkt nach Öffnen des Kulturkolbens durch mindestens drei Personen

2.8 Bestimmung des Kulturparameters pH-Wert

Der pH-Wert der Kulturmedien wurde mit einem kalibrierten pH-Meter nach Herstelleranweisung bestimmt.

2.9 Probenvorbereitung

Die ausgewählten Biotransformationen und die entsprechenden Blindwerte wurden zum angegebenen Zeitpunkt abgebrochen und entsprechend 2.9.1 für die gaschromatographische Analyse (2.9.3) aufgearbeitet.

2.9.1 Extraktion der Submerskulturen

Die Kulturen wurden in Zentrifugenbecher überführt und zentrifugiert (10 min, RT, 3.724 x g). Der zentrifugierte Kulturüberstand wurde dreimal mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel (Pentan/Diethylether, 1/1,12; v/v) extrahiert. Emulsionen wurden durch Zugabe von einigen Tropfen Ethanol gebrochen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreux-Kolonne (Wasserbadtemperatur 45 °C) auf ein Endvolumen von 1 mL eingengt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µL internem Standard (IS) (Thymol, 750 mg L⁻¹ Pentan/Diethylether, 1/1,12; v/v). 1 µL des Extraktes wurde zur gaschromatographischen Analytik (2.9.3) eingesetzt.

2.9.2 Festphasenmikroextraktion im Kopfraum von Kulturkolben

2.9.2.1 Festphasenmikroextraktion im Kopfraum des Kulturkolbens

Mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) wurden die flüchtige Verbindungen der Biotransformation (2.5.3, 2.5.9.1) von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 (2.5.6) extrahiert. Die Extraktion erfolgte mittels Divinylbenzol/Carboxen/Polydimethylsiloxan-Faser (50/30 µm Schichtdicke, 1 cm Faserlänge, Supelco) direkt im Kopfraum des Kulturkolbens. Dazu wurden Cellulosestopfen ausgehöhlt und mit einer sterilen Kanüle durchstoßen, durch die die SPME-Faser eingeführt wurde. Die Extraktion (40 min) erfolgte an den Kulturtagen 1 bis 6 direkt im Kulturkolben im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 rpm). Die Desorption (250 °C) erfolgte im S/SL-Injektor (Eindringtiefe 4 cm) der GC-MS (2.10.2, Tab. 2.15).

2.9.2.2 Untersuchung der Aromabildung während des Kulturverlaufs

Die flüchtigen Verbindungen der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 und des Substrat-Blindwerts sowie des Pilz-Blindwerts wurden täglich mittels Festphasenmikroextraktionen aus dem Kopfraum erfasst. Die SPME wurde mit einer Divinylbenzol/Carboxen/ Polydimethylsiloxan-Faser analog 2.9.2.1 direkt im Kopfraum des Schüttelkolbens durchgeführt. Die Extraktion (40 min) erfolgte an Kulturtag 0 (vor Inokulierung) sowie an den Kulturtagen 1 bis 6 direkt im Inkubationsschüttler (24 °C, 150 rpm). Die Desorption

(250 °C) erfolgte im S/SL-Injektor (Eindringtiefe 4 cm) der GC-MS-MS-O (2.10.3.1, Tab. 2.18).

2.9.3 Festphasenmikroextraktion nach Transformation mit MsP1

Die Extraktion der gebildeten flüchtigen Verbindungen (2.15.3) erfolgte mittels Divinylbenzol/Carboxen/Polydimethylsiloxan-Faser aus dem Kopfraum des 20-mL-Headspace-Vials in der Schüttelvorrichtung für Vials direkt an der GC-MS-MS-O. Anschließend erfolgte die Desorption (250 °C) im S/SL-Injektor (Eindringtiefe 4 cm) der GC-MS-MS-O und die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse (2.10.3.1, Tab. 2.19) der flüchtigen Verbindungen.

Im Rahmen einer Optimierung wurde die Extraktionstemperatur von 40 °C auf 75 °C erhöht und die Extraktionszeit von 30 min auf 60 min und 120 min verlängert.

2.10 Gaschromatographie

Die Bestimmung der aromaaktiven Verbindungen erfolgte mittels GC-FID-O nach on-column-Injektion auf einer polaren Trennsäule (2.10.1, Tab. 2.12) und für ausgewählte Proben mittels GC-MS-MS-O mit S/SL-Injektor (2.10.3, Tab. 2.16). Die Identifizierung der Substanzen erfolgte mittels GC-MS und GC-MS-MS-O auf einer polaren (Tab. 2.13, Tab. 2.16) sowie auf einer unpolaren Trennsäule (Tab. 2.14, Tab. 2.17). Die mittels Festphasenmikroextraktion extrahierten flüchtigen Verbindungen aus dem Kopfraum des Kulturkolbens (2.9.2.1) wurden auf einer polaren Trennsäule mittels GC-MS (Tab. 2.15) analysiert. Die mittels HS-SPME erfassten flüchtigen Verbindungen im Kulturkolben der Biotransformation (2.9.2.2) sowie die flüchtigen Verbindungen nach Transformation durch MsP1 (2.15.3) wurden auf einer polaren Trennsäule mittels GC-MS-MS-O (Tab. 2.18, Tab. 2.19) analysiert. Die flüchtigen Verbindungen der Umsetzung von β -Carotin mit MsP1 wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch auch auf einer unpolaren Trennsäule (Tab. 2.19) untersucht.

2.10.1 Gaschromatographie mit on-column-Injektion, Olfaktometrie Detektor Port und Flammenionisationsdetektor (GC-FID-O)

Bei Untersuchungen mittels GC-FID-O wurde der am Olfaktometrie Detektor Port wahrgenommene Geruchseindruck mit Hilfe eines Signalgebers aufgezeichnet (ODP-Spur). Die Intensität des Signals entsprach dabei der Intensität des Geruchs. Die Skala reichte von „1“ der niedrigsten Intensität bis zu „4“ der höchsten Intensität (1: 25 pA, 2: 50 pA, 3: 75 pA, 4: 100 pA). Die Dauer des Geruchseindrucks entsprach der Breite des Signals.

Tab. 2.12: Geräteparameter GC-FID-O (on-column) mit polarer Trennsäule

Gaschromatograph	Agilent 7890A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Injektor	on-column-Injektor, Modus: <i>track oven</i>
Injektionsvolumen	1 μL
Trennsäule	Agilent Technologies J&W Scientific HP-Innowax, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 μm Filmdicke
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min^{-1} auf 240 °C (12 min)
Detektion	Flammenionisationsdetektor (FID), 250 °C H ₂ 40 mL min^{-1} , Luft 400 mL min^{-1} , N ₂ 25 mL min^{-1}
Olfaktometrie Detektor Port	Gerstel ODP 3; Transferline: 250 °C, Mischraumheizung: 150 °C, Makeupgas: N ₂
T-Stück	20 kPa, Teilungsverhältnis ODP/FID: 1/1
Trägergas	H ₂ , Druck, 52,3 kPa, Fluss: 2,2 mL min^{-1} (konstant)
Datenaufnahme GC	Chemstation Rev. B.04.01
Datenaufnahme ODP	ODP-Recorder 2.9.3.8

2.10.2 Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor (GC-MS)

Tab. 2.13: Geräteparameter GC-MS mit polarer Trennsäule

Gaschromatograph	Agilent 7890A
Autosampler	Agilent 7693A
Injektor	split/splitless, 250 °C
Injektionsparameter	Volumen: 1 μL , Modus: split, Splitverhältnis: 1:10
Trennsäule	Agilent Technologies J&W Scientific HP-Innowax, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μm Filmdicke

Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (7 min)
Detektion	Agilent MSD 5975C VL Triple-Axis Detektor
Trägergas	He, Fluss: 1,2 mL min ⁻¹ (konstant)
Temperaturen	Ionenquelle: 230 °C, Interface: 250 °C, Quadrupol: 150 °C
Ionisation	Elektronenstoßionisation: 70 eV
Massenbereich	Totalionenscan, Massenbereich 33–300 <i>m/z</i>
Datenaufnahme	Chemstation E02.00.493
Datenbank	NIST 2008 MS

Tab. 2.14: Geräteparameter GC-MS mit unpolarer Trennsäule

siehe	Tab. 2.13
Trennsäule	Agilent Technologies DB-5MS, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 300 °C (7 min)
Temperaturen	Ionenquelle: 230 °C, Interface: 300 °C, Quadrupol: 150 °C

Tab. 2.15: Geräteparameter GC-MS mit polarer Trennsäule für Analytik nach der Festphasenmikroextraktion im Kulturkolben

siehe	Tab. 2.13
Injektor	split/splitless mit SPME-Liner, 250 °C
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 175 °C (1,75 min), 20 °C min ⁻¹ auf 240 °C (5 min)
Injektionsparameter	Modus: split, Splitverhältnis: 1:5

2.10.3 Gaschromatographie-Olfaktometrie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (GC-MS-MS-O)

Bei GC-MS-MS-O-Untersuchungen wurde der am Olfaktometrie Detektor Port wahrgenommene Geruchseindruck mit Hilfe eines Signalgebers aufgezeichnet (ODP-Spur). Die wahrgenommene Intensität des Geruchs wurde über die Intensität des Signals wiedergegeben. Die Skala reichte von „1“ der niedrigsten Intensität bis zu „4“ der höchsten Intensität. Die Dauer des Geruchseindrucks entsprach der Breite des Signals.

Tab. 2.16: Geräteparameter GC-MS-MS-O mit S/SL-Injektor und polarer Trennsäule

Gaschromatograph	Agilent 7890A
Autosampler	Multi Purpose Sampler 2XL (Gerstel, Mühlheim)
Injektor	split/splitless, 250 °C
Injektionsparameter	Volumen: 1 µL, Modus: splitless
Trennsäule	Agilent Technologies J&W Scientific HP-Innowax, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (7 min)
Detektion	Agilent MSD 7000 Triple Quadrupole
Olfaktometrie Detektor Port	Gerstel ODP 3; Transferline: 250 °C, Mischraumheizung: 200 °C, Makeupgas: N ₂
T-Stück	20 kPa, Teilungsverhältnis ODP/MS: 1/1
Trägergas	He, Druck: 118,13 kPa, Fluss: 1,56 mL min ⁻¹ (konstant)
Temperaturen	Ionenquelle: 230 °C, Interface: 250 °C, Quadrupol 1: 150 °C, Quadrupol 2: 150 °C
Kollisionsgase	N ₂ : 1,5 mL min ⁻¹ , He: 2,25 mL min ⁻¹
Ionisation	Elektronenstoßionisation: 70 eV
Massenbereich	Totalionenscan in Q1, Massenbereich 33–300 <i>m/z</i>
Datenaufnahme	MassHunter GC/MS Acquisition B.05.01
Datenauswertung	MassHunter Qualitative Analysis B.04.00
Datenbank	NIST 2011 MS
Datenaufnahme ODP	ODP-Recorder 3.1.1.5

Tab. 2.17: Geräteparameter GC-MS-MS-O mit S/SL-Injektor und unpolarer Trennsäule

siehe	Tab. 2.16
Trennsäule	Agilent Technologies J&W Scientific DB-5MS, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 300 °C (7 min)
Olfaktometrie Detektor Port	Gerstel ODP 3; Transferline: 310 °C, Mischraumheizung: 200 °C, Makeupgas: N ₂
Temperaturen	Ionenquelle: 230 °C, Interface: 310 °C, Quadrupol 1: 150 °C, Quadrupol 2: 150 °C

2.10.3.1 Festphasenmikroextraktion aus dem Kopfraum von Kulturkolben

Tab. 2.18: Geräteparameter GC-MS-MS-O mit S/SL-Injektor und polarer Trennsäule

siehe	Tab. 2.16
Injektor	split/splitless, 250 °C mit SPME-Liner
Injektionsparameter	Modus: splitless
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 240 °C (7 min)

2.10.3.2 Festphasenmikroextraktion nach Umsetzung mit MsP1

Tab. 2.19: Geräteparameter GC-MS-MS-O mit S/SL-Injektor

siehe	Tab. 2.16 (polare Säule), Tab. 2.17 (unpolare Säule)
Injektor	split/splitless, 250 °C mit SPME-Liner
Injektionsparameter	Modus: split 1:10
Temperaturprogramm	polare Säule: 40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 180 °C (0 min), 25 °C min ⁻¹ auf 250 °C (1,2 min) unpolare Säule: 40 °C (3 min), 5 °C min ⁻¹ auf 180 °C (0 min), 25 °C min ⁻¹ auf 300 °C (4,2 min)

2.10.4 Berechnung des Retentionsindex nach Kováts

Der Retentionsindex (auch Kováts-Index) KI (Kováts 1958) wurde wie folgt berechnet:

$$KI = 100 \times z + 100 \frac{(\lg t_{R'A} - \lg t_{R'N})}{(\lg t_{R'N+1} - \lg t_{R'N})} \quad (3)$$

z = Anzahl der C-Atome des Alkans, das vor dem Analyten eluiert

$t_{R'A}$ = Netto-Retentionszeit des Analyten [min]

$t_{R'N}$ = Netto-Retentionszeit des Alkans, das vor dem Analyten eluiert [min]

$t_{R'N+1}$ = Netto-Retentionszeit des Alkans, das nach dem Analyten eluiert [min]

Der Alkanreihenstandard enthielt alle homologen n-Alkane von C8 bis C26 (40 mg L⁻¹ Hexan).

2.10.5 Bestimmung der Response-Faktoren

2.10.5.1 Analyten der Biotransformation durch *W. cocos*

Zur Bestimmung der Response-Faktoren der Hauptaromakomponenten wurden Mischungen der Aromastoffe und des internen Standards Thymol mittels GC-MS (2.10.2) analysiert. Dazu wurden drei Mischungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Stoffe angesetzt und der Response-Faktor nach Gleichung 4 berechnet.

$$Rf = \frac{M_A \times A_{IS}}{M_{IS} \times A_A} \quad (4)$$

M_A = Masse Analyt [mg]

M_{IS} = Masse Interner Standard [mg]

A_A = Peakfläche Analyt [Skt]

A_{IS} = Peakfläche Interner Standard [Skt]

Zur Berechnung der Response-Faktoren für die folgenden Stoffe wurden die angegebenen Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) verwendet:

Essigsäure: Summe der Flächen der Ionen m/z 45 und 60

(*E*)-Geraniol: Summe der Flächen der Ionen m/z 41 und 69

β -Ionon: Fläche des Ions m/z 177

Die Response-Faktoren sind im Anhang (Tab. 7.36) aufgeführt.

2.10.5.2 Analyten der Transformation durch MsP1

Zur Responsefaktor-Bestimmung wurde ein Mischstandard bestehend aus α -Ionon (IS), β -Ionon und β -Cyclocitral angesetzt. 10 mg jeder Substanz wurden in je einen 250-mL-Meßkolben eingewogen, mit Natriumacetat-Puffer pH 3,5 (50 mM) versetzt und im Ultraschallbad (10 min) behandelt. Aus diesen Stammlösungen wurden zwei Mischstandardlösungen unterschiedlicher Konzentration (Standard 1: 1,6 mg L⁻¹ β -Cyclocitral, α - und β -Ionon, Standard 2: 1,6 mg L⁻¹ α -Ionon bzw. 2,0 mg L⁻¹ β -Ionon und β -Cyclocitral) mit Natriumacetat-Puffer (pH 3,5, 50 mM) angesetzt. Die Mischstandardlösungen wurden 1 zu 7,5 mit Natriumacetat-Puffer (pH 3,5, 50 mM) verdünnt. Von dieser Lösung wurden 7,5 mL mit 2,5 mL einer Tween[®] 80-Lösung (2.15.1.2) versetzt. Der Ansätze wurden im Wasserbad inkubiert (12 min, 30 °C) und die flüchtigen Verbindungen im Kopfraum anschließend bei 75 °C für 30 min mittels

SPME (2.9.3) extrahiert. Die Desorption und die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse erfolgte analog 2.10.3.2. Die Response-Faktoren von β -Ionon und β -Cyclocitral wurden nach Gleichung 4 bestimmt. Die Response-Faktoren wurden unter den Bedingungen der entsprechenden Probeansätze bestimmt.

2.10.6 Quantifizierung ausgewählter Aromastoffe

2.10.6.1 Analyten der Biotransformation durch *W. cocos*

Die Quantifizierung erfolgte nach gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse auf einer polaren Trennsäule (2.10.2). Die Konzentration K [$\mu\text{g L}^{-1}$] der Aromastoffe wurde nach Gleichung 5 berechnet.

$$K = \frac{M_{\text{IS}} \times A_{\text{A}}}{A_{\text{IS}}} \times R_f \times \frac{1000}{\text{Vol}} \quad (5)$$

M_{IS} = Masse Interner Standard [μg]

A_{A} = Peakfläche Analyt [Skt]

A_{IS} = Peakfläche Interner Standard [Skt]

R_f = Response-Faktor (siehe Anhang Tab. 7.36)

Vol = Volumen Kulturüberstand [mL] (siehe Anhang Tab. 7.37)

Die Quantifizierung der folgenden Stoffe erfolgte über die Flächen der angegebenen Masse/Ladungsverhältnisse (m/z):

Essigsäure: Summe der Flächen der Ionen m/z 45 und 60

(*E*)-Geraniol: Summe der Flächen der Ionen m/z 41 und 69

β -Ionon: Fläche des Ions m/z 177

2.10.6.2 Analyten der Transformation durch MsP1

Die Konzentration K_m [mmol mL^{-1}] der flüchtigen Abbauprodukte nach Transformation von β -Carotin durch MsP1 wurde durch Gleichung 6 ermittelt.

$$K_m = \frac{M_{\text{IS}} \times A_{\text{A}}}{A_{\text{IS}} \times M_{\text{I}}} \times R_f \quad (6)$$

M_{IS} = Konzentration des internen Standards [mg mL^{-1}]

A_{A} = Peakfläche Analyt [Skt]

A_{IS} = Peakfläche Interner Standard [Skt]

R_f = Response-Faktor

M_i = Molare Masse von β-Ionon (192,30 mg mmol⁻¹), β-Cyclocitral (152,23 mg mmol⁻¹), 5,6-Epoxy-β-ionon (208,33 mg mmol⁻¹), Dihydroactinidiolid (180,24 mg mmol⁻¹)

Durch Berücksichtigung des Abbaus von β-Carotin (2.15.2) wurde der Umsatz U [mol%] nach Gleichung 7 berechnet.

$$U = \frac{K_m}{c_v} \times 100 \quad (7)$$

K_m = Konzentration der identifizierten flüchtigen Abbauprodukte [mmol mL⁻¹]

c_v = Abbau von β-Carotin [mmol mL⁻¹]

2.11 Bestimmung der Hauptaromakomponenten durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA)

Ein Aliquot des Extraktes (2.9.1), der für die GC-FID-O-Analyse (2.10.1) eingesetzt wurde, wurde schrittweise 1+1 (v/v) mit Pentan/Diethylether (1/1,12; v/v) verdünnt. Jede Verdünnungsstufe wurde am GC-FID-O (2.10.1) analysiert, bis keine geruchsaktiven Verbindungen mehr wahrgenommen wurden. Der Verdünnungsfaktor (FD-Faktor) 2ⁿ (n = Anzahl der 1+1 Verdünnungen) stellte die höchste Verdünnung dar, bei der noch ein Geruch wahrgenommen wurde. Dieser wurde gegen den Retentionsindex nach Kováts aufgetragen und ein FD-Diagramm erstellt. Der unverdünnte Extrakt besaß definitionsgemäß einen FD-Faktor von eins (Ferreira *et al.* 2002; Schieberle und Grosch 1988; Ullrich und Grosch 1987).

2.12 Berechnung der Aromawerte (*odor activity value*, OAV)

Der Aromawert einer Verbindung ist definiert als der Quotient aus der Konzentration [µg L⁻¹] in der untersuchten Probe und des Schwellenwertes [µg L⁻¹] in einer der Probe möglichst identischen Matrix (Rothe und Thomas 1963).

Die Aromawerte (OAV) berechneten sich wie folgt:

$$OAV = \frac{\text{Konzentration } [\mu\text{g L}^{-1}]}{\text{Geruchsschwellenwert } [\mu\text{g L}^{-1}]} \quad (8)$$

Die Quantifizierung der Hauptaromakomponenten erfolgte nach 2.10.6. Die Geruchsschwellenwerte für die Aromastoffe in Wasser wurden aus der Literatur entnommen und sind in den Ergebnistabellen zusätzlich angegeben.

2.13 Aromarekombination

Die Aromasimulation der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* fand in Medium M9 statt. Der pH-Wert des Mediums wurde mit 0,1 M Salzsäure auf den in der Biotransformation vorliegenden pH-Wert von 2,8 eingestellt. Das Rekombinat wurde aus den folgenden Aromastoffen in der entsprechenden Konzentration erstellt:

Essigsäure, Linalool, (*E*)-Geraniol, 2-Phenylethanol und β -Ionon.

1,2-Propandiol diente als Lösungsvermittler.

Zur Beurteilung der Rekombination wurde die Gesamtsensorik im Vergleich zu einer Biotransformation analog 2.7.2 bestimmt.

2.14 Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten

2.14.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung der genomischen DNA aus Basidiomyceten wurde das „Genomic DNA from Plant NucleoSpin Plant II Kit“ (Macherey&Nagel, Düren) verwendet. Zum Eluieren der genomischen DNA diente Reinstwasser.

2.14.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung der gewünschten DNA-Abschnitte erfolgte mittels PCR. Für die PCR wurden folgende Komponenten zu einem Ansatz pipettiert:

PCR-Ansatz

genomische DNA (39 ng μL^{-1})	2,0 μL
10x CoralLoad PCR-Puffer	10,0 μL
dNTPs (je 10 mM)	2,0 μL
ITS5 forward Primer (10 μM)	4,0 μL
ITS4 reversed Primer (10 μM)	4,0 μL
HotStarTaq (5 U μL^{-1})	0,5 μL

Reinstwasser ad 100 µL

Verwendete Primer:

ITS4: 5'>TCCTCCGCTTATTGATATGC<3'

ITS5: 5'>GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG<3'

Die Schmelztemperatur T der Primer wurde nach der „2 °C + 4 °C“-Regel (9) berechnet:

$$T = N \times [\text{GC}] \times 4 \text{ °C} + N \times [\text{AT}] \times 2 \text{ °C} \quad (9)$$

N = Summe der Basen G und C bzw. A und T

Die Schmelztemperatur der Primer ITS4 und ITS5 betrug 58 °C.

Cyclerprogramm:

Deckeltemperatur: 105 °C

95 °C 5 min

30 Zyklen:

95 °C 60 s

53 °C 60 s

72 °C 30-90 s

72 °C 5 min

4 °C halten

2.14.3 DNA-Fragmentisolierung

Mittels Agarose-Gelelektrophorese (2%ig) wurden die PCR-Amplifikate aufgetrennt und die relevanten DNA-Bande ausgeschnitten. Als Marker wurde ein 100 bp extended Marker (Carl Roth) verwendet. Mit Hilfe des „Nucleo Spin Extract II Kit“ (Macherey&Nagel) wurden die ausgeschnittenen Banden gereinigt und mit Reinstwasser eluiert. Zur Sequenzierung wurde die Probe an Eurofins MWG Operon geschickt. Die erhaltene Sequenzfragmente wurden zusammengefügt und bereinigt (Chromas Lite 2.01). Die so erhaltene Gesamtsequenz wurde zum Datenbankvergleich (National Center for Biotechnology Institute (NCBI), Bethesda, USA) eingesetzt.

2.15 MsP1-katalysierte Umsetzung von β -Carotin

Der Kulturüberstand der heterologen Expression der „*DyP-type*“-Peroxidase MsP1 in *A. niger* wurde von Royal DSM (Delft, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Der Kulturüberstand wurde zum Abbau von β -Carotin im 20-mL-Headspace-Vial verwendet. Von allen Transformationen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Erfassung der gebildeten flüchtigen Verbindungen erfolgte mittels HS-SPME (2.9.3) mit anschließender gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse (2.10.3.2, Tab. 2.19).

2.15.1 Bestimmung der Enzymaktivität (β -Carotin-Assay)

2.15.1.1 β -Carotin-Lösung

5 mg β -Carotin und 0,5 g Tween[®] 80 wurden in einem 250-mL-Rundkolben mit 20 mL Dichlormethan versetzt. Am Rotationsverdampfer (40 °C, 800 mbar, 10 min) wurde das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mit 30 mL Reinstwasser aufgenommen und Reste von Dichlormethan am Rotationsverdampfer (40 °C, 200 mbar, 15 min) und unter Stickstoff-Strom (15 min) entfernt. Anschließend wurde die Lösung durch einen Membranfilter (0,22 μ m) in einen 50-mL-Meßkolben filtriert und mit Reinstwasser ad Marke aufgefüllt (Hülsdau 2007, Pühse *et al.* 2009). Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C.

Die β -Carotin-Lösung wurde durch Verdünnen mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 0,08 g L⁻¹ eingestellt und so für die weiteren Versuche eingesetzt.

2.15.1.2 Tween[®] 80-Lösung

Analog 2.15.1.1, ohne Einwaage von β -Carotin.

2.15.1.3 Aktivitätsbestimmung

Mit Hilfe eines von Ben Aziz *et al.* (1971) entwickelten und von Langhoff (2002) und Scheibner (2006) modifizierten photometrischen Assays wurde die Enzymaktivität des verwendeten Kulturüberstandes bestimmt. Dabei wurde die Extinktionsabnahme einer β -Carotin-Lösung bei 450 nm (10 min, 30 °C) verfolgt. Die Enzymlösung wurde

mit Natriumacetat-Puffer pH 3,5 (50 mM) verdünnt (1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:400, 1:500) zur Messung eingesetzt. Durch Zugabe von H₂O₂ wurde die Reaktion gestartet. Für die Aktivitätsbestimmung wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 20 µL Enzymlösung
- 80 µL Natriumacetat-Puffer
- 50 µL β -Carotin-Lösung (2.15.1.1)
- 50 µL Wasserstoffperoxid (0,5 mM)

Die Berechnung der Enzymaktivität A [mU mL⁻¹] erfolgte nach Gleichung 10 (Zorn *et al.* 2003a):

$$A = \frac{\Delta E \times VG \times Vf}{d \times Vp \times \varepsilon} \times 10^6 \quad (10)$$

ΔE = Extinktionsabnahme [min⁻¹]

VG = Gesamtvolumen in der Küvette [mL]

Vf = Verdünnungsfaktor

d = Schichtdicke der Küvette [cm] (0,64 cm für 200 µL)

Vp = Volumen der Probe [mL]

ε = molarer Extinktionskoeffizient von β -Carotin in Wasser (95.000 L mol⁻¹ cm⁻¹ bei 450 nm)

Für die Transformationansätze wurde die Enzymlösung mit Natriumacetat-Puffer auf eine Aktivität von 20 U L⁻¹ eingestellt.

2.15.2 Photometrische Bestimmung des β -Carotin-Verbrauchs

Die Extinktion der β -Carotin-Lösung (2.15.1.1) wurde vor und nach jeder Transformation photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration c [mol L⁻¹] an β -Carotin im Ansatz wurde nach Gleichung 11 berechnet. Anhand der Differenz zwischen Anfangs- und Endkonzentration wurde der Verbrauch an β -Carotin bestimmt.

$$c = \frac{E}{\varepsilon \times d} \quad (11)$$

E = Extinktion bei 450 nm

ε = molarer Extinktionskoeffizient von β -Carotin in Wasser (95.000 L mol⁻¹ cm⁻¹ bei 450 nm)

d = Schichtdicke der Küvette [cm] (0,64 cm für 200 µL)

2.15.3 Transformation mit MsP1

2.15.3.1 Bestimmung der Transformationszeit

Die Reaktionsdauer der enzymatischen Umsetzung von β -Carotin durch MsP1 wurde am Mikroplatten-Photometer bestimmt. Dazu wurde der Transformationsansatz (2.15.3.2) auf ein Volumen von 200 μ L umgerechnet und die Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 450 nm über 20 min bei 30 °C aufgenommen.

2.15.3.2 Abbau von β -Carotin

Für die Transformation (Doppelbestimmung) wurden folgende Ansätze auf Eis in 20-mL-Braunglas-Vials pipettiert:

- 2,5 mL β -Carotin-Lösung (2.15.1.1)
- 2,5 mL Enzymlösung (20 U L⁻¹)
- 2,5 mL Wasserstoffperoxid (0,5 mM)
- 2,5 mL Interner Standard (α -Ionon, 1,47 mg L⁻¹ in Natriumacetat-Puffer)

Die Transformation erfolgte im Anschluss für 12 min bei 30 °C Wasserbadtemperatur. Zu Optimierungszwecken wurden ebenfalls Transformationszeiten von 30 min, 60 min, 120 min und 180 min untersucht. Die Extraktion der gebildeten flüchtigen Verbindungen erfolgte mittels HS-SPME analog 2.9.3.

Drei verschiedene Blindwerte (Tab. 2.20, Doppelbestimmung) wurden angesetzt, für 12 min bei 30 °C inkubiert und die gebildeten flüchtigen Verbindungen mittels HS-SPME (2.9.3) erfasst (30 min, 75 °C) und gaschromatographisch-massenspektrometrisch (Tab. 2.19) analysiert.

Blindwert 1 diente zur Überprüfung, ob die Restkonzentration (Konzentration an β -Carotin nach der Transformation) während der Extraktion der flüchtigen Verbindungen (75 °C) einer Autoxidation unterliegt und dadurch Norisoprenoide nicht-enzymatisch gebildet wurden.

Ein möglicher Abbau des internen Standards α -Ionon durch MsP1 wurde durch Blindwert 2 untersucht.

Mit Blindwert 3 wurde überprüft, ob bzw. zu welchen flüchtigen Verbindungen MsP1 den verwendeten Emulgator Tween[®] 80 abbaut.

Tab. 2.20: Zusammensetzung der Blindwerte zur Transformation durch MsP1

Blindwert	Zusammensetzung
1	2,5 mL β -Carotin-Lösung ⁱⁱⁱ 2,5 mL Interner Standard (α -Ionon in Natriumacetat-Puffer) 5,0 mL Natriumacetat-Puffer (pH 3,5, 50 mM)
2	2,5 mL Enzymlösung (20 U L ⁻¹) 2,5 mL Interner Standard (α -Ionon in Natriumacetat-Puffer) 2,5 mL Wasserstoffperoxid (0,5 mM) 2,5 mL Natriumacetat-Puffer (pH 3,5, 50 mM)
3	2,5 mL Enzymlösung (20 U L ⁻¹) 2,5 mL Interner Standard (α -Ionon in Natriumacetat-Puffer) 2,5 mL Wasserstoffperoxid (0,5 mM) 2,5 mL Tween [®] 80 Lösung (2.15.1.2)

2.15.3.3 Transformation unbehandelter Karottenschalen durch MsP1

Unbehandelte Karottenschalen wurden im Verhältnis 1:3 (Masse/Volumen) mit Puffer (50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 3,5) vermischt und zerkleinert (3 min, Stabmixer Philips, 600 W). Der Transformationsansatz (Doppelbestimmung) war analog 2.15.3.2 zusammengesetzt, enthielt jedoch anstelle der β -Carotin-Lösung das Homogenat (2,8 g) aus unbehandelten Karottenschalen und Natriumacetat-Puffer. Der entsprechende Blindwert (Doppelbestimmung) wurde mit 2,5 mL Puffer anstelle der Enzymlösung angesetzt. Die Transformation erfolgte analog 2.15.3.2 (Transformationszeit: 12 min), die Extraktion (30 min, 75 °C) der flüchtigen Verbindungen mittels HS-SPME nach 2.9.3 und die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse auf einer polaren Trennsäule nach 2.10.3.2.

ⁱⁱⁱ0,005 mg mL⁻¹, entsprechend einer Restkonzentration von 0,0013 mg mL⁻¹ an β -Carotin im Transformationsansatz

3 Ergebnisse

3.1 Substratanalytik

3.1.1 Restfeuchte

Die Restfeuchte der Substrate (Tab. 3.1) wurde mit Hilfe eines Feuchtebestimmers gemäß 2.4.2 bestimmt.

Tab. 3.1: Verwendete Substrate und deren Restfeuchte [g (100 g)^{-1}]

Substrat	Restfeuchte [g (100 g)^{-1}]
Karottenschalen (lyophilisiert, gemahlen)	$5,8 \pm 0,1$
Karottenschalen (unbehandelt)	$91,1 \pm 0,2$
Blattspinat (lyophilisiert, gemahlen)	$7,6 \pm 0,1$
Sellerietrester	$80,9 \pm 1,1$
Zwiebelschalen	$78,8 \pm 0,8$
Lauchtrester	$78,9 \pm 0,3$
Zitruspellets	$10,6 \pm 0,5$

3.1.2 Direkt reduzierende Zucker nach Luff-Schoorl

Die Bestimmung des Gehaltes der Substrate an direkt reduzierenden Zucker nach Luff-Schoorl (Abb. 3.1) erfolgte nach 2.4.3.

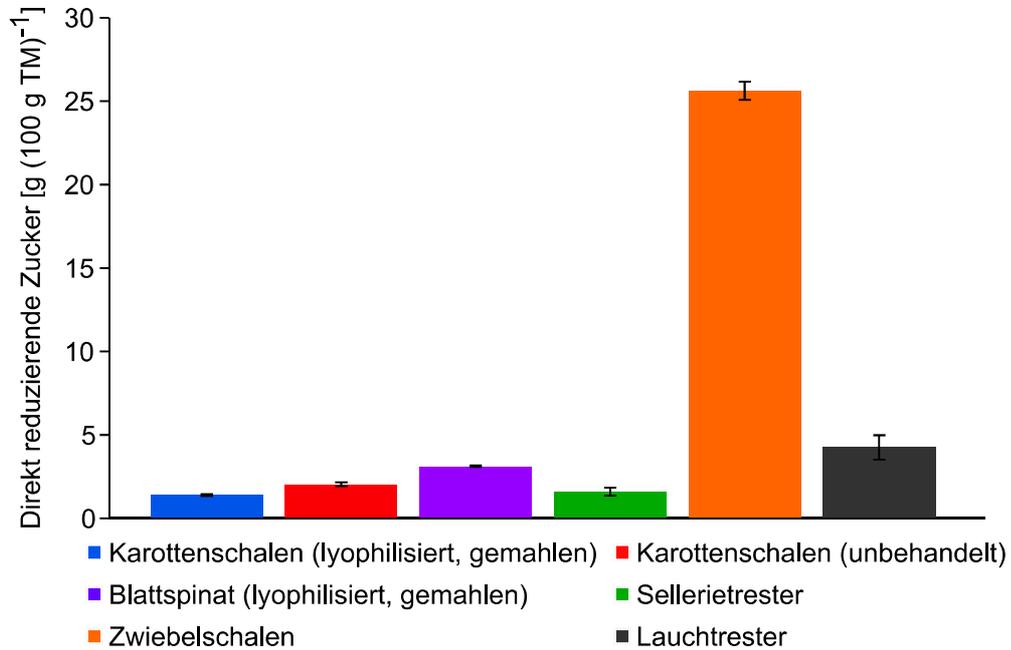


Abb. 3.1: Gehalt der Substrate Karottenschalen (lyophilisiert, gemahlen), Karottenschalen (unbehandelt), Blattspinat (lyophilisiert, gemahlen), Sellerietrester, Zwiebelschalen und Lauchtrester an direkt reduzierenden Zuckern [g (100 g Trockenmasse)⁻¹]

3.1.3 Rohprotein nach Kjeldahl

Der Rohproteingehalt der Substrate (Abb. 3.2) wurde analog 2.4.4 nach Kjeldahl ermittelt.

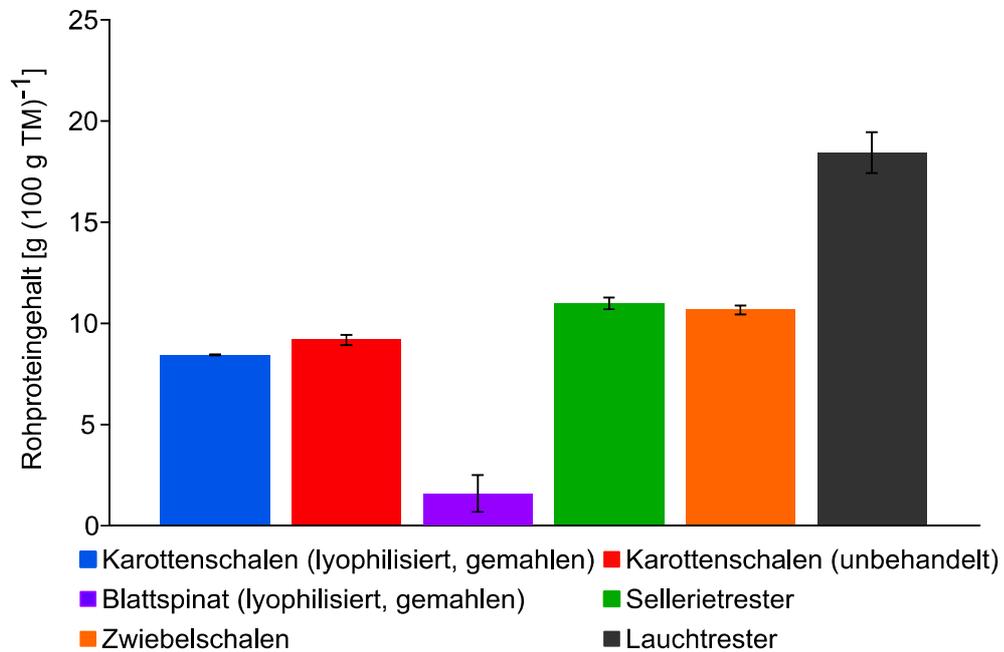


Abb. 3.2: Rohproteingehalt [g (100 g Trockenmasse)⁻¹] der Substrate Karottenschalen (lyophilisiert, gemahlen), Karottenschalen (unbehandelt), Blattspinat (lyophilisiert, gemahlen), Sellerietrester, Zwiebelschalen und Lauchtrester

3.2 Screening

Die Ermittlung der Geruchseindrücke der Biotransformationen erfolgte nach 2.7.1 und 2.7.2. Die Kultivierungen wurden nach 2.5.9 und 2.5.10 durchgeführt.

Parallel zu den Biotransformationen wurden Substrat-Blindwerte sowie Pilz-Blindwerte untersucht, um zu ermitteln, welche Geruchseindrücke dem Substrat entstammten und welche Aromakomponenten durch den Pilz neu gebildet wurden.

3.2.1 Carotinoidreiche Substrate

Eine Reihe von Biotransformationen der carotinoidreichen Substrate (Karottenschalen und Blattspinat) wiesen sensorisch vielversprechende und von den Blindwerten (Tab. 3.2, Tab. 3.6) signifikant unterschiedliche Geruchseindrücke auf (Tab. 3.3).

3.2.1.1 Substrat-Blindwerte

Tab. 3.2: Beispielhafte Geruchseindrücke der carotinoidreichen Substrat-Blindwerte in Medium M1

Substrat	Geruchseindruck
Karottenschalen (lyophilisiert, gemahlen)	nach Karotte, erdig, dumpf, süßlich, herb, fruchtig
Karottenschalen (unbehandelt)	nach Karotte, erdig, dumpf, süßlich, herb, fruchtig
Blattspinat (lyophilisiert, gemahlen)	nach Spinat, Gras

Der Geruchseindruck der Substrat-Blindwerte blieb über den Kulturverlauf konstant.

3.2.1.2 Biotransformation

Der Geruchseindruck von insgesamt 48 Biotransformationen carotinoidreicher Substrate wurde beurteilt (Tab. 3.3). Die Stamm/Substrat-Kombinationen, deren Geruchseindrücke von den Prüfern im Hinblick auf β -Carotin-Abbauprodukte als positiv und vielversprechend bewertet wurden und sich von den Blindwerten unterschieden, wurden im Folgenden näher untersucht (in Tab. 3.3 mit + = positiv gekennzeichnet)

Die detaillierten Ergebnisse des Screenings sind im Anhang (7.2) aufgeführt.

Tab. 3.3: Beispielhafte Geruchseindrücke der Biotransformationen von lyophilisierten und gemahlten Karottenschalen und von Blattspinat; KS = Karottenschalen, BS = Blattspinat, Geruch = typische Geruchseindrücke der Biotransformation, sensorische Bewertung: + = positiv bzw. - = negativ

Mikroorganismus	Substrat	Geruch	sensorische Bewertung
<i>B. adusta</i>	KS	chlorig, muffig	-
<i>C. lignatilis</i>	KS	holzig, würzig	-
	BS	Grüner Tee, Zitrone	+
<i>C. passeckerianus</i>	KS	chlorig, erdig	-
	BS	gäriges Gras, Ammoniak	-
<i>C. helenae</i>	KS	holzig, erdig	-
	BS	Heu, Gras, Spinat	-
<i>G. applanatum</i>	KS	leicht chlorig, leicht Karotte	-
	BS	chlorig, Heu	-
<i>H. capnoides</i>	KS	Klebstoff, süßlich	-
	BS	Gras, Heu	-
<i>I. benzoinum</i>	KS	Marzipan	-
	BS	Gras, Rucola, bitter	-
<i>K. mutabilis</i>	KS	Heu, gäriges Gras,	-
	BS	gäriger Apfel, Streuobst	+
<i>L. edodes</i>	KS	gäriges Gras	-
	BS	Pfeffer, Gummi	-
<i>L. squarrosulus</i>	KS	gäriges Gras, Spinat	-
	BS	Kunststoff, fruchtig	+
<i>M. cohortalis</i>	KS	staubig, Gras	-
	BS	Anis, süß, Karotte	+
<i>M. scorodonius</i>	KS	Kunststoff, Beize	-
	BS	gäriges Gras, Kompost	-
<i>P. serotinus</i>	KS	nussig, Pilz, staubig	-
	BS	Grasschnitt, Spinat	-
<i>P. chrysosporium</i>	KS	fruchtig, rauchig	-

3 Ergebnisse

Mikroorganismus	Substrat	Geruch	sensorische Bewertung
	BS	süß-saure Gurke, Essig	+
<i>P. eous</i>	KS	erdig, staubig	-
	BS	gäriges Gras	-
<i>P. eryngii</i>	KS	Kunststoff, Knete	-
	BS	gäriges Gras, alter Tee	-
<i>P. ostreatus</i>	KS	süß, fruchtig, Honig	+
<i>P. sapidus</i>	KS	fruchtig, süßlich	+
	BS	Gras, herb	-
<i>P. melanopus</i>	BS	Spinat, süßlich	-
<i>P. sp.</i> (Eigenisolat)	KS	leicht Karotte, Rauch	-
<i>P. caesia</i>	KS	leicht alkoholisch, Weizen	-
	BS	Urin, Ammoniak	-
<i>P. sanguineus</i>	KS	animalisch	-
	BS	leicht Heu, Gras	-
<i>T. suaveolens</i>	KS	Pilz, holzig, Leim	-
	BS	Gülle, Kompost	-
<i>T. versicolor</i> 480.63	KS	chlorig, erdig	-
	BS	Tee, Spinat	-
<i>T. chioneus</i>	KS	gäriges Obst	-
	BS	Grasschnitt, Silage	-
<i>W. cocos</i>	KS	blumig, frisch, Wachs, Zitrone	+
	BS	Zitrone, Heu	+

Neun Stamm/Substrat-Kombinationen zeigten einen interessanten Geruchseindruck, der sich deutlich von den Blindwerten unterschied. Die Reproduzierbarkeit der neun Geruchseindrücke wurde überprüft und der Tag mit dem intensivsten Geruch der Biotransformation wurde als Kulturende festgelegt. Von den neun sensorisch interessanten Biotransformationen wurde der Geruchseindruck von sieben reproduziert. Die Geruchseindrücke der Biotransformationen von Karottenschalen durch *M. cohortalis* und *P. sapidus* waren nicht reproduzierbar. Die Biotransformationen durch *M. scorodonius* und *P. chrysosporium* wurde nicht weitergehend untersucht, da die Genießbarkeit der Pilze (Tab. 2.7) nicht festgestellt werden konnte. Das

Aroma folgender interessanter Biotransformationen durch essbare Basidiomyceten war reproduzierbar (mind. dreimal):

- Blattspinat mit *W. cocos* (Kulturabbruch an Tag 6)
- Karottenschalen mit *L. edodes* (Kulturabbruch an Tag 6)
- Karottenschalen mit *W. cocos* (Kulturabbruch an Tag 6)

Da die Karottenschalen im Hinblick auf die gewünschten β -Carotin-Abbauprodukte das aussichtsreichste Substrat darstellten, erfolgte nach dem Screening eine Eingrenzung auf die Biotransformationen von Karottenschalen.

3.2.2 Weitere Substrate

Die Biotransformationen der Substrate Sellerietrester, Zwiebelschalen, Lauchtrester und Zitruspellets zeigten teilweise ebenfalls vielversprechende Geruchseindrücke (Tab. 3.5).

3.2.2.1 Substrat-Blindwerte

Tab. 3.4: Geruchseindrücke der Sellerietrester-, Zwiebelschalen- und Lauchtrester-Blindwerte in destilliertem Wasser und der Zitruspellets-Blindwert in Medium M1

Substrat	Geruchseindruck
Sellerietrester	Sellerie, Gemüsebrühe, würzig
Zwiebelschalen	Zwiebel, Zwiebelsuppe
Lauchtrester	Lauch, Gras
Zitruspellets	holzig, rauchig, Orange

Die Geruchseindrücke der Substrat-Blindwerte waren charakteristisch für die eingesetzten Substrate und blieben über den Kulturverlauf konstant.

3.2.2.2 Biotransformationen

Von 13 Biotransformationen wurden die Stamm/Substrat-Kombinationen als interessant eingestuft (Tab. 3.5, mit + = positiv bzw. - = negativ gekennzeichnet), deren Geruchseindrücke von den Prüfern als ansprechend beurteilt wurden und sich von den Blindwerten unterschieden

Tab. 3.5: Geruchseindrücke der Biotransformationen der Substrate Sellerietrester (ST), Zwiebschalen (ZS), Lauchtreste (LT) und Zitruspellets (CPP); Geruch = typische Gerüche der Biotransformation, sensorische Bewertung: + = positiv bzw. - = negativ

Mikroorganismus	Substrat	Geruch	sensorische Bewertung
<i>I. benzoinum</i>	CPP	chlorig, stechend	-
	ST	leicht Sellerie, süßlich	-
<i>L. edodes</i>	ZS	rauchig, Zwiebelsuppe	-
	LT	Lauch, Zwiebel, Gras	-
<i>P. eryngii</i>	ST	süßlich, leicht Marzipan	+
	ZS	rauchig, Zwiebelsuppe	-
	LT	Lauch, Zwiebel, Gras	-
<i>P. sapidus</i>	CPP	Pilz, Zement	-
<i>T. chioneus</i>	CPP	intensives Rauchfleisch	+
	ST	süßlich, fruchtig, Zitrone	+
<i>W. cocos</i>	ZS	rauchig, Zwiebelsuppe	-
	LT	Lauch, Zwiebel, Gras	-
	CPP	Orange, Flieder, fruchtig, säuerlich	+

Die aussichtsreichsten Stamm/Substrat-Kombinationen waren:

- Zitruspellets mit *W. cocos* (Kulturtag 8)
- Zitruspellets mit *T. chioneus* (Kulturtag 8)

Die Biotransformation von Zitruspellets durch *T. chioneus* hatte am Kulturabbruch ein intensives Rauchfleisch-Aroma, das sich ebenfalls deutlich vom Substrat- und Pilz-Blindwert unterschied.

Das Aroma der Kultivierung von *W. cocos* wurde mit einem Geruchseindruck nach „Orange, Flieder, fruchtig, säuerlich“ beschrieben. Bei einer ersten gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung der Biotransformation von Zitruspellets durch *W. cocos* wurden zehn verschiedene Geruchseindrücke wahrgenommen und mittels Datenbankvergleich der Massenspektren Strukturvorschlägen zugeordnet (7.1). Da die Zitruspellets zu einer sehr späten Projektphase zur Verfügung gestellt wurden, war es während der Projektlaufzeit nicht möglich, die Identifizierung und Absicherung der Aromastoffe abzuschließen.

3.2.3 Pilz-Blindwerte

Die Geruchseindrücke der Pilz-Blindwerte (Tab. 3.6) wurden nach 2.7.1 und 2.7.2 ermittelt.

Tab. 3.6: Beispielhafte Geruchseindrücke der Pilz-Blindwerte in Medium M2

Pilz	Geruchseindruck
<i>B. adusta</i>	Kunststoff, chlorig, muffig
<i>C. lignatilis</i>	chlorig, Schimmel, muffig, feucht
<i>C. passeckerianus</i>	Brühe, Pilz, sauer
<i>C. helenae</i>	zitronig, frisch, Kräuter, Thymian
<i>G. applanatum</i>	Pilz, süßlich, hefig, teigig
<i>H. capnoides</i>	chlorig, Plastik,
<i>I. benzoinum</i>	Benzaldehyd, Wachs, Zimt
<i>K. mutabilis</i>	Anisaldehyd, süßlich
<i>L. edodes</i>	muffig, staubig, feuchter Keller
<i>L. squarrosulus</i>	neutral, Pilz, pfeffrig
<i>M. cohortalis</i>	staubig, Pilz, neutral
<i>M. scorodonius</i>	Isüß, Anis,
<i>N. niveo-tomentosa</i>	rauchig, süßlich, animalisch
<i>P. serotinus</i>	Pilz, Brühe
<i>P. chrysosporium</i>	Pilz, frisch, nach Kräutern
<i>P. eous</i>	süßlich, Anisaldehyd
<i>P. eryngii</i>	süßlich, staubig, Anisaldehyd
<i>P. ostreatus</i>	neutral, nussig

Pilz	Geruchseindruck
<i>P. sapidus</i>	Anisaldehyd, Pilz
<i>P. melanopus</i>	Anisaldehyd, süßlich
<i>P. sp.</i>	Brühe, Pilz, Urin
<i>P. caesia</i>	neutral, Pilz, leicht süß
<i>P. sanguineus</i>	Tier, unangenehm, Schnaps
<i>T. suaveolens</i>	Pilz, Anisaldehyd, Brühe
<i>T. versicolor</i>	chlorig, Keller, muffig,
<i>T. chioneus</i>	süßlich, muffig
<i>W. cocos</i>	zitronig, krautig, herb, Zitronenmelisse

3.3 Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten

Die molekularbiologische Identifizierung erfolgte zur Absicherung der Spezies der Stämme 389.89 und 279.55, die in der internen Stammsammlung unter den Namen *L. edodes* und *W. cocos* geführt sind.

3.3.1 Molekularbiologische Identifizierung von Stamm 389.89

Zur molekularbiologischen Identifizierung des Stamms 389.89 (CBS) wurde nach White *et al.* (1990) aus der genomischen DNA mit den Primern ITS4 und ITS5 (2.14) ein 835 bp großes Fragment amplifiziert. Das erhaltene Fragment codiert für die 5,8S ribosomale Untereinheit inklusive der ITS-Bereiche ITS1 und ITS2 (Abb. 3.3).

TTTTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCTTACTTGATTGGAGGTCAAGCAAATAAGTTATATATAGTCAATC
 AAGACAGTTAGAAAAGCGGAACCTCCCTTTTTCTCCAATGAATAGAACAGATTGAGCAAACCTAAATGCAACAAC
 CCAAACCAATAGAGCTTTATTATTGTAAGGTTCCACCAAATGTAGATAATTATCACACCAAGGTTAGAATAA
 CAAAACAGGGTCCCACTAATAAATTTAAGAGGAGCTGACAAACGCCTGCAAGCCTCCAACATCCAAGCTTTA
 ATAAGTAAAAACTTATAAAGTTGAGAATTTAATGACTCAAAACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCG
 CAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTT
 CATCGATGGGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTAAGTTAAAGGGTCAATAAAGTCCCAATAA
 CAAGATCATTCTATAACATACTTCAATGGTTTATAAGAACATAGAAGCCTTGTCAACTAGTCTTTTCAAGTAACT
 CATAATGAGCACCTTCAAAAACCCGATGAAAGAACTCCTACAAAAAGTGACACAGGTGGATGAATAGAAATCG
 GAGGAGGATGTGCACATACCCAAAGGCCAGCAACAATCCACCACCAAAAAATTCAATAATGATCCTTCCGCAA
 GTTCACCTACGAAACCTTGTACGCTTTTTAACTTCCAGAATGGGTCAAAGTGGTAGGCGGAACGAGTGTAGT
 AACTCCGAATACATCGAGCTTCGAGTA

Abb. 3.3: DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit aus dem Basidiomyceten 389.89 (CBS, Utrecht, NL)

Durch Datenbankvergleich (National Center for Biotechnology Institute (NCBI)) der ITS-Sequenzen wurde der Stamm 389.89 mit einer Homologie von 98% zu vier verschiedenen *L. edodes* Stämmen (Tab. 3.7) zugeordnet. *L. edodes* ist ein essbarer Weißfäulepilz und umgangssprachlich unter dem Namen Shiitake bekannt (Kirk *et al.* 2008; Reid und Seifert 1982).

Tab. 3.7: Auswahl der verschiedenen *L. edodes*-Stämme

Zugriffsnummer*	Organismus	Homologie	E-Wert ^{iv}
AB286065	<i>L. edodes</i> für ITS1 und ITS2	97%	1,7 ⁻¹⁶²
DQ467886	<i>L. edodes</i> strain 271	98%	3,1 ⁻¹⁶²
DQ467887	<i>L. edodes</i> strain 271 (LE5)	98%	3,1 ⁻¹⁶²
DQ497070	<i>L. edodes</i> strain 271 (LE3)	98%	3,1 ⁻¹⁶²

*Stand September 2012

3.3.2 Molekularbiologische Identifizierung von Stamm 279.55

Die molekularbiologische Identifizierung des Stamms 279.55 (CBS)^v erfolgte analog 2.14. Durch Datenbankvergleich wurde der Stamm 279.55 als *W. cocos* identifiziert.

^{iv} Je kleiner der E-Wert desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die gesuchte Sequenz durch Zufall gefunden wurde.

^v durchgeführt von Dipl. Biol. F. Amelung

Der Basidiomycet *W. cocos* (Ryvarden und Gilbertson 1984) ist ein essbarer Braunfäulepilz (Cheung 1997; Milagres und Sales 2001) und in der Literatur auch unter den Synonymen *Wolfiporia extensa* (Ginns 1984) und *Poria cocos* (Wolf 1922) aufgeführt.

3.4 Biotransformation von Karottenschalen durch *L. edodes*

Die Biotransformation von Karottenschalen (gefriergetrocknet, gemahlen) durch *L. edodes* erfolgte in Medium M1 (2.5.3) gemäß 2.5.9.1. Die Kultivierung des Pilz-Blindwertes erfolgte in Medium M2 (2.5.5) nach 2.5.10.1 und die Kultivierung des Substrat-Blindwertes in Medium M1 (2.5.3) gemäß 2.5.9.1. Die Bestimmung des Zeitpunktes des Kulturabbruchs erfolgte durch kulturbegleitende Sensorik (2.7.1). Die Ergebnisse der kulturbegleitenden Sensorik sind im Anhang (Tab. 7.10) dargestellt.

3.4.1 Gesamtsensorik

Basierend auf den Ergebnissen des Screenings erfolgte der Kulturabbruch der Biotransformation von gefriergetrockneten Karottenschalen durch *L. edodes* an Kulturtag 6. Der Geruchseindruck der Biotransformation, des Pilz-Blindwertes und des Substrat-Blindwertes wurde nach 2.7.2 bestimmt. Der Geruch der Biotransformation unterschied sich deutlich von den Blindwerten und wurde als „süßlich, säuerlich, grüner Apfel, fruchtig“ beschrieben. Die Geruchseindrücke des Pilz-Blindwertes und des Substrat-Blindwertes erfolgte ebenfalls an Kulturtag 6 und sind in Tab. 3.2 bzw. Tab. 3.6 angegeben.

3.4.2 Kulturparameter

3.4.2.1 pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wert-Verlaufes (Abb. 3.4) der Biotransformation von Karottenschalen (lyophilisiert, gemahlen) durch *L. edodes*, des Pilz-Blindwertes und des Substrat-Blindwertes erfolgte nach 2.8.

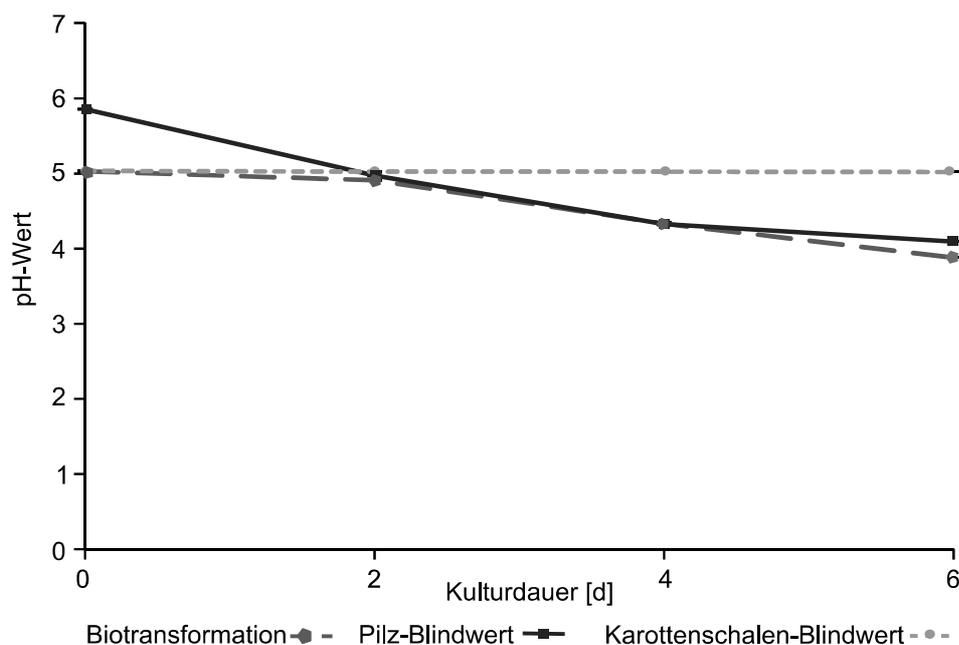


Abb. 3.4: pH-Wert über den Kulturverlauf der Biotransformation von Karottenschalen durch *L. edodes* (Biotransformation), des Pilz-Blindwertes (Pilz-Blindwert) und des Substrat-Blindwertes (Karottenschalen-Blindwert)

Der pH-Wert des Substrat-Blindwertes blieb über die Kulturdauer konstant bei ungefähr 5,0. Der pH-Wert der Biotransformation verlief ab dem zweiten Kulturtag auf dem gleichen Niveau wie der pH-Wert des Pilz-Blindwertes.

3.4.3 Detektion und Identifizierung aromaaktiver Verbindungen

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung des nach Biotransformation von gefriergetrockneten und gemahlten Karottenschalen durch *L. edodes* am Kulturtag 6 erhaltenen Aromaextrakts wurden 18 geruchsaktive Substanzen detektiert (Abb. 3.5).

Die Detektion der aromaaktiven Verbindungen (Tab. 3.8, Tab. 3.9) erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (2.9.1) gaschromatographisch mittels GC-FID-O (2.10.1, Tab. 2.12) und GC-MS auf polaren Trennphasen (2.10.2, Tab. 2.13). Die vorläufige Identifizierung der Aromastoffe erfolgte durch Vergleich der Massenspektren mit Hilfe einer Spektrendatenbank (NIST 2008) und durch Vergleich der Kováts-Retentionsindizes (auf einer HP-Innowax-Säule) sowie durch Vergleich mit Massenspektren authentischer Standardsubstanzen.

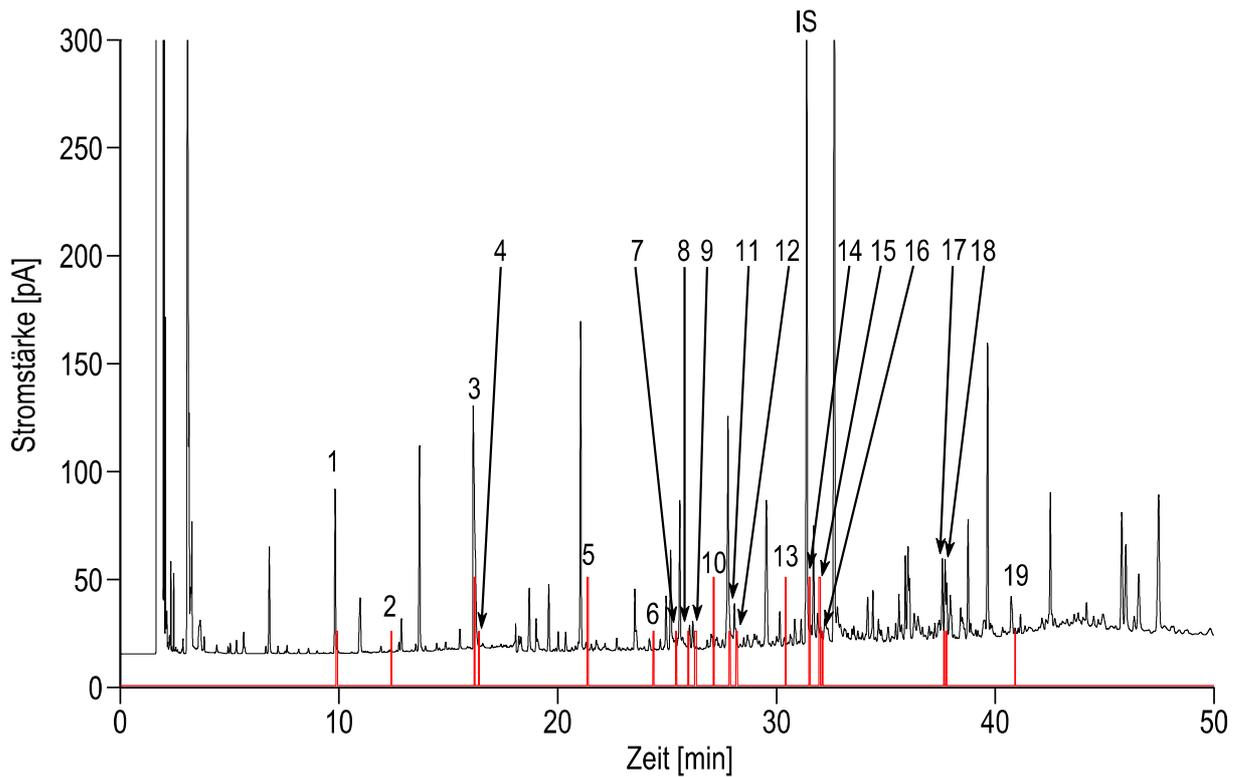


Abb. 3.5: GC-FID-O-Chromatogramm der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen durch *L. edodes* (Kulturtag 6) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot);
IS = Interner Standard

Durch Vergleich der ODP-Spur mit dem Chromatogramm wurden die Geruchseindrücke, wenn möglich, Peaks zugeordnet. Im Anschluss daran erfolgten der Vergleich und die Zuordnung der Peaks mit einem entsprechenden GC-MS-Chromatogramm (Abb. 3.6).

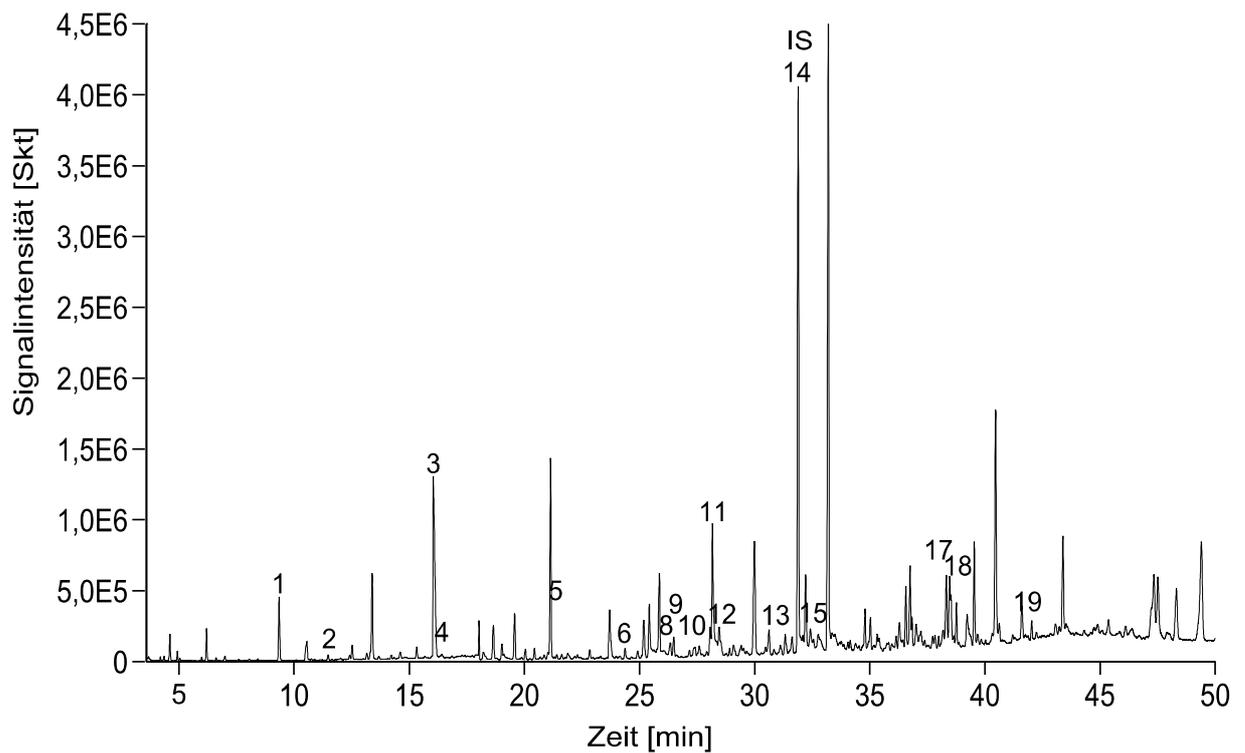


Abb. 3.6: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen durch *L. edodes*, IS = Interner Standard

Die Zuordnung der Peaks gestaltete sich in einzelnen Fällen schwierig, da es sich teilweise um sehr kleine Peaks handelte und die Retentionszeiten der beiden Systeme nicht direkt miteinander verglichen werden konnten. Mittels Datenbankvergleich wurden für vier Verbindungen Strukturvorschläge erhalten.

Durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (2.11) wurden die *flavor dilution*-Faktoren (FD-Faktoren) der flüchtigen Verbindungen (Tab. 3.8) der Biotransformation bestimmt.

3 Ergebnisse

Tab. 3.8: Untersuchung flüchtiger Substanzen aus der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen durch *L. edodes* mittels GC-FID-O- und GC-MS-Analysen mit Strukturvorschlägen, FD-Faktoren (FD), berechneten Kováts-Indizes (KI) auf polaren Trennsäulen und Vergleichsgerüchen (Geruch Lit.), - = kein Peak zuordenbar, n.b. = keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich, * = Interner Standard

#	FD	Geruchseindruck	KI (GC-O)	KI (GC-MS)	Struktur- vorschlag	Geruch Lit.
1	2	leicht nussig, sauer, chlorig	1186	1197	3-Methyl- 1-butanol	balsamisch ¹
2	8	Pilz	1280	1294	n.b.	
3	16	Essig, sauer	1431	1447	Essigsäure	Essig ²
4	2	erdig	1449	1461	n.b.	
5	16	Apfel, modrig	1641	1663	n.b.	
6	8	erdig, nussig	1787	1800	n.b.	
7	1	süßlich	-	-	-	
8	1	süßlich	1879	1893	n.b.	
9	16	blumig, Honig	1894	1900	2-Phenylethanol	Rose ²
10	8	süßlich, krautig	1930	1949	n.b.	
11	8	süßlich, krautig	1969	1985	n.b.	
12	8	frisches Gras	1984	1999	n.b.	
13	8	süßlich	2108	2124	n.b.	
14*	1	krautig, würzig	2166	2181	Thymol	
15	2	süßlich	2194	2199	1-Undecyn-4-ol	keine Angabe
16	1	krautig	-	-	-	
17	1	holzig	2544	2563	n.b.	
18	1	Tee	2553	2572	n.b.	
19	1	säuerlich, Tee	2780	2711	n.b.	

¹(Lee und Noble 2003), ²(San-Juan *et al.* 2010)

Tab. 3.9: Mittels GC-MS vorläufig identifizierte geruchsaktive Substanzen aus der Biotransformation von gefriergetrockneten Karottenschalen durch *L. edodes* im Minimalmedium M1, mit Kováts-Indizes (KI) auf polarer Trennphase mit Standard- und Literatur-Vergleichswerten

Substanz	Probe	KI HP-Innowax	
		Standard	Literatur
3-Methyl-1-butanol	1197	1204	1206 ¹
Essigsäure	1447	1449	1452 ²
2-Phenylethanol	1900	1901	1916 ²

¹(Lee und Noble 2003), ²(San-Juan *et al.* 2010)

Von 18 Geruchseindrücken (exklusive IS) wurden drei Gerüchen anhand des Datenbankvergleichs der Massenspektren Verbindungen zugeordnet. Die Substanzen mit den höchsten FD-Faktoren waren Essigsäure, 2-Phenylethanol und eine nicht identifizierte Verbindung mit einem KI von 1641 (GC-FID-O), deren Geruchseindruck als „Apfel und modrig“ beschrieben wurde.

3.5 Biotransformation von Karottenschalen durch *W. cocos*

Für die Biotransformation von Karottenschalen (gefriergetrocknet, gemahlen) durch *W. cocos* und den entsprechenden Substrat-Blindwert wurde das Medium M1 (2.5.3) und für den Pilz-Blindwert das Medium M2 (2.5.5) verwendet. Die Kultivierung erfolgte gemäß 2.5.9.1 und 2.5.10.1. Die Biotransformation sowie die Blindwerte wurden auf Grund der Ergebnisse des Screenings an Kulturtag 6 beendet. Der Kulturabbruch erfolgte für alle weiteren Biotransformationen von Karottenschalen durch *W. cocos* entsprechend immer an Kulturtag 6. Die Ergebnisse der kulturbegleitenden Sensorik sind im Anhang (Tab. 7.28) dargestellt.

3.5.1 Gesamtsensorik

Die Gesamtsensorik der Biotransformation, des Substrat-Blindwertes und des Pilz-Blindwertes wurde analog 2.7.2 bestimmt. Der Geruchseindruck der Biotransformation wurde als „zitronig, blumig, Nivea-Creme, frisch“ wahrgenommen und unterschied sich deutlich von den Blindwerten. Die Beurteilung der Geruchseindrücke des Pilz- und des Substrat-Blindwertes erfolgten analog. Der Geruch des

Substrat-Blindwertes wurde als „nach Karotte, erdig, dumpf, süßlich, herb, fruchtig“ und der des Pilz-Blindwertes als „zitronig, krautig, herb, Zitronenmelisse“ beschrieben.

3.5.2 Kulturparameter

3.5.2.1 pH-Wert Verlauf

Die Bestimmung des pH-Wert-Verlaufes (Abb. 3.7) der Biotransformation von Karottenschalen (lyophilisiert, gemahlen) durch *W. cocos* in Medium M1, des Pilz-Blindwertes und des Substrat-Blindwertes erfolgte nach 2.8.

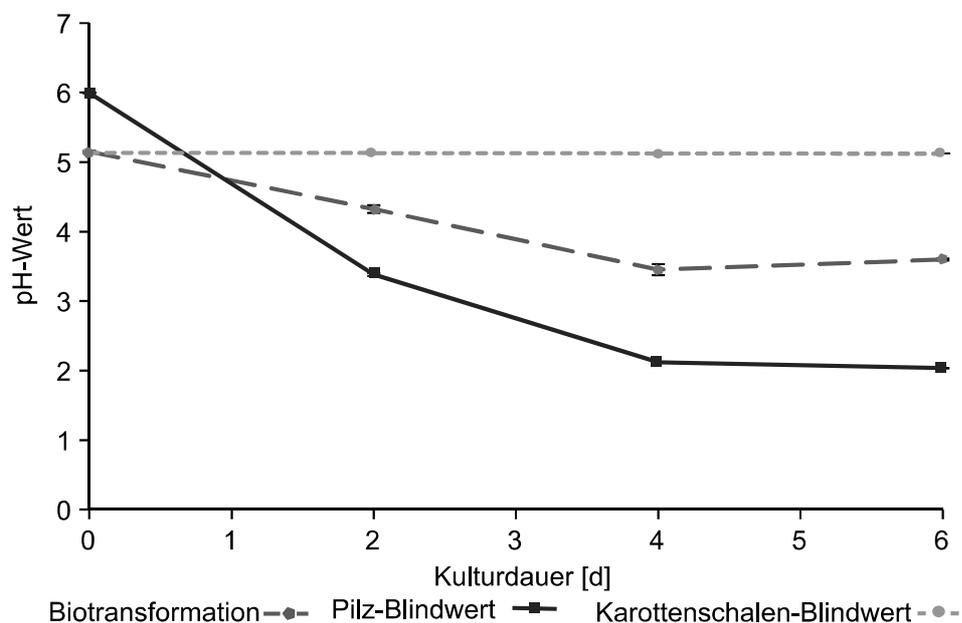


Abb. 3.7: pH-Wert über den Kulturverlauf der Biotransformation von Karottenschalen durch *W. cocos* (Biotransformation), des Pilz-Blindwertes (Pilz-Blindwert) und des Substrat-Blindwertes (Karottenschalen-Blindwert)

Der pH-Wert des Substrat-Blindwertes blieb über den Kulturzeitraum konstant bei 5,1. Die pH-Werte von Biotransformation und Pilz-Blindwert zeigten einen ähnlichen Verlauf, fielen aber unterschiedlich stark ab. Der pH-Wert des Pilz-Blindwertes sank auf einen Wert von 2,0 ab, der pH-Wert der Biotransformation hingegen nur auf ungefähr 3,6.

3.5.3 Detektion und Identifizierung aromaaktiver Verbindungen

Die Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen (Tab. 3.10) erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (2.9.1) gaschromatographisch mittels GC-MS-MS-O-Analyse auf einer polaren (2.10.3, Tab. 2.16) und einer unpolaren Trennphase (2.10.3, Tab. 2.17). Durch Vergleich der Retentionsindizes nach Kováts (2.10.4) sowie der Massenspektren der zugeordneten Probenpeaks mit der Datenbank wurde auf bestimmte Verbindungen geschlossen.

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung des erhaltenen Aromaextrakts wurden bis zu elf Substanzen detektiert (Abb. 3.8). Von diesen wurden neun in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen.

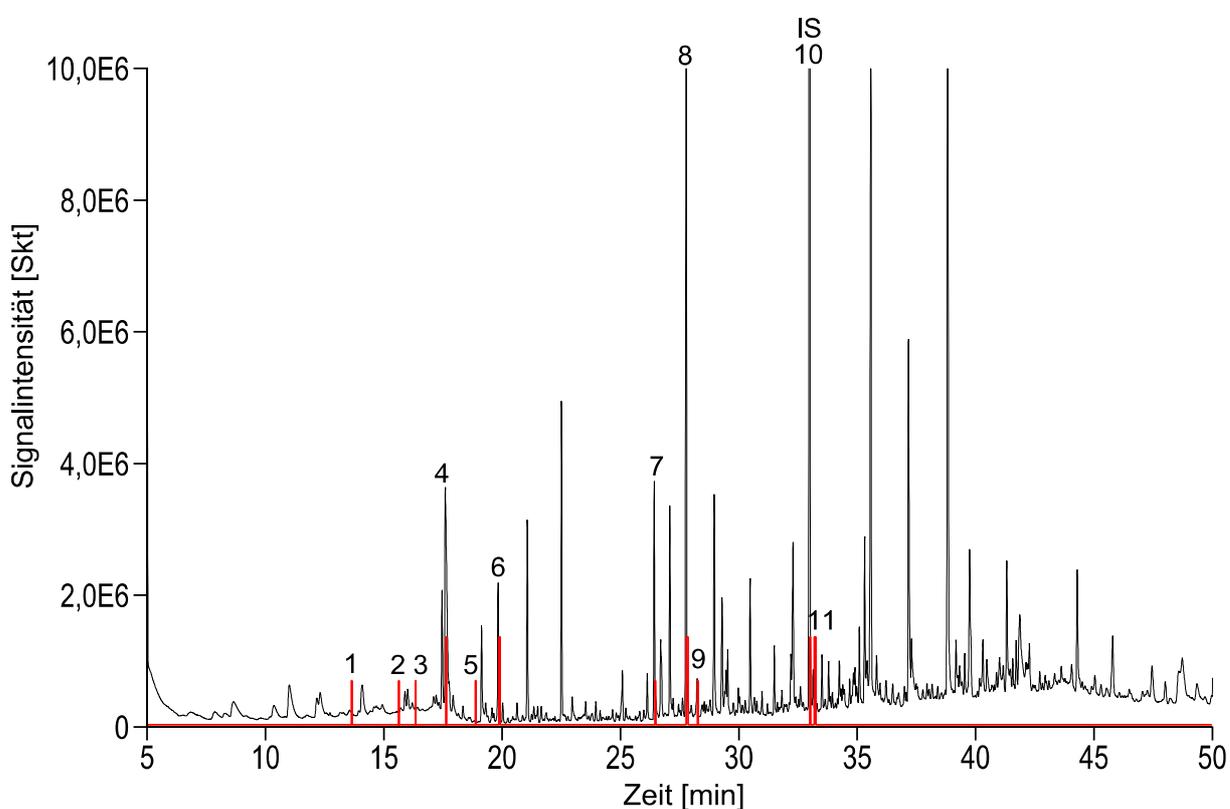


Abb. 3.8: GC-MS-MS-O-Chromatogramm der Biotransformation von gefriergetrockneten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1 (schwarz) mit OPD-Spur (rot),
IS = Interner Standard

Durch Vergleich der ODP-Spur mit dem GC-MS-Chromatogramm (Abb. 3.8) konnten von elf Geruchseindrücken sechs einem Peak zugeordnet werden und ein Strukturvorschlag der Datenbank erhalten werden.

3 Ergebnisse

Tab. 3.10: Untersuchung aromaaktiver Substanzen aus der Biotransformation von gefriergetrockneten Karottenschalen durch *W. cocos* im Medium M1 mittels GC-MS-MS-O-Analyse mit Strukturvorschlägen, berechneten Kováts-Indizes (KI) auf einer polaren Säule und Vergleichsgerüchen aus der Literatur (Geruch Lit.), - = kein Peak zuordenbar, n.b. = keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich, * = Interner Standard

#	Geruchseindruck	KI	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	Pilz	-	-	
2	erdig	-	-	
3	Pilz	-	-	
4	Essig	1459	Essigsäure	Essig ¹
5	Kunststoff	-	-	
6	blumig, frisch, zitrus	1551	Linalool	blumig ²
7	blumig	1850	(<i>E</i>)-Geraniol	Rose, Geranie ²
8	blumig, Rose, Honig	1916	2-Phenylethanol	Rose ¹
9	Himbeere	1940	β -Ionon	blumig, Himbeere ²
10*	krautig, würzig	2193	Thymol	
11	getrocknete Kräuter	2201	n.b.	

¹(San-Juan *et al.* 2010), ²(Högnadóttir und Rouseff 2003)

Die fünf vorläufig identifizierten Verbindungen (Nr. 4, 6–9 aus Tab. 3.10) konnten mit Hilfe der Retentionsindizes nach Kováts und auf Grundlage der eingesetzten authentischen Standards, des Literaturvergleiches sowie des Geruchseindrucks vollständig identifiziert werden (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Mittels GC-MS-MS-O-Analytik sensorisch wahrgenommene Substanzen aus der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen durch *W. cocos* im Medium M1 auf einer HP-Innowax- und einer DB-5MS-Säule mit Standard- und Literaturvergleichswerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	Probe	Standard	Literatur	Probe	Standard	Literatur
Essigsäure	1459	1460	1452 ¹	<800	<800	600 ¹
Linalool	1551	1552	1551 ²	1101	1101	1107 ²
(<i>E</i>)-Geraniol	1850	1851	1850 ²	1258	1258	1276 ²
2-Phenylethanol	1916	1915	1916 ¹	1116	1116	1108 ¹
β -Ionon	1940	1939	1955 ²	1492	1492	1494 ²

¹(San-Juan *et al.* 2010), ²(Högnadóttir und Rouseff 2003)

3.5.4 FD-Faktoren und Aromawerte

Die FD-Faktoren (Tab. 3.12) wurden durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (2.11) an einem GC-FID-O (2.10.1, Tab. 2.12) ermittelt. Die Aromawerte wurden nach 2.12 berechnet. Die Quantifizierung der olfaktometrisch detektierten Verbindungen erfolgte analog 2.10.6. Die zur Quantifizierung herangezogenen Response-Faktoren sind im Anhang (Tab. 7.36) aufgeführt.

Tab. 3.12: FD-Faktoren, Konzentration im Kulturüberstand (Konz.), Aromawerte (OAV) und Literatur-Geruchsschwellenwerte der identifizierten geruchsaktiven Verbindungen der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1

Substanz	FD-Faktor	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Geruchsschwellenwert (Lit) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	OAV
Essigsäure	16	1.920 \pm 90	22.000 ¹	<1
Linalool	64	70 \pm 10	0,14 ²	521
(<i>E</i>)-Geraniol	8	130 \pm 40	1,10 ³	117
2-Phenylethanol	64	560 \pm 40	140 ³	4
β -Ionon	1	5 \pm 0	3,50 ³	1

¹(Karagül-Yüceer *et al.* 2003), ²(Fritsch und Schieberle 2005), ³(Czerny *et al.* 2008)

Die höchsten FD-Faktoren wurden für Essigsäure, Linalool und 2-Phenylethanol bestimmt. Mit Ausnahme der Essigsäure hatten alle identifizierten Verbindungen

einen Aromawert größer bzw. gleich eins. Die höchsten Aromawerte wurden für Linalool (521) und (*E*)-Geraniol (117) erhalten.

3.5.5 Vergleich mit Blindwerten

Die in der Biotransformation olfaktometrisch wahrgenommenen und identifizierten Verbindungen wurden zum Vergleich auch in den Blindwerten gemäß 2.10.6 quantifiziert.

2-Phenylethanol wurde im Pilz- und Substrat-Blindwert in vernachlässigbar geringen Mengen ($<10 \mu\text{g L}^{-1}$) nachgewiesen. Essigsäure und β -Ionon wurden im Substrat-Blindwert, jedoch nicht im Pilz-Blindwert gebildet. Die Konzentration von Essigsäure betrug $3.760 \mu\text{g L}^{-1}$ und die von β -Ionon $30 \mu\text{g L}^{-1}$. Beide Gehalte waren im Substrat-Blindwert höher als in der Biotransformation (Tab. 3.12). Linalool und (*E*)-Geraniol wurden nur in der Biotransformation gaschromatographisch-olfaktometrisch nachgewiesen und sind somit Produkte der Biotransformation.

Durch Vergleich mit dem Substrat- und Pilz-Blindwert (Abb. 3.9) wurde ebenfalls ermittelt, ob Verbindungen neu gebildet wurden, die nicht sensorisch detektiert wurden (A bis E, Tab. 3.13).

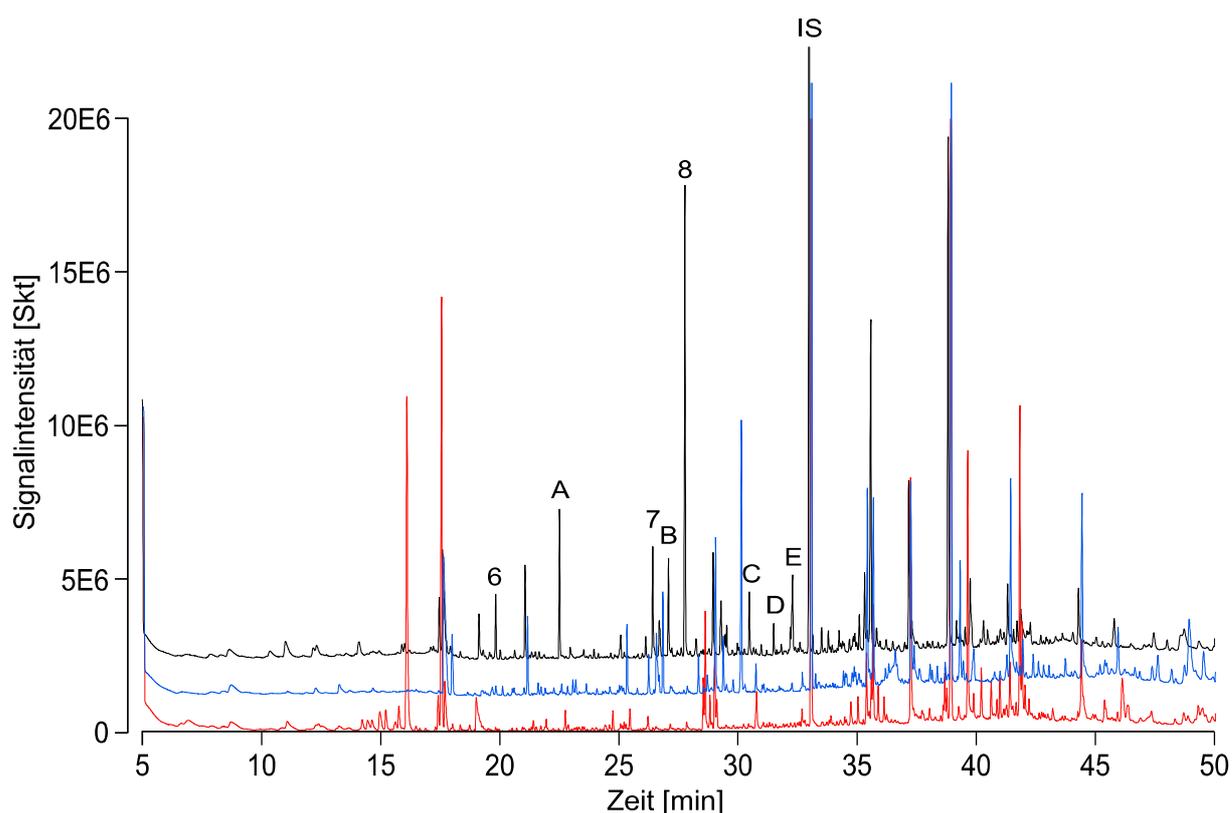


Abb. 3.9: Vergleich der GC-MS-MS-O-Chromatogramme der Biotransformation (schwarz), des Substrat-Blindwertes (blau) und des Pilz-Blindwertes (rot); 6,7 und 8 markieren die geruchsaktiven Verbindungen, A bis E markieren die nicht olfaktometrisch detektierten Verbindungen

Tab. 3.13: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der olfaktometrisch nicht detektierten Verbindungen mit den Kováts-Indizes auf einer HP-Innowax-Säule (in Klammern DB-5MS) (KI), den Literaturvergleichswerten (KI Literatur), den Kováts-Indizes authentischer Standards (KI Standard) und den Substanzvorschlägen

	Substanzvorschlag	KI	KI Standard	KI Literatur
A	2-Furanmethanol	1666 (927)	1666 (928)	1662 ¹ (860) ³
B	Benzylalkohol	1881 (1038)	1881 (1038)	1869 ² (1036) ⁴
C	n.b.	2054	-	-
D	3,7-Dimethyl-6-nonenal	2110	-	-
E	n.b. (Co-Elution)	2153	-	-

¹(Soria *et al.* 2008), ²(Komes *et al.* 2006), ³(Ho *et al.* 2007), ⁴(Setzer *et al.* 2006)

Von den fünf sensorisch nicht detektierten Verbindungen wurden durch Datenbankvergleich der Massenspektren Substanzvorschläge für drei Verbindungen erhalten.

Die Substanzen 2-Furanmethanol und Benzylalkohol wurden durch Vergleich der Massenspektren mit der Datenbank sowie der Retentionsindizes nach Kováts mit authentischen Standards und Literatur auf einer polaren Säule und auf einer unpolaren Säule identifiziert. Bei den Peaks C und E konnte anhand der Massenspektren keine sichere Zuordnung zu einem Substanzvorschlag erfolgen.

Die β -Carotin-Abbauprodukte 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid wurden – im Gegensatz zu β -Ionon – nicht olfaktometrisch, sondern nur massenspektrometrisch in der Biotransformation und dem Substrat-Blindwert detektiert.

Die Quantifizierung erfolgte analog 2.10.6. Zur Berechnung der Konzentration von 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid wurde ein Response-Faktor von 1 angenommen. Nach gaschromatographischer-massenspektrometrischer Analyse der Proben zeigte sich anhand des Massenspektrums eine Co-Elution von β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon auf der unpolaren Säule. Zur Quantifizierung wurde für β -Ionon die Fläche des Ions (m/z) 177 und für 5,6-Epoxy- β -ionon die Summe der Flächen der Ionen der m/z 43 und 123 herangezogen.

Tab. 3.14: Konzentration und Kováts-Indizes (KI, Biotransformation/Substrat-Blindwert (Literatur)) der β -Carotin-Abbauprodukte in der Biotransformation und im Substrat-Blindwert auf einer polaren und einer unpolaren Trennsäule, DHA = Dihydroactinidiolid

Substanz	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$] Biotrans	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$] Substrat-BW	KI Innowax	KI DB-5MS
5,6-Epoxy- β -ionon	10 \pm 0	30 \pm 0	1992/1997(1964) ¹	1492/1492(1459) ²
DHA	400 \pm 30	240 \pm 2	2344/2348(2348) ³	1540/1541(1525) ⁴

¹(Zelena *et al.* 2009), ²Retentionsindex auf DB-1 Trennsäule (Habu *et al.* 1985), ³(Binder *et al.* 1990), ⁴(Pino *et al.* 2005),

Die Gehalte an β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon waren im Substrat-Blindwert höher als in der Biotransformation. Die Konzentration an Dihydroactinidiolid hingegen war in der Biotransformation deutlich größer als im Substrat-Blindwert.

3.6 Optimierung der Kulturparameter

Bei gleichbleibendem Geruchseindruck wurde die Medienzusammensetzung – zur Kostenreduzierung – verändert (Tab. 2.10) und die Verwendung von unbehandelten Karottenschalen untersucht. Die Kultivierung der Biotransformationen erfolgte gemäß 2.5.9.1. Die Beurteilung der Geruchseindrücke erfolgte analog 2.7.2. Die Optimierungsschritte wurden durch Vergleich der Geruchseindrücke zu Referenzkulturen überprüft.

3.6.1 Verwendung unbehandelter Karottenschalen

Die Verwendung unbehandelter Karottenschalen zur Vereinfachung der Substratvorbehandlung wurde durch Beurteilung des Geruchseindrucks bewertet.

Das Aroma der Biotransformation von gefriergetrockneten Karottenschalen (Referenzkultur) wurde von den Prüfern als „Nivea-Creme, zitronig und blumig“ beschrieben. Der Geruchseindruck der Biotransformation mit unbehandelten Karottenschalen wurde als „Nivea-Creme, zitronig, blumig und etwas fruchtiger“ beurteilt und führte im Vergleich zur Verwendung lyophilisierter Karottenschalen reproduzierbar zu vergleichbaren Geruchseindrücken.

3.6.1.1 pH-Wert-Verlauf

Die Bestimmung des pH-Wert-Verlaufes (Abb. 3.10) der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos*, des Pilz-Blindwertes und des Substrat-Blindwertes erfolgte nach 2.8.

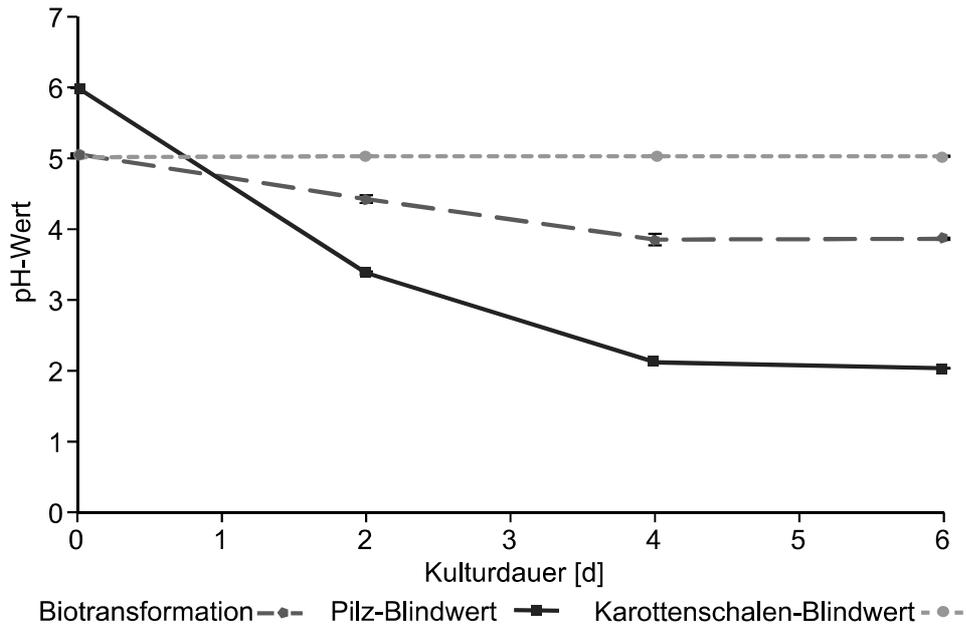


Abb. 3.10: pH-Wert über den Kulturverlauf der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* (Biotransformation), des Pilz-Blindwertes (Pilz-Blindwert) und des Substrat-Blindwertes (Karottenschalen-Blindwert) in Medium M1

Der pH-Wert des Substrat-Blindwertes blieb wie bei allen Substrat-Blindwerten über die Kulturdauer von sechs Tagen konstant bei ungefähr 5,0. Die pH-Werte der Biotransformation und des Pilz-Blindwertes verliefen ab dem zweiten Kulturtag parallel zu einander. Der pH-Wert des Pilz-Blindwertes sank jedoch auf einen deutlich niedrigeren pH-Wert ab als der der Biotransformation (Abb. 3.10).

3.6.1.2 Detektion und Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung des nach der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1 am Kulturtag 6 erhaltenen Aromaextrakts wurden bis zu 16 geruchsaktive Substanzen detektiert (Abb. 3.11). Von diesen wurden zehn in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen. Die Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen (Tab. 3.15) erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (2.9.1) gaschromatographisch mittels GC-MS-MS-O-Analyse auf einer polaren Trennphase (2.10.3, Tab. 2.16) und einer unpolaren Trennsäule (2.10.3, Tab. 2.17).

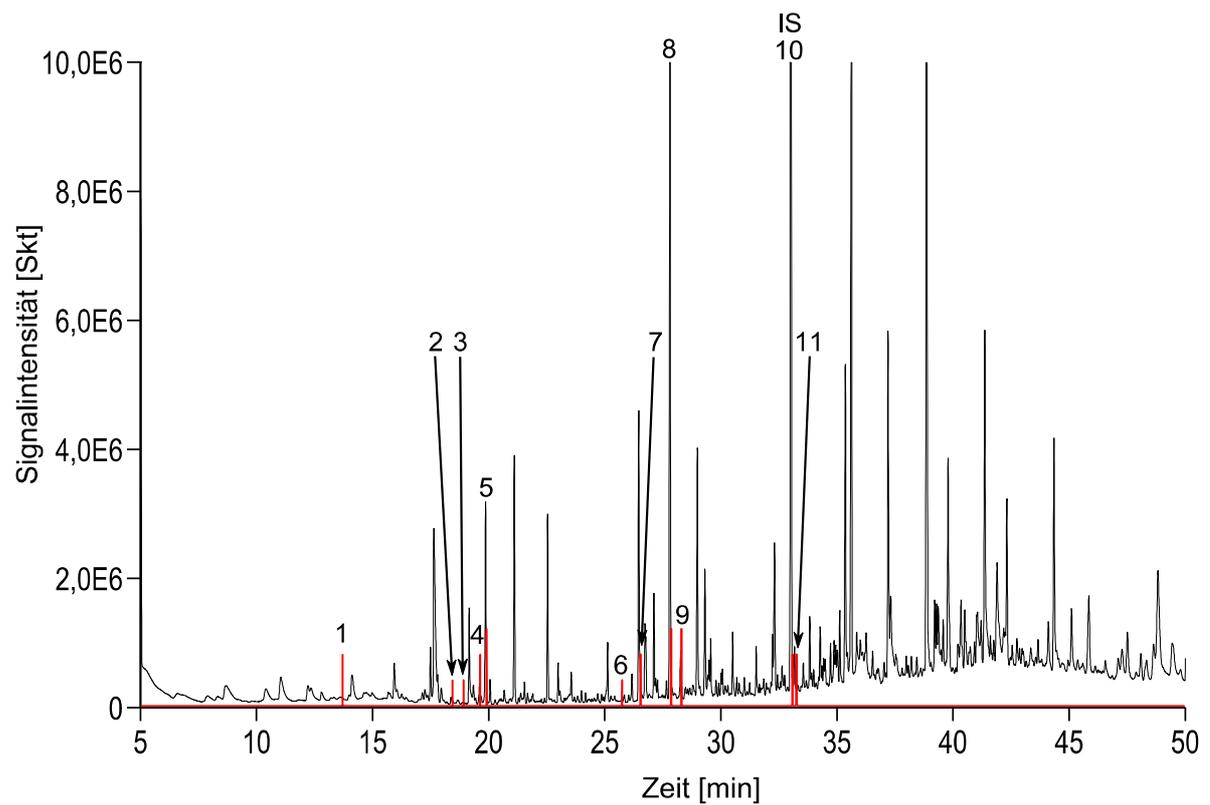


Abb. 3.11: GC-MS-MS-O-Chromatogramm der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1 (schwarz) mit OPD-Spur (rot), IS = Interner Standard

Durch Vergleich der ODP-Spur mit dem Chromatogramm (Abb. 3.11) konnten von elf Geruchseindrücken fünf einem Peak zugeordnet werden und so ein Strukturvorschlag der Datenbank erhalten werden.

3 Ergebnisse

Tab. 3.15: Untersuchung aromaaktiver Substanzen aus der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen in Medium M1 mittels GC-MS-MS-O-Analyse mit Strukturvorschlägen, berechneten Retentionsindizes (KI) auf einer HP-Innowax- und einer DB-5MS-Säule und Vergleichsgerüchen aus der Literatur (Geruch Lit.), - = kein Peak zuordenbar, n.b. = keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich, * = Interner Standard

#	Geruchseindruck	KI Innowax	KI DB-5	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	Pilz	-		-	
2	erdig	1489		n.b.	
3	Kunststoff	-		-	
4	muffig	1541		n.b.	
5	blumig, frisch	1553	1101	Linalool	blumig ¹
6	erdig	-		-	
7	blumig, süß	1850	1258	(<i>E</i>)-Geraniol	Rose, Geranie ¹
8	Rose, Honig	1917	1116	2-Phenylethanol	Rose ²
9	Veilchen, Himbeere	1941	1491	β -Ionon	blumig, Himbeere ¹
10*	würzig, krautig	2195	1293	Thymol	
11	getrocknete Kräuter	2201		n.b.	

¹(Högnadóttir und Rouseff 2003), ²(San-Juan *et al.* 2010)

Die vorläufig identifizierten Verbindungen Linalool, (*E*)-Geraniol, 2-Phenylethanol und β -Ionon wurden durch Vergleich der Kováts-Indizes auf zwei Säulen, Massenspektren von authentischen Standards und durch Literaturvergleich sowie durch den Geruchseindruck vollständig identifiziert. Die Kováts-Indizes der authentischen Standards und aus der Literatur sind in Tab. 3.11 angegeben. Essigsäure (KI 1461 (Innowax) und <800 (DB-5MS)) wurde mittels GC-MS-MS-O-Analyse in zwei von drei Läufen olfaktometrisch detektiert und wurde daher hier auch berücksichtigt.

Die FD-Faktoren der olfaktometrisch detektierten Verbindungen wurden durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (2.11) an einem GC-FID-O (2.10.1) ermittelt. Die Aromawerte wurden, unter Verwendung von Geruchsschwellenwerten (Tab. 3.12) aus der angegebenen Literatur, nach 2.12 berechnet (Tab. 3.16). Der Gehalt der identifizierten Verbindungen wurde gemäß 2.10.6 bestimmt.

Tab. 3.16: FD-Faktoren, Konzentration im Kulturüberstand [$\mu\text{g L}^{-1}$] (Konz.) und berechnete Aromawerte (OAV) der identifizierten geruchsaktiven Verbindungen der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1

Substanz	FD-Faktor	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$]	OAV
Essigsäure	16	1.200 \pm 60	<1
Linalool	64	100 \pm 0	736
(<i>E</i>)-Geraniol	2	170 \pm 10	156
2-Phenylethanol	64	400 \pm 10	3
β -Ionon	4	10 \pm 0	3

¹(Karagül-Yüceer *et al.* 2003), ²(Fritsch und Schieberle 2005), ³(Czerny *et al.* 2008)

Mit Ausnahme der Essigsäure hatten die identifizierten Aromastoffe einen Aromawert größer 1.

3.6.1.3 Vergleich mit lyophilisierten Karottenschalen

Die Gehalte der olfaktometrisch detektierten Verbindungen der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen und von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1 wurden analog (2.10.6) berechnet.

Bei gleichbleibendem Geruchseindruck der Biotransformation nach Umstellung auf unbehandelte Karottenschalen zeigte sich in der Konzentration der Essigsäure und des 2-Phenylethanol eine Verringerung zur Biotransformation mit lyophilisierten Karottenschalen. Die Gehalte an Linalool, (*E*)-Geraniol und β -Ionon wurden im Vergleich zur Biotransformation mit lyophilisierten Karottenschalen leicht gesteigert.

Auf Grund der erfolgreichen Umstellung (basierend auf dem Geruchseindruck) auf unbehandelte Karottenschalen wurden alle weiteren Versuche mit diesen durchgeführt.

3.6.1.4 Detektierte potentielle β -Carotin-Abbauprodukte

Durch GC-MS-MS-O-Analyse (2.10.3, Tab. 2.16, Tab. 2.17) der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1 wurde β -Ionon sensorisch in allen vier Läufen detektiert. β -Ionon hatte einen FD-Faktor von vier und einen Aromawert von drei (Tab. 3.16). 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid

wurden durch GC-MS-MS-O-Analyse, jedoch nicht olfaktometrisch detektiert. Im Substrat-Blindwert wurden 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid gaschromatographisch-massenspektrometrisch und β -Ionon auch sensorisch detektiert.

Die Quantifizierung erfolgte gemäß 2.10.6. Zur Berechnung der Konzentration von 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid wurde ein Response-Faktor von 1 eingesetzt.

Tab. 3.17: Konzentration und Kováts-Indizes (KI, Biotransformation/Substrat-Blindwert) der β -Carotin-Abbauprodukte 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid in der Biotransformation (Biotrans.) unbehandelter Karottenschalen und im Substrat-Blindwert (Substrat-BW) in Medium M1 auf einer polaren und einer unpolaren Trennsäule, DHA = Dihydroactinidiolid

Substanz	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$] Biotrans.	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$] Substrat-BW	KI Innowax	KI DB-5MS
5,6-Epoxy- β -ionon	30 \pm 0	50 \pm 0	1994/1996	1491/1492
DHA	350 \pm 10	190 \pm 2	2344/2348	1540/1541

Literaturwerte der Kováts-Indizes sind in Tab. 3.14 angegeben.

Wie bei der Verwendung von gefriergetrockneten Karottenschalen waren auch bei Kulturen mit unbehandelten Karottenschalen die Konzentrationen von β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon im Substrat-Blindwert höher als in der Biotransformation. Der Gehalt an Dihydroactinidiolid hingegen war in der Biotransformation signifikant höher.

3.6.2 Medienoptimierung

Die Beurteilung der Geruchseindrücke der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in den verschlankten Medien erfolgte gemäß 2.7.2 (Tab. 3.18). Eine Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1 diente als Referenz.

Tab. 3.18: Geruchseindrücke der Biotransformationen von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in den Medien M1 (Referenz) bis M9, NaAsp = Natriumaspartat-Monohydrat, SE-Lsg. = Spurenelementlösung

M	Verzicht auf	Geruchseindruck
1	-	blumig, Nivea-Creme, Zitrone, fruchtig
3	SE-Lösung	blumig, Zitrone, fruchtig
4	BME-Lösung	Zitrone, frisch, blumig, intensiv
5	SE- und BME-Lösung	blumig, Nivea-Creme, Zitrone, dumpf
6	NaAsp, NH ₄ NO ₃	blumig, Nivea-Creme, Zitrone
7	SE- und BME-Lsg., NaAsp, NH ₄ NO ₃	blumig, Nivea-Creme, Zitrone, dumpf
8	NH ₄ NO ₃	wenig intensiv blumig, Nivea-Creme
9	BME-Lösung, NaAsp, NH ₄ NO ₃	Nivea-Creme, frisch, blumig, Zitrone, Parfüm

Bei ähnlichem Geruchseindruck der Biotransformation in den Medien M3 bis M8 wurden die ansprechendsten Geruchseindrücke in den Medien M4 und M6 erzielt. Die Quantifizierung der Aromastoffe Linalool, (*E*)-Geraniol und 2-Phenylethanol in Biotransformationen in den Medien M3 bis M8 (Abb. 3.12) erfolgte gemäß 2.10.6.

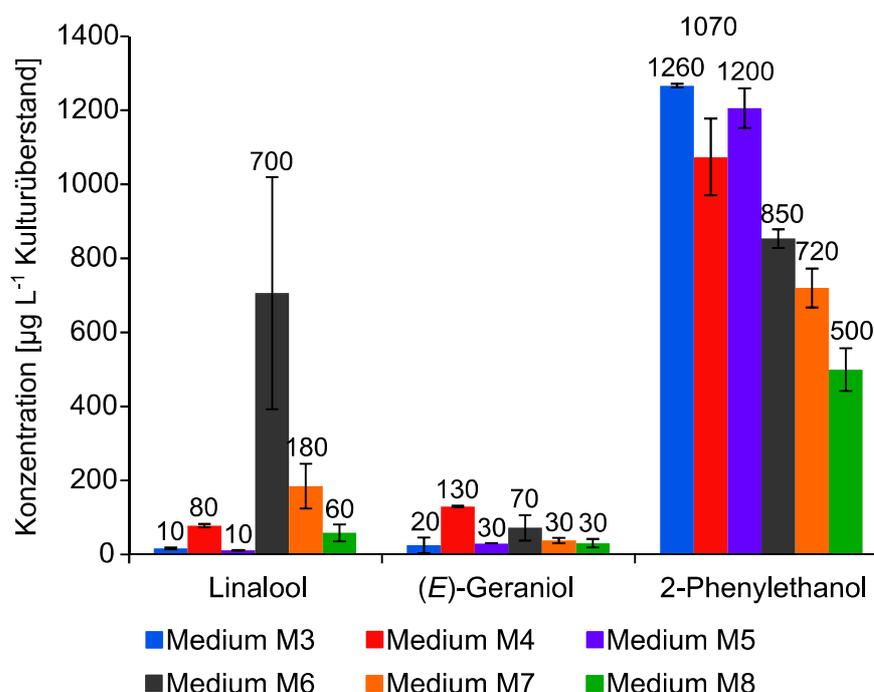


Abb. 3.12: Vergleich der Gehalte von Linalool, (*E*)-Geraniol und 2-Phenylethanol in den Medien M3 bis M8

In Medium M6 (grau) wurde, im Vergleich zu den anderen Medien, die höchste Linalool-Konzentration detektiert. Die (*E*)-Geraniol-Konzentration war im Medium M4 (rot) am höchsten.

Durch gleichzeitigen Verzicht auf die Stickstoffquellen (Natriumaspartat und Ammoniumnitrat) sowie die Vitaminlösung (BME-Lösung) wurde Medium M9 entwickelt. Der Geruchseindruck der Biotransformation in Medium M9 wurde als „Nivea-Creme, frisch, blumig, Zitrone, Parfüm“ beschrieben und von den Prüfern als ebenso ansprechend empfunden wie die Geruchseindrücke in den Medien M4 und M6.

Im Folgenden wird nur auf die Kultivierung der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen im optimierten Medium M9 eingegangen.

3.6.2.1 Gesamtsensorik

Die Gesamtsensorik der Biotransformation, des Substrat-Blindwertes und des Pilz-Blindwertes wurde analog 2.7.2 an Kulturtag 6 bestimmt. Der Geruchseindruck der Biotransformation wurde als „Nivea-Creme, frisch, blumig, Zitrone, Parfüm“ wahrgenommen und unterschied sich deutlich von den Blindwerten. Die Beurteilung der Geruchseindrücke des Substrat- und des Pilz -Blindwertes erfolgten gemäß (Tab. 3.2, Tab. 3.6). Der Geruch des Substrat-Blindwertes wurde als „nach Karotte, erdig, dumpf, süßlich, herb, fruchtig“ und der des Pilz-Blindwertes als „zitronig, krautig, herb, Zitronenmelisse“ beschrieben.

3.6.2.2 pH-Wert-Verlauf

Die Bestimmung des pH-Werts (Abb. 3.13) der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos*, des Pilz-Blindwertes und des Substrat-Blindwertes in Medium M9 erfolgte nach 2.8.

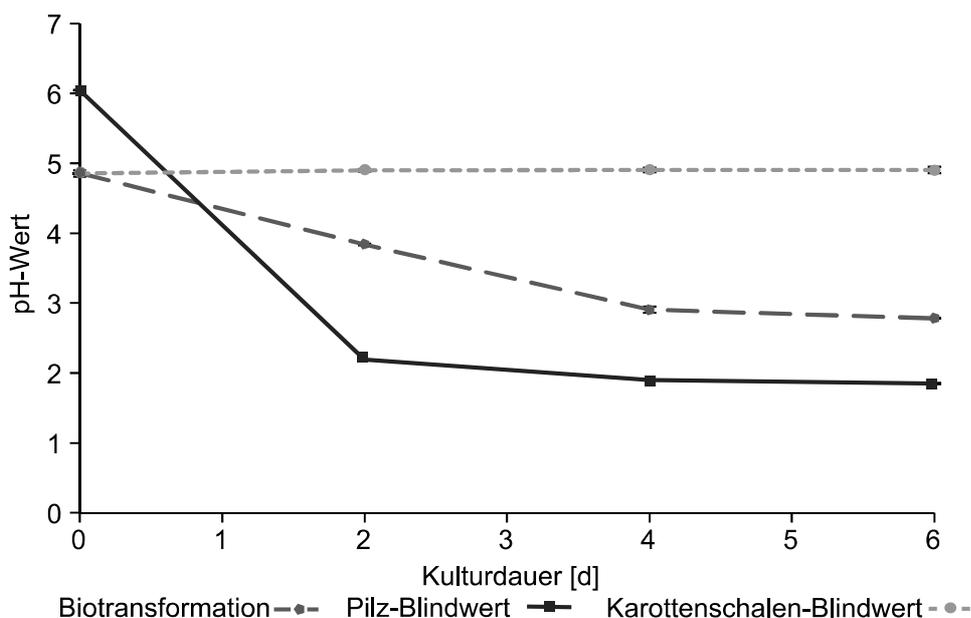


Abb. 3.13: pH-Wert über den Kulturverlauf der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* (Biotransformation), des Pilz-Blindwertes (Pilz-Blindwert) und des Substrat-Blindwertes (Karottenschalen-Blindwert) in Medium M9

Der pH-Wert des Substrat-Blindwertes blieb konstant bei ungefähr 4,9. Der pH-Wert der inokulierten Ansätze verlief ab dem vierten Kulturtag parallel zueinander. Der pH-Wert des Pilz-Blindwertes sank ab Kulturtag zwei deutlich ab und blieb dann annähernd konstant bei einem pH-Wert um 1,9. Der pH-Wert der Biotransformation betrug 2,8 und lag zwischen den beiden Blindwerten.

3.6.2.3 Detektion und Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen im optimierten Medium M9

Bei der gaschromatographisch-olfaktometrischen Untersuchung des Aromaextrakts der Biotransformation im optimierten Medium M9 am Kulturtag 6 wurden bis zu 18 Substanzen olfaktometrisch detektiert. Von diesen wurden neun in mindestens drei voneinander unabhängigen Läufen wahrgenommen (Abb. 3.14). Die Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen (Tab. 3.19) erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (2.9.1) mittels GC-MS-MS-O-Analyse auf einer polaren (2.10.3, Tab. 2.16) und einer unpolaren Trennphase (2.10.3, Tab. 2.17).

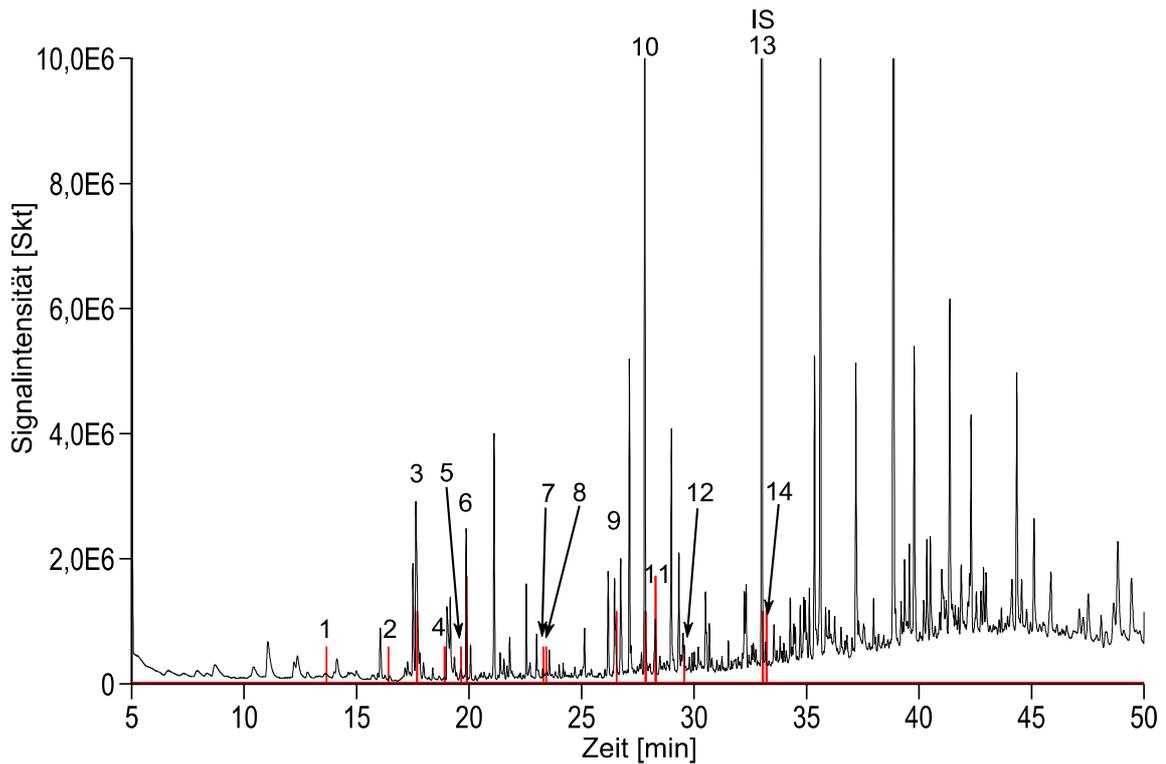


Abb. 3.14: GC-MS-MS-O-Chromatogramm der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 (schwarz) mit OPD-Spur (rot), IS = Interner Standard

Von 14 Geruchseindrücken wurden neun einem Peak zugeordnet, sechs davon konnten mittels Datenbankvergleich der Massenspektren einem Substanzvorschlag zugeordnet werden. Bei drei Peaks war keine sichere Zuordnung zu einem Strukturvorschlag möglich.

Tab. 3.19: Untersuchung flüchtiger Substanzen aus der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* im optimierten Medium M9 mittels GC-MS-MS-O-Analyse mit Strukturvorschlägen, berechneten Kováts-Indizes (KI) auf einer HP-Innowax-Säule und Vergleichsgerüchen aus der Literatur (Geruch Lit.), - = kein Peak zuordenbar, n.b. = keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich, * = Interner Standard

#	Geruchseindruck	KI	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	Pilz	-	-	-
2	Pilz	-	-	-
3	Essig	1460	Essigsäure	Essig ¹
4	Kunststoff, Karotte	-	-	-

#	Geruchseindruck	KI	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
5	erdig, Brot	-	-	-
6	blumig, zitrus	1552	Linalool	blumig ²
7	Kunststoff	1699	n.b.	-
8	erdig, Brot	-	-	-
9	blumig, süß	1850	(<i>E</i>)-Geraniol	Rose, Geranie ²
10	blumig, Rose	1916	2-Phenylethanol	Rose ¹
11	Himbeere, Veilchen	1940	β -Ionon	blumig, Himbeere ²
12	süß	2005	n.b.	-
13*	Kräuter	2192	Thymol	-
14	getrocknete Kräuter	2201	n.b.	-

¹(San-Juan *et al.* 2010), ²(Högnadóttir und Rouseff 2003)

Die Identifizierung der fünf Verbindungen erfolgte anhand von Massenspektrenvergleich sowie Vergleich der Kováts-Indizes auf zwei unterschiedlichen Säulen mit authentischen Standards und anhand der Literatur sowie durch Vergleich der Geruchseindrücke mit der Literatur.

Die Gehalte der sensorisch detektierten Verbindungen wurden nach 2.10.6 bestimmt. Die Aromawerte (Tab. 3.20) wurden analog 2.12 berechnet. Die zur Berechnung herangezogenen Schwellenwerte sind in Tab. 3.12 angegeben. Die Kováts-Indizes authentischer Standards sowie Literaturwerte sind in Tab. 3.11 aufgeführt.

Tab. 3.20: Konzentration im Kulturüberstand [$\mu\text{g L}^{-1}$] (Konz.), Aromawerte (OAV) und Kováts-Indizes (Innowax und DB-5MS) der identifizierten, geruchsaktiven Verbindungen der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9

Substanz	KI Innowax	KI DB-5MS	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$]	OAV
Essigsäure	1460	<800	1.600 \pm 120	<1
Linalool	1552	1101	100 \pm 10	721
(<i>E</i>)-Geraniol	1850	1258	60 \pm 0	56
2-Phenylethanol	1916	1116	530 \pm 0	4
β -Ionon	1939	1492	10 \pm 0	3

Die Aromawerte der identifizierten Verbindungen – bis auf den der Essigsäure – waren größer 1.

Die Biotransformationen von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M1 und dem optimierten Medium M9 unterschieden sich in ihren Gehalten an Essigsäure und (*E*)-Geraniol. Der Unterschied der Konzentration an Essigsäure betrug ungefähr $300 \mu\text{g L}^{-1}$, die Konzentration an (*E*)-Geraniol war in der Biotransformation in Medium M9 um den Faktor 2 geringer. Die Gehalte an Linalool, 2-Phenylethanol und β -Ionon unterschieden sich nicht signifikant. Der Aromawert der Essigsäure lag für beide Biotransformationen unter eins. Die Geruchseindrücke der Biotransformationen wie auch die Geruchseindrücke der gaschromatographisch-olfaktometrischen Analyse waren vergleichbar.

In den drei unterschiedlichen Biotransformationen von Karottenschalen durch *W. cocos* handelte es sich bei den identifizierten aromaaktiven Verbindungen immer um Essigsäure, Linalool, (*E*)-Geraniol, 2-Phenylethanol und β -Ionon.

3.6.2.4 Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse (AEVA)

Die Bestimmung der Hauptaromakomponenten der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 wurde mittels Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse gemäß 2.11 an einem GC-FID-O (2.10.1, Tab. 2.12) durchgeführt. Das erhaltene FD-Diagramm wurde dem Gaschromatogramm mit ODP-Spur gegenübergestellt (Abb. 3.15). In der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch auch 1-Octen-3-ol detektiert. Auf Grund des verwendeten Temperaturprogramms und einer polaren Trennsäule kam es zu einer Co-Elution von Essigsäure und 1-Octen-3-ol. Während der Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse wurden beide Verbindungen olfaktometrisch wahrgenommen.

3.6.2.5 Vergleich mit Blindwerten

Die olfaktometrisch wahrgenommenen Verbindungen wurden in der Biotransformation und in den Blindwerten gemäß 2.10.6 quantifiziert.

Die Quantifizierung der identifizierten Aromastoffe in der Biotransformation und den Blindwerten zeigte eine deutliche Zunahme der Konzentrationen von Linalool und 2-Phenylethanol in der Biotransformation. (*E*)-Geraniol wurde ausschließlich in der Biotransformation gebildet. Der β -Ionon-Gehalt sank von $30 \mu\text{g L}^{-1}$ im Substrat-Blindwert auf $10 \mu\text{g L}^{-1}$ in der Biotransformation. Auch der Gehalt an Essigsäure sank im Vergleich zum Substrat-Blindwert ungefähr um den Faktor 3. Im Pilz-Blindwert im optimierten Medium M9 bildete *W. cocos* geringe Gehalte an Linalool (ca. $10 \mu\text{g L}^{-1}$), die in der Biotransformation um den Faktor 10 gesteigert wurden. In Medium M1 hingegen wurde Linalool im Pilz-Blindwert entweder nicht gebildet oder der Gehalt lag unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Substrat-Blindwerte (in Medium M1 und M9) wiesen lediglich geringfügige Unterschiede in der Konzentration der Essigsäure auf.

Neben den drei olfaktometrisch wahrgenommenen Substanzen (6, 9 und 10 in Abb. 3.16) wurden auch flüchtige Verbindungen (A bis G, Tab. 3.21) neu gebildet, die nicht olfaktometrisch detektiert wurden.

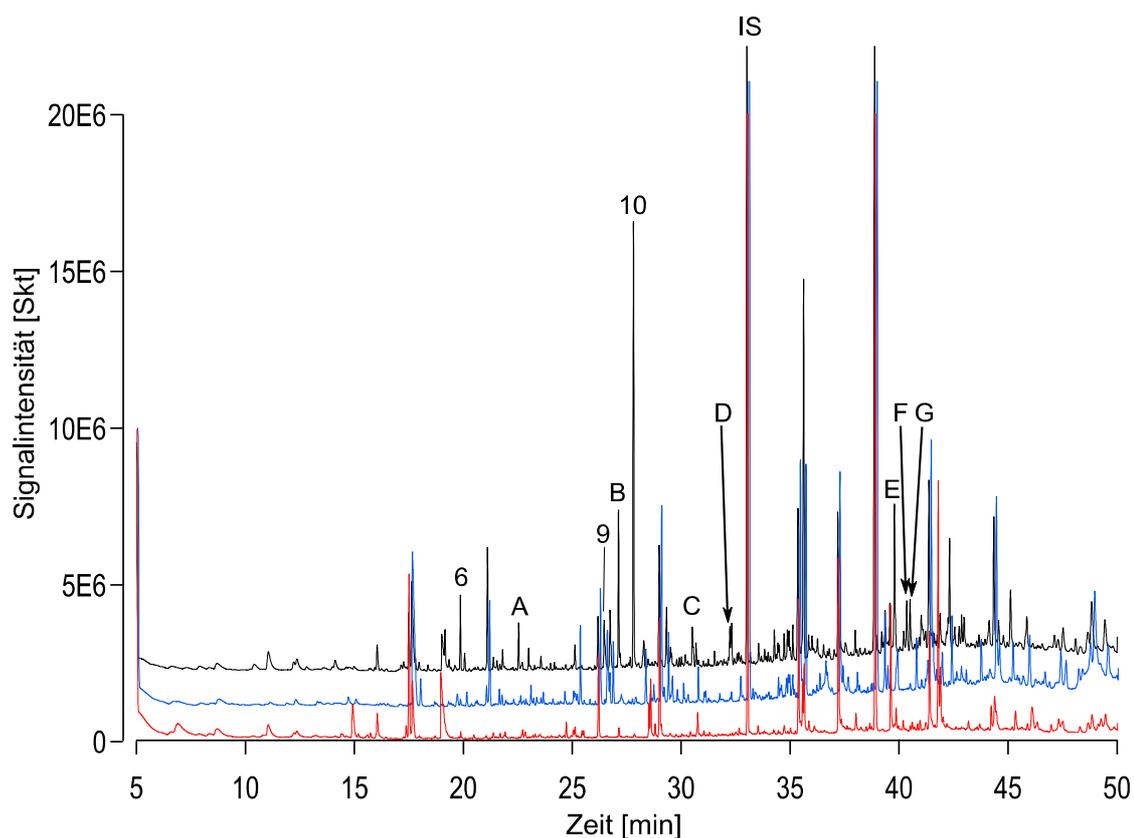


Abb. 3.16: Vergleich der GC-MS-MS-O-Chromatogramme der Biotransformation (schwarz), des Substrat-Blindwertes (blau) und des Pilz-Blindwertes (rot); (6, 7, 8 = olfaktometrisch detektiert; A bis E = olfaktometrisch nicht detektiert)

Tab. 3.21: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der olfaktometrisch nicht detektierten Verbindungen in der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* mit Substanzvorschlägen, Kováts-Indizes auf einer HP-Innowax-Säule (DB-5MS in Klammern) (KI), Literatur-Vergleichswerten (KI Literatur) und Kováts-Indizes authentischer Standards (KI Standard), n.b.: keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich

	Substanzvorschlag	KI	KI Standard	KI Literatur
A	2-Furanmethanol	1668 (928)	1666 (928)	1662 ¹ (860) ²
B	Benzylalkohol	1883 (1038)	1881 (1038)	1869 ³ (1036) ⁴
C	n.b.	1997		
D	n.b.	2151		
E	3-Hydroxy- β -ionon	>2600	-	(1677) ⁵
F	n.b.	>2600		
G	n.b.	>2600		

¹(Soria *et al.* 2008), ²(Ho *et al.* 2007), ³(Komes *et al.* 2006), ⁴(Setzer *et al.* 2006), ⁵(Zelena *et al.* 2009)

Von den sieben nicht sensorisch detektierten Verbindungen wurden durch Datenbankvergleich der Massenspektren Substanzvorschläge für drei Verbindungen erhalten. 2-Furanmethanol und Benzylalkohol wurden durch Vergleich der Massenspektren mit der Datenbank sowie der Kováts-Indizes mit authentischen Standards und Literaturwerten auf einer polaren Säule und einer unpolaren Säule identifiziert. Für 3-Hydroxy- β -ionon stand kein authentischer Standard zur Verfügung, sodass zur vorläufigen Identifizierung der Vergleich des Massenspektrums mit der Datenbank und mit Literatur (Urlacher *et al.* 2006) heran gezogen wurde. Die Peaks C, D, F und G konnten anhand der Massenspektren nicht sicher einem Substanzvorschlag zugeordnet werden.

3.6.2.6 Detektierte potentielle β -Carotin-Abbauprodukte

Durch GC-MS-MS-O-Analyse (2.10.3, Tab. 2.16, Tab. 2.17) der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* wurde β -Ionon sensorisch in allen drei Läufen detektiert. β -Ionon hatte einen FD-Faktor von zwei und einen Aromawert von drei (Tab. 3.20). 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid wurden durch gaschromatographisch-massenspektrometrisch, jedoch nicht olfaktometrisch detektiert. Im Substrat-Blindwert wurde 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid massenspektrometrisch und β -Ionon auch sensorisch detektiert.

Tab. 3.22: Konzentrationen und Kováts-Indizes (KI, Biotransformation/Substrat-Blindwert) der β -Carotin-Abbauprodukte in der Biotransformation (Biotrans.) und im Substrat-Blindwert (Substrat-BW) im Medium M9 auf einer polaren und einer unpolaren Trennsäule, DHA = Dihydroactinidiolid

Substanz	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$] Biotrans.	Konz. [$\mu\text{g L}^{-1}$] Substrat-BW	KI Innowax	KI DB-5MS
5,6-Epoxy- β -ionon	5 ± 0	20 ± 3	1994/1997	1492/1492
DHA	440 ± 4	240 ± 0	2347/2350	1541/1541

Literaturangaben zu den Kováts-Indizes für 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid sind in Tab. 3.14 angegeben.

Der Gehalt von β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon war im Substrat-Blindwert höher als in der Biotransformation. Der Gehalt an Dihydroactinidiolid hingegen war in der Biotransformation deutlich höher als im Substrat-Blindwert.

3.6.3 Dotierung mit L-Phenylalanin

Um zu untersuchen, wie sich eine Dotierung mit L-Phenylalanin bei der Biotransformation auf die Bildung von 2-Phenylethanol auswirkt, wurde dem optimierten Medium M9 L-Phenylalanin in einer Konzentration von 0,1 mM zugesetzt (Medium M10). Ausgehend vom Biosyntheseweg nach Ehrlich sollte eine Dotierung mit L-Phenylalanin zu einer Steigerung der 2-Phenylethanol-Konzentration führen (Ehrlich 1907, Etschmann *et al.* 2002). Die Kultivierung erfolgte gemäß 2.5.9 und 2.5.10. Die Berechnung der Gehalte von Benzylalkohol und 2-Phenylethanol erfolgte nach 2.10.6. Eine undotierte Biotransformation wurde gleichzeitig als Referenz mitgeführt (Abb. 3.17).

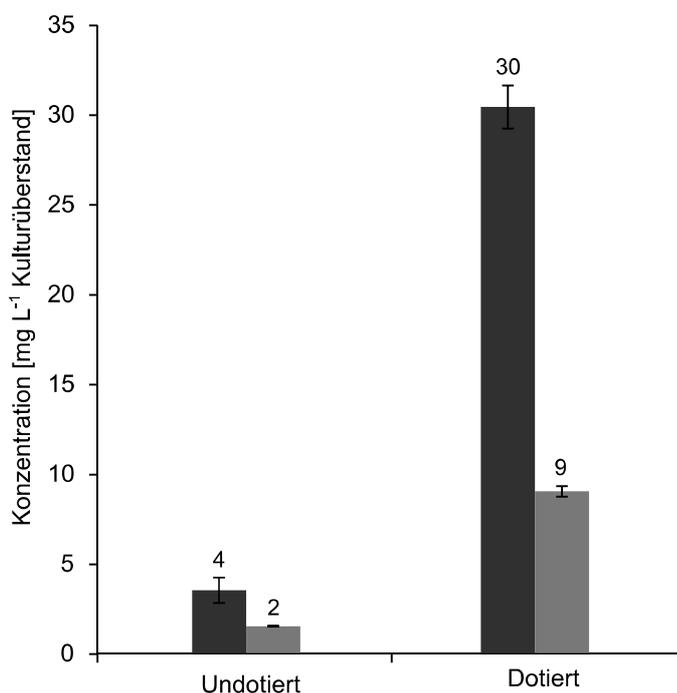


Abb. 3.17: Vergleich der durch Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* gebildeten Gehalte an Benzylalkohol (dunkelgrau) und 2-Phenylethanol (hellgrau) ohne Zusatz (undotiert) und mit Zusatz (dotiert) von L-Phenylalanin

Das zugesetzte L-Phenylalanin wurde in der Biotransformation zu 6% (0,06 mmol) zu 2-Phenylethanol und zu 25% (0,25 mmol) zu Benzylalkohol umgesetzt. Die Konzentration von 2-Phenylethanol wurde im Vergleich zur Referenz-Kultur um 493% und die Konzentration von Benzylalkohol um 768% gesteigert.

Da Benzylalkohol für das Gesamtaroma jedoch nicht relevant war und die absolute Steigerung des 2-Phenylethanolgehalts eher gering ausfiel (7 mg L^{-1}), wurde im weiteren Projektverlauf auf einen Zusatz von L-Phenylalanin verzichtet.

3.6.4 Maßstabsvergrößerung

Die Kultivierung im 7,5-L-Fermenter mit einem Gesamtvolumen von 3,3 L (3 L M9 und 0,3 L Vorkultur) erfolgte gemäß 2.6. Aliquote der Kultur wurden zur Bestimmung des Geruchseindrucks nach 2.7.2 und zur Flüssig-Flüssig-Extraktion analog 2.9.1 eingesetzt.

Der Geruch der Kultur wurde am Abbruchtage (Tag 6) als „Nivea-Creme, zitrusartig und nach Orange“ beschrieben. Die Fermentation im Bioreaktor wurde wiederholt. Der Geruchseindruck der zweiten Maßstabsvergrößerung war identisch mit dem der Ersten. Der Geruchseindruck nach Biotransformation im Fermenter war vergleichbar mit dem der Transformation in Schüttelkolbenkulturen.

Der Verlauf der Kulturparameter pH-Wert, Belüftung, Rührerdrehzahl und Temperatur ist im Anhang angegeben (Abb. 7.3). Der pH-Wert der Biotransformation fiel auf ca. 2,2 ab.

3.6.4.1 Detektion und Identifizierung aromaaktiver Verbindungen

Die Detektion und die Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen (Abb. 3.18, Tab. 3.23, Tab. 3.24) erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (2.9.1) gaschromatographisch mittels GC-FID-O (2.10.1 Tab. 2.12) und GC-MS auf polaren und unpolaren Trennphasen (2.10.2, Tab. 2.13, Tab. 2.14)

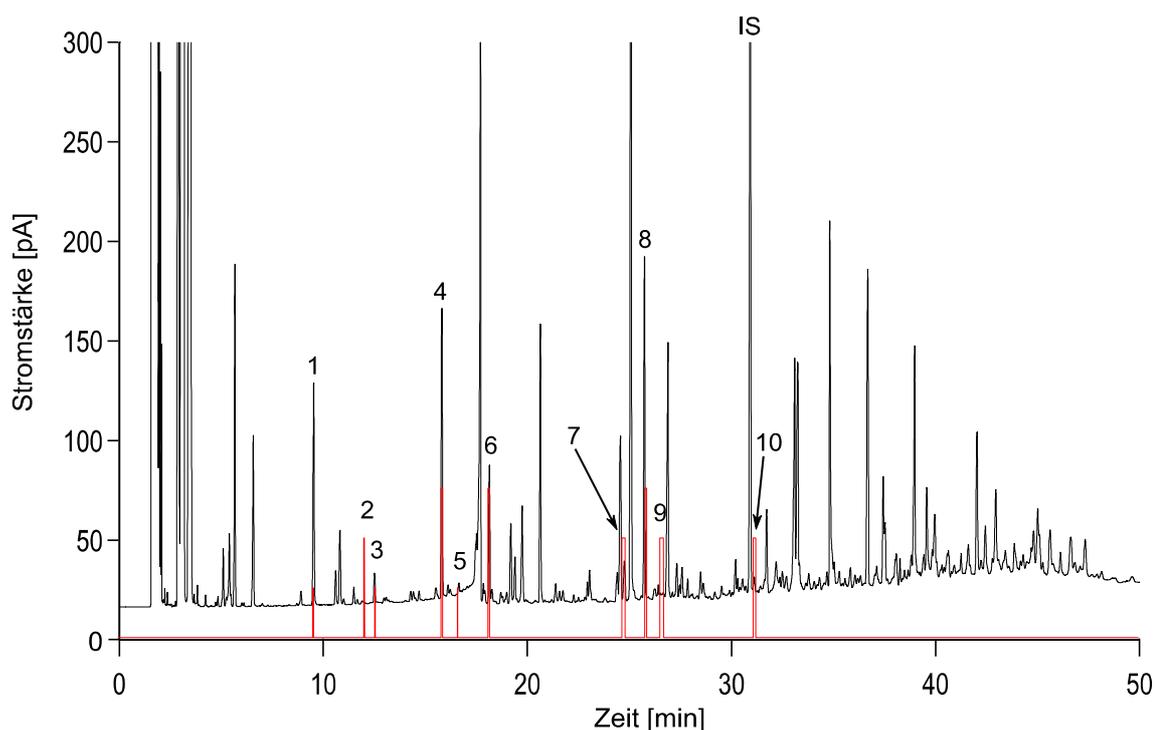


Abb. 3.18: GC-FID-O-Chromatogramm der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 im Bioreaktor (Kulturtag 6) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot); IS = Interner Standard

Tab. 3.23: Untersuchung aromaaktiver Substanzen aus der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 im 7,5-L-Fermenter mittels GC-FID-O- und GC-MS-Analyse mit Strukturvorschlägen, berechnete Kováts-Indizes (KI) auf polaren Säulen und Vergleichsgerüchen aus der Literatur (Geruch Lit.), - = kein Peak zuordenbar, n.b. = keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich, * = Interner Standard

#	Geruchseindruck	KI (GC-O)	KI (GC-MS)	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	muffig, erdig	1205	1202	3-Methyl-1-butanol	balsamisch, Alkohol ¹
2	Pilz	-	-	-	-
3	Anis	1318	n.b.	-	-
4	Pilz, Anis	1450	1450	1-Octen-3-ol ^a	Pilz ²
5	erdig	1483	n.b.	-	-
6	blumig, frisch, Zitrone	1547	1547	Linalool	blumig ²
7	blumig, frisch	1853	1843	(<i>E</i>)-Geraniol	Rose, Geranie ²
8	blumig, Rose, Honig	1901	1900	2-Phenylethanol	Rose ³

3 Ergebnisse

#	Geruchseindruck	KI (GC-O)	KI (GC-MS)	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
9	blumig, Himbeere	1950	1928	β -Ionon	blumig, Himbeere ²
10*	würzig, Kräuter	2180	2180	Thymol	

¹(Lee und Noble 2003), ²(Högnadóttir und Rouseff 2003), ³(San-Juan *et al.* 2010), ^a1-Octen-3-ol und Essigsäure coeluierten auf der polaren Säule. Gaschromatographisch-olfaktometrisch wurde 1-Octen-3-ol detektiert.

Literaturangaben zu den Kováts-Indizes für Linalool, (E)-Geraniol, 2-Phenylethanol und β -Ionon sind in Tab. 3.11 und für 3-Methyl-1-butanol und 1-Octen-3-ol in Tab. 3.24 angegeben.

Tab. 3.24: Kováts-Indizes 3-Methyl-1-butanol und 1-Octen-3-ol auf einer HP-Innowax und einer DB-5MS-Säule mit Standard- und Literaturwerten

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC-MS	Standard	Literatur	GC-MS	Standard	Literatur
3-Methyl-1-butanol	1202	1204	1206 ¹	<800	<800	735 ²
1-Octen-3-ol	1450	1448	1465 ³	988	985	980 ³

¹(Lee und Noble 2003), ²(Tellez *et al.* 1999), ³(Högnadóttir und Rouseff 2003)

Die Gehalte der olfaktometrisch detektierten Verbindungen der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen im 7,5-L-Fermenter (2.6.2) und der Biotransformation im Schüttelkolben (2.5.9.1) in Medium M9 wurde analog 2.10.6 berechnet. Durch die Maßstabsvergrößerung wurde eine Konzentrationssteigerung von Linalool und β -Ionon um den Faktor 2 und von (E)-Geraniol um den Faktor 4 erreicht. Die Konzentration von 2-Phenylethanol hingegen war dagegen in der Maßstabsvergrößerung leicht geringer als in der Schüttelkolbenkultur.

3.7 Rekombination

Anhand der Konzentrationen der identifizierten und sensorisch detektierten Verbindungen wurde eine Aromarekombination der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen in Medium M9 gemäß 2.13 angesetzt.

Zur Beurteilung der Rekombination wurde der Geruchseindruck analog 2.7.2 im Vergleich zu einer Referenz (Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9) bestimmt. Die Geruchseindrücke der Rekombination und der Referenz wurden von zehn Prüfern beurteilt.

Acht von zehn Prüfern beschrieben die Referenz als „blumig, fruchtig (Orangensaft), krautig, nach Nivea-Creme“ und als früheren Biotransformationen sehr ähnlich.

Der Geruchseindruck der Rekombination wurde von allen zehn Prüfern als „süß, blumig, fruchtig (Himbeere)“ beschrieben. Alle Prüfer stellten einen Unterschied zwischen dem Geruchseindruck der Biotransformation und der Rekombination fest.

In der Rekombination dominierte der süß-fruchtige Geruch nach Himbeere ausgehend von β -lonon, wohingegen der Geruchseindruck „krautig, Kräuter“ von keinem der zehn Prüfer in der Rekombination wahrgenommen wurde.

3.8 Festphasenmikroextraktion

3.8.1 Methodenvergleich

Zur Vereinfachung der Probenaufarbeitung wurde als Alternative zur Flüssig-Flüssig-Extraktion des Kulturüberstandes die Festphasenmikroextraktion (SPME) im Kopfraum des Schüttelkolbens untersucht.

Die Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* in Medium M9 verlief analog 2.5.9.1. Die Festphasenmikroextraktion aus dem Kopfraum des Schüttelkolbens wurde nach 2.9.2.1 durchgeführt und die extrahierten Komponenten wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch analog 2.10.2 (Tab. 2.15) analysiert. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion der flüchtigen Verbindungen erfolgte nach 2.9.1 im Anschluss an die Festphasenmikroextraktion der Aromastoffe aus derselben Biotransformation. Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der flüchtigen Verbindungen erfolgte nach 2.10.2 (Tab. 2.13) und die gaschromatographisch-olfaktometrische Analyse gemäß 2.10.1 (Tab. 3.25).

Die SPME im Kopfraum des Schüttelkolbens wurde ohne Veränderung der Kulturbedingungen durchgeführt. Auf eine Probenentnahme oder Temperierung wurde verzichtet und somit eine Veränderung des Kulturvolumens und weiterer Kulturparameter ausgeschlossen. Durch die Extraktion aus dem Kopfraum der Kultur wurden die flüchtigen Verbindungen erhalten, die definitionsgemäß das Aroma der Kultur charakterisieren sollten. Der Geruchseindruck der Biotransformation wurde als „fruchtig, blumig, süßlich, Nivea-Creme“ beschrieben und glich dem vorangegangener Biotransformationen. Der Vergleich der beiden Methoden anhand der Chromatogramme (Abb. 3.19) zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Extraktionsmethoden. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte für den Flüssig-Flüssig-Extrakt nach gaschromatographischer-massenspektrometrischer Analyse auf einer polaren und einer unpolaren Säule (2.10.2, Tab. 2.13, Tab. 2.14), durch Vergleich der Kováts-Indizes und Massenspektren authentischer Standards und Literaturangaben (Tab. 3.26). Die durch SPME extrahierten Verbindungen wurden auf einer polaren Säule nach 2.10.3.1 (Tab. 3.26) analysiert.

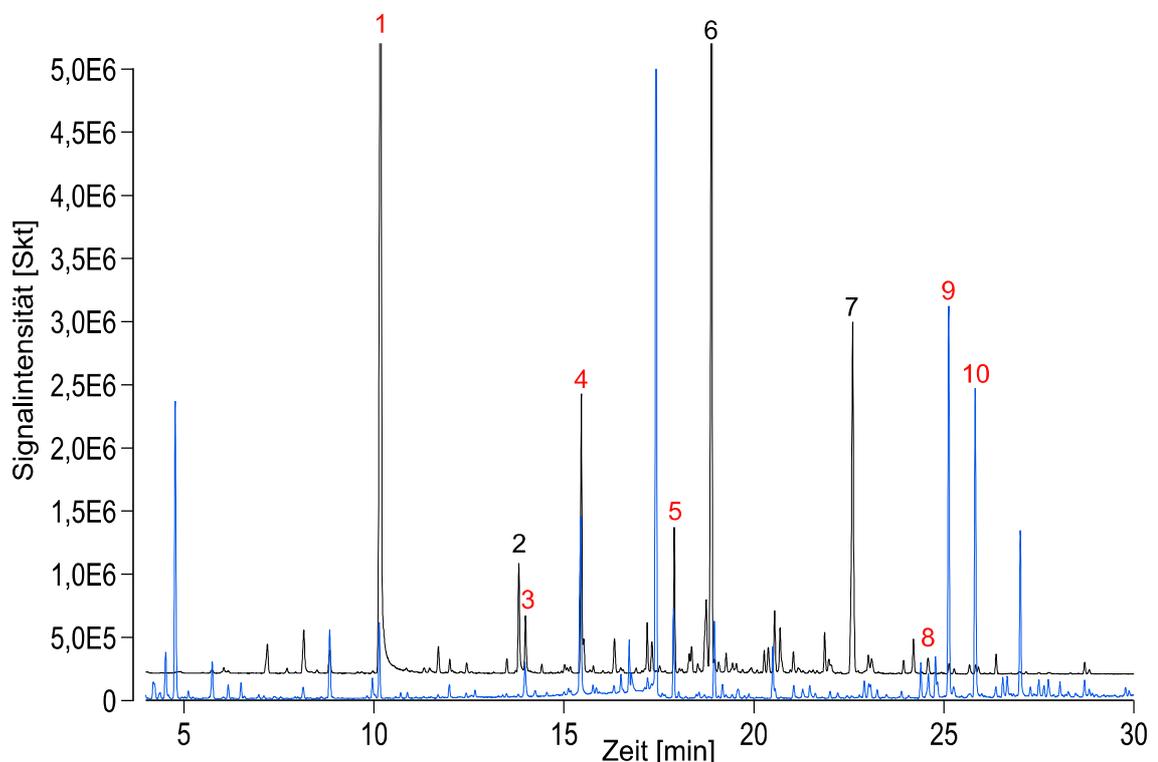


Abb. 3.19: Vergleich der GC-MS-Chromatogramme der SPME (schwarz) und der Flüssig-Flüssig-Extraktion (blau) der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* (2, 6, 7: nur im SPME-Chromatogramm detektiert; 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10: in beiden Chromatogrammen detektiert)

Tab. 3.25: Substanzvorschläge nach GC-MS-Analyse nach der SPME und nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion (FI/FI) der Biotransformation sowie deren Geruchsaktivität und Geruchseindruck an einem GC-FID-O

#	KI (GC-MS)	Substanzvorschlag	geruchsaktiv		Geruchseindruck
			FI/FI	SPME	
1	1254	3-Octanon	-	+	erdig, Waldboden
2	1385	2-Nonanon	-	-	
3	1391	3-Octanol	-	+	Anis
4	1449	1-Octen-3-ol*	+	+	Essig*, Pilz*
5	1547	Linalool	+	-	blumig, frisch, zitrus
6	1587	β -Caryophyllen	-	-	
7	1658	α -Caryophyllen	-	-	
8	1842	(<i>E</i>)-Geraniol	+	+	blumig
9	1867	Benzylalkohol	-	-	
10	1900	2-Phenylethanol	+	-	Rose, Honig

*Co-Elution mit Essigsäure; olfaktometrisch wurden beide Stoffe detektiert

Der Vergleich der Chromatogramme (Abb. 3.19) zeigte, dass 2-Nonanon sowie α - und β -Caryophyllen nur mittels SPME, Benzylalkohol und 2-Phenylethanol hingegen deutlich empfindlicher durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erfasst wurden. In der gaschromatographisch-olfaktometrischen Analyse des Flüssig-Flüssig-Extraktes wurden – vergleichbar zu den vorherigen Biotransformationen – 1-Octen-3-ol, Linalool, (*E*)-Geraniol und 2-Phenylethanol wahrgenommen. Durch die gaschromatographisch-olfaktometrische Untersuchung der flüchtigen Verbindungen, die mittels SPME extrahiert wurden, wurden 3-Octanon, 3-Octanol, 1-Octen-3-ol und (*E*)-Geraniol detektiert.

Tab. 3.26: Identifizierung der Verbindungen aus dem Extrakt der Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels GC-MS-Analyse

#	Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
		Probe	Standard	Literatur	Probe	Standard	Literatur
1	3-Octanon	1254	1252	1244 ¹	992	990	965 ²
3	3-Octanol	1391	1390	1368 ³	998	998	995 ³
4	1-Octen-3-ol	1449	1448	1465 ⁴	988	985	980 ⁴
5	Linalool	1547	1545	1551 ⁴	1100	1102	1107 ⁴
8	(E)-Geraniol	1842	1840	1850 ⁴	1252	1252	1276 ⁴
9	Benzylalkohol	1867	1867	1869 ⁵	1036	1038	1036 ⁶
10	2-Phenylethanol	1900	1901	1916 ⁷	1112	1116	1108 ⁷

¹(Fischer und Grosch 1987), ²(Jirovetz *et al.* 2002), ³(Chung *et al.* 1993), ⁴(Högnadóttir und Rouseff 2003), ⁵(Komes *et al.* 2006), ⁶(Setzer *et al.* 2006), ⁷(San-Juan *et al.* 2010)

3.8.2 Kinetik der Aromabildung

Die Festphasenmikroextraktion im Kopfraum des Schüttelkolbens wurde auch zur Untersuchung der Aromaveränderung während der Biotransformation, des Pilz-Blindwertes und des Substrat-Blindwertes eingesetzt.

Die Kultivierungen verliefen analog 2.5.9.1 und 2.5.10.2. Die Festphasenmikroextraktion aus dem Kopfraum des Schüttelkolbens wurde analog 2.9.2.1 durchgeführt und die erfassten flüchtigen Verbindungen wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch nach 2.10.3 (Tab. 2.18) analysiert.

Durch Vergleich der Chromatogramme der Biotransformation mit den beiden Blindwerten am Kulturabbruch (Tag 6) wurden die in der Biotransformation neu gebildeten Verbindungen (1–8, Abb. 3.20) bestimmt.

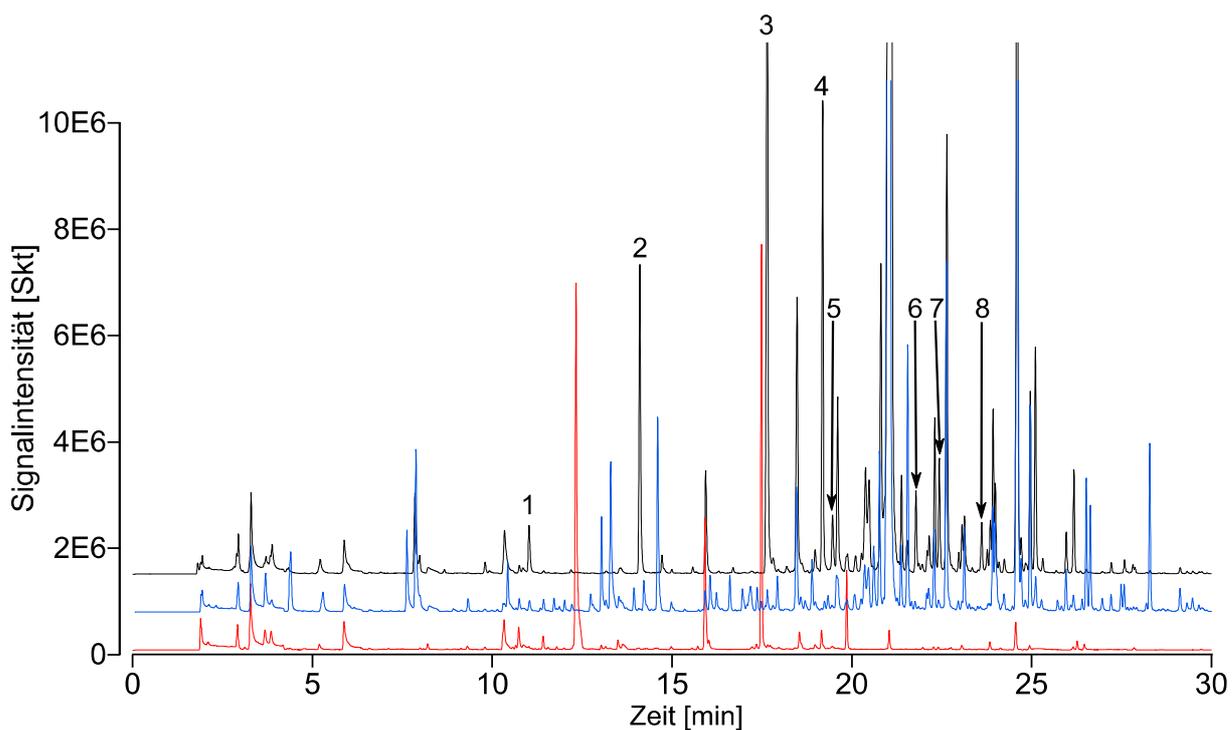


Abb. 3.20: Vergleich GC-MS-MS-O-Chromatogrammausschnitt der Biotransformation (schwarz), des Substrat-Blindwertes (blau) und des Pilz-Blindwertes (rot), 1 bis 8 markieren die neu gebildeten Verbindungen

Durch Vergleich der Massenspektren mit der Datenbank wurden für sieben Verbindungen Strukturvorschläge erhalten und mit Retentionsindizes aus Literaturangaben verglichen (Tab. 3.27).

3 Ergebnisse

Tab. 3.27: Untersuchung der neu gebildeten Substanzen mittels SPME und GC-MS-MS-O-Analyse mit Strukturvorschlägen, berechnete Kováts-Indizes (KI) auf einer polaren Säule, Standard- und Literatur-Retentionsindizes

#	KI	Substanzvorschlag	KI Standard	KI Literatur
1	1209	2-Methyl-1-butanol	1207	1197 ¹
2	1323	2-Heptanol*	1321	1273 ²
3	1460	α -Cubeben	-	1482 ³
4	1523	2-Nonanol	1521	1535 ⁴
5	1535	n.b.		
6	1634	α -Copaen	-	1488 ⁵
7	1663	δ -Cadinen	-	1749 ⁶
8	1716	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandren	-	-

¹(Komes *et al.* 2006), ²(Nishimura 1995), ³(Choi 2003), ⁴(Pennarun *et al.* 2002), ⁵(Szafranek *et al.* 2005), ⁶(Chung *et al.* 1993), *auch olfaktometrisch detektiert

Die Peakflächen der neu gebildeten Verbindungen, denen ein Substanzvorschlag zugeordnet werden konnte, wurden über den Kulturverlauf untersucht und graphisch aufgetragen (Abb. 3.21).

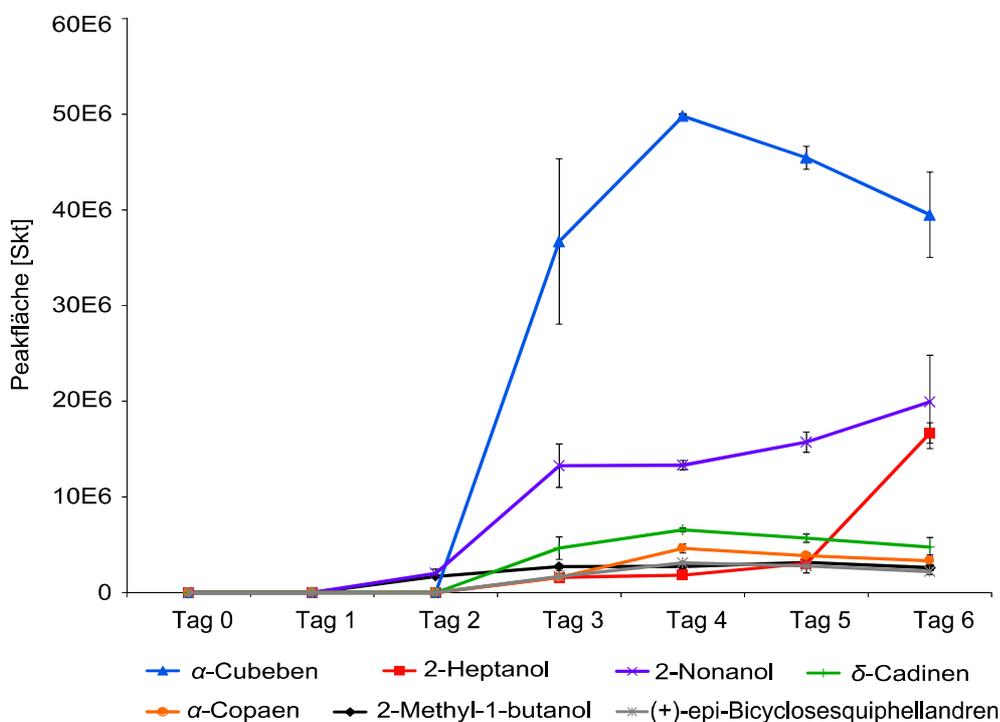


Abb. 3.21: Kinetik der neu gebildeten flüchtigen Verbindungen in Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* (Mittelwerte der Peakflächen)

Ab Kulturtag 2 war ein deutlicher Anstieg der Konzentration der flüchtigen Verbindungen festzustellen. Die Peakfläche des Sesquiterpens α -Cubeben war im Vergleich zu den anderen Verbindungen deutlich höher.

Der Geruchseindruck der Biotransformation wurde als „blumig, fruchtig, Nivea-Creme“ beschrieben. Bei den mittels HS-SPME erfassten neu gebildeten Verbindungen handelte es sich jedoch nicht um die olfaktometrisch detektierten Verbindungen aus dem Flüssig-Flüssig-Extrakt. Keine der neu gebildeten Verbindungen (Tab. 3.27) wurde gaschromatographisch-olfaktometrisch nach HS-SPME wahrgenommen (Tab. 3.25).

3.9 β -Carotin-Abbau durch die „DyP-type“-Peroxidase MsP1

3.9.1 Umsetzung von β -Carotin

Die Dauer des Umsatzes von β -Carotin durch MsP1 wurde analog 2.15.3.1 bestimmt. Der Abbau von β -Carotin durch MsP1 kam nach 12 min nahezu zum Erliegen (Abb. 3.22), so dass im Folgenden die Umsetzungen (falls nicht anders angegeben) für 12 min bei 30 °C durchgeführt wurden.

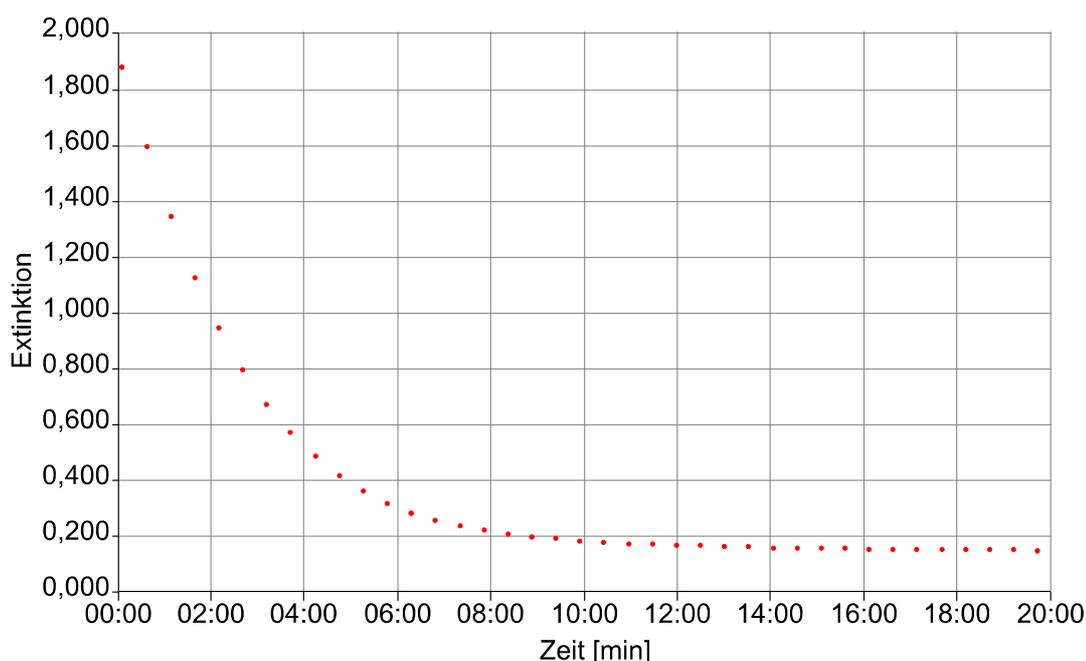


Abb. 3.22: β -Carotin-Assay zur Bestimmung der Transformationszeit

Durch Umsetzung von β -Carotin durch MsP1 im geschlossenen System wurden bei einer Extraktionstemperatur von 40 °C 10,9 mol% flüchtige β -Carotin-Abbauprodukte (β -Cyclocitral und β -Ionon) nachgewiesen (Abb. 3.24). Bei einer Extraktionstemperatur von 75 °C wurden zusätzlich 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid detektiert. Durch Erhöhung der Extraktionstemperatur auf 75 °C wurden durch HS-SPME 3,8 mol% mehr β -Cyclocitral und β -Ionon erfasst. Die Ausbeute an β -Cyclocitral und β -Ionon wurde von 10,9 mol% (40 °C) auf 14,7 mol% (75 °C) gesteigert.

Die Identifizierung von β -Ionon und β -Cyclocitral erfolgte durch Vergleich der Massenspektren sowie der Kováts-Indizes von authentischen Standards auf einer polaren und einer unpolaren Trennphase (Tab. 3.28). Für 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid standen keine authentischen Standards zur Verfügung. Die vorläufige Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Massenspektren mit Hilfe einer Spektrendatenbank (NIST 2008) und durch Vergleich der Kováts-Retentionsindizes (auf einer HP-Innowax-Säule und einer DB-5MS-Säule) mit Literaturwerten.

Tab. 3.28: Identifizierung der β -Carotin-Abbauprodukte (Extraktionstemperatur 75 °C) aus dem Kopfraum der Umsetzung durch MsP1 mittels GC-MS-MS-O-Analyse

Substanz	KI HP-Innowax			KI DB-5MS		
	GC-MS	Standard	Literatur	GC-MS	Standard	Literatur
β -Cyclocitral	1621	1621	1623 ¹	1228	1226	1224 ²
β -Ionon	1940	1939	1955 ³	1495	1492	1494 ³
5,6-Epoxy- β -ionon	1993	-	1964 ⁴	-	-	(1459) ^a
Dihydroactinidiolid	2362	-	2348 ⁵	-	-	1525 ⁶

¹(Priesato *et al.* 2003), ²(Leffingwell und Alford 2005), ³(Högnadóttir und Rouseff 2003), ⁴(Zelena *et al.* 2009), ⁵(Binder *et al.* 1990), ⁶(Pino *et al.* 2005), ^aRetentionsindex auf DB-1 Trennsäule (Habu *et al.* 1985)

Bei einer Extraktionstemperatur von 75 °C wurde die Extraktionsdauer auf 60 min bzw. 120 min verlängert, um so eine Steigerung der Ausbeute an flüchtigen Verbindungen zu überprüfen (Tab. 3.29). Zur Quantifizierung von Dihydroactinidiolid und 5,6-Epoxy- β -ionon wurde ein Response-Faktor von 1 verwendet.

Tab. 3.29: Umsätze [mol%] der flüchtigen Abbauprodukte von β -Carotin bei 30 min, 60 min und 120 min Extraktionsdauer

	Extraktionsdauer		
	30 min	60 min	120 min
β -Cyclocitral	2,9 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1
β -Ionon	11,8 \pm 0,1	12,3 \pm 0,2	12,0 \pm 0,3
5,6-Epoxy- β -ionon	0,4 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0
Dihydroactinidiolid	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0
Gesamtumsatz	15,2	16,5	17,2
Abbau β -Carotin [%]	97	97	97

Durch Verlängerung der Extraktionszeit wurden lediglich geringfügig mehr flüchtige β -Carotin-Abbauprodukte erfasst, sodass die Extraktionsdauer von 30 min beibehalten wurde.

Alle weiteren Extraktionen erfolgten daher unter optimierten Bedingungen bei 75 °C für 30 min.

3.9.1.1 Verlängerung der Transformationszeit

Zur Absicherung, dass nach einer Transformationszeit von 12 min (97% β -Carotin-Abbau) keine weitere Steigerung der flüchtigen Abbauprodukte z. B. durch Abbau gebildeter Apocarotinale eintrat, wurden Transformationszeiten von 60 min, 120 min und 180 min untersucht (Abb. 3.23).

Die Extraktion der flüchtigen Abbauprodukte von β -Carotin erfolgte unter optimierten Bedingungen. Die Desorption und gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse erfolgte nach 2.9.3.

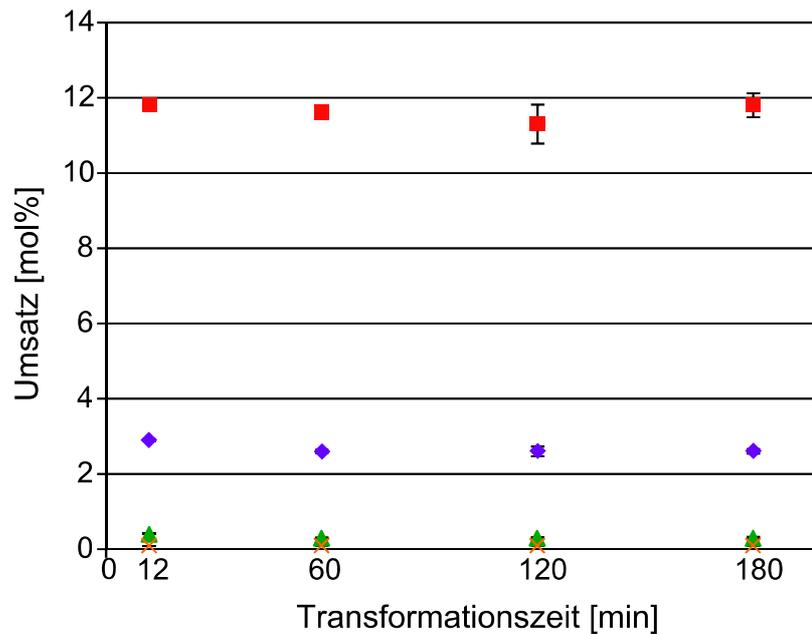


Abb. 3.23: Ausbeute [mol%] von β -Ionon (■), β -Cyclocitral (◆), 5,6-Epoxy- β -ionon (▲) und Dihydroactinidiolid (×) bei verschiedenen Transformationszeiten

In allen Ansätzen lag der β -Carotin-Abbau bei 97%. Eine Erhöhung der Transformationszeit führte zu keiner Veränderung der Gehalte der flüchtigen β -Carotin-Abbauprodukte, so dass eine Transformationszeit von 12 min beibehalten wurde.

3.9.1.2 Vergleich mit Blindwerten

Der Vergleich mit den mitgeführten Blindwerten bestätigte die Bildung von β -Ionon, β -Cyclocitral, 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid durch die enzymatische Spaltung von β -Carotin durch MsP1. Durch Autoxidation der Restkonzentration (Tab. 2.20, Blindwert 1) von β -Carotin im Transformationansatz wurden lediglich vernachlässigbar geringe Mengen an β -Ionon gebildet. Der Blindwert mit einer Tween[®] 80-Lösung anstelle der β -Carotin-Lösung (Tab. 2.20, Blindwert 3) zeigte, dass MsP1 mit dem Emulgator reagiert und somit weitere flüchtige Abbauprodukte wie z. B. Aldehyde entstehen (Abb. 3.24).

Des Weiteren wurde ein enzymatischer Abbau des internen Standards α -Ionon ausgeschlossen.

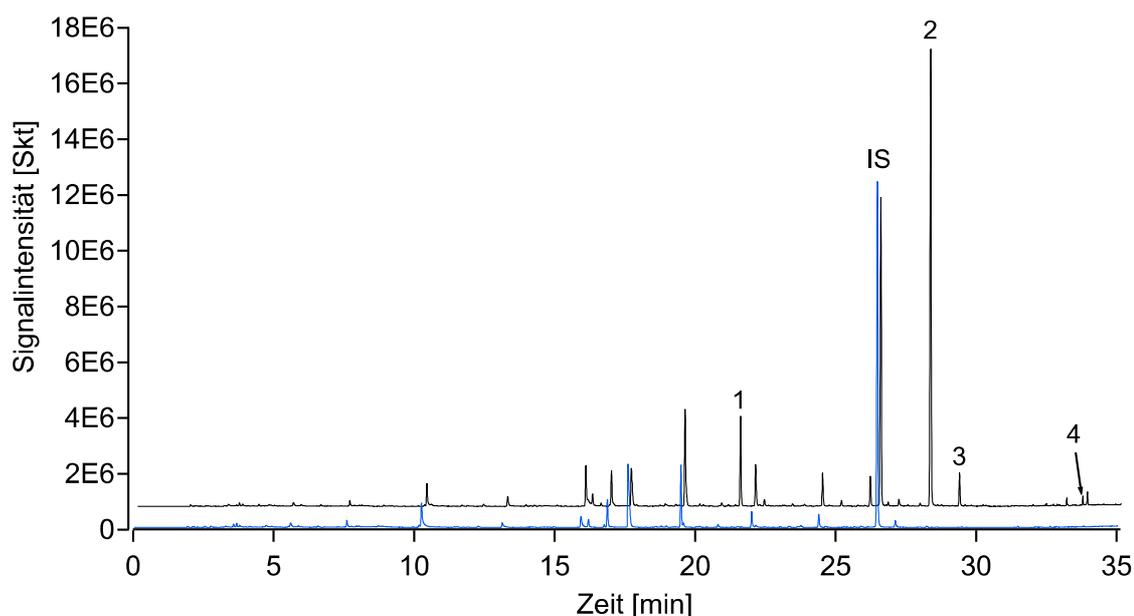


Abb. 3.24: Vergleich GC-MS-MS-O-Chromatogramme der Umsetzung von β -Carotin (schwarz) und der Umsetzung von Tween[®] 80-Lösung (blau) mit MsP1 (1 = β -Cyclocitral, 2 = β -Ionon, 3 = 5,6-Epoxy- β -ionon, 4 = Dihydroactinidiolid, IS = Interner Standard α -Ionon)

Die Verwendung abgekochter Enzymlösung führte zu keiner Spaltung von β -Carotin unter den optimierten Transformationsbedingungen.

3.9.1.3 Abhängigkeit der Extraktion vom Tween[®] 80-Gehalt

Auf Grund der unterschiedlichen Peakflächen von α -Ionon in Ansätzen mit und ohne Tween[®] 80 wurde untersucht, inwieweit die Tween[®] 80-Konzentration die Peakfläche von α -Ionon, β -Ionon und β -Cyclocitral beeinflusst (Abb. 3.25). Drei Ansätze mit Tween[®] 80-Lösung (2.15.1.2, unterschiedlich verdünnt) sowie ein Ansatz mit Reinstwasser anstelle von Tween[®] 80 wurden angesetzt. Die Ansätze enthielten α -Ionon, β -Ionon und β -Cyclocitral in einer Konzentration von etwa $0,16 \text{ mg L}^{-1}$. Die Extraktion der flüchtigen Komponenten fand mittels HS-SPME für 30 min bei $75 \text{ }^\circ\text{C}$ statt. Die Desorption und gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse erfolgte nach 2.9.3.

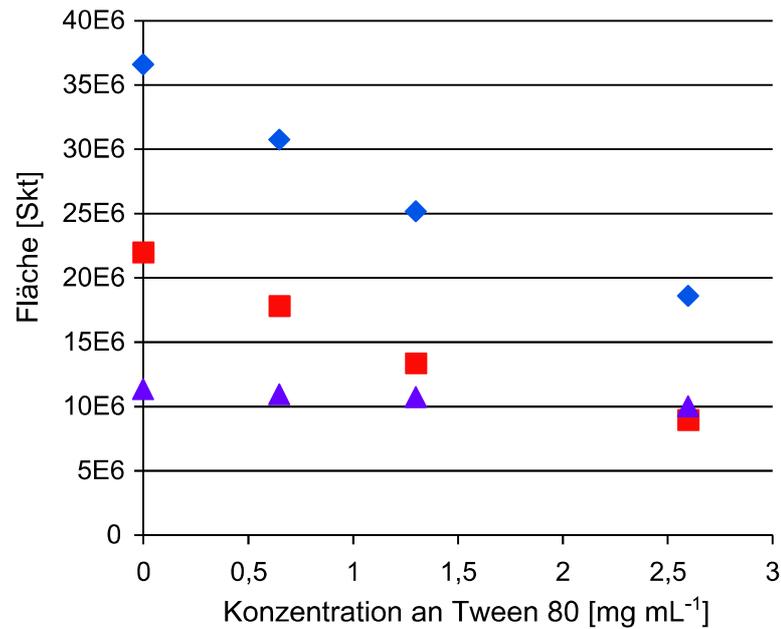


Abb. 3.25: Abhängigkeit der Peakflächen von β -Cyclocitral (\blacktriangle), β -Ionon (\blacksquare) und α -Ionon (\blacklozenge) von der Tween[®] 80-Konzentration

Je höher die Konzentration an Tween[®] 80 in den Ansätzen war, desto kleiner wurden die Peakflächen von α - und β -Ionon. Die Signalintensitäten von α - und β -Ionon wurden stärker beeinflusst, als die Fläche des β -Cyclocitral-Peaks. Der Einfluss auf die Flüchtigkeit von 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid konnte nicht ermittelt werden, da für die beiden Verbindungen keine Standardsubstanzen vorlagen.

Die Response-Faktoren für β -Ionon und β -Cyclocitral wurden auf Grund der Beeinflussung durch Tween[®] 80 in Transformationsansätzen mit Tween[®]80-Lösung anstelle der β -Carotin-Lösung bestimmt. Die Einflüsse des Emulgators wurden so rechnerisch ausgeglichen.

3.9.2 Transformation unbehandelter Karottenschalen

Die Ansätze der Transformation unbehandelter Karottenschalen durch MsP1 und der Blindwerte wurden analog 2.15.3.3 angesetzt. Die Festphasenmikroextraktion aus dem Kopfraum des Braunglas-Vials wurde analog 2.9.3 (75 °C, 30 min) durchgeführt. Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der flüchtigen Verbindungen erfolgte nach 2.10.3 (Tab. 2.19).

Durch Vergleich der Chromatogramme der Transformation und des Blindwerts wurde ermittelt, ob MsP1 β -Carotin auch in komplexen Substraten umsetzen kann (Abb. 3.26).

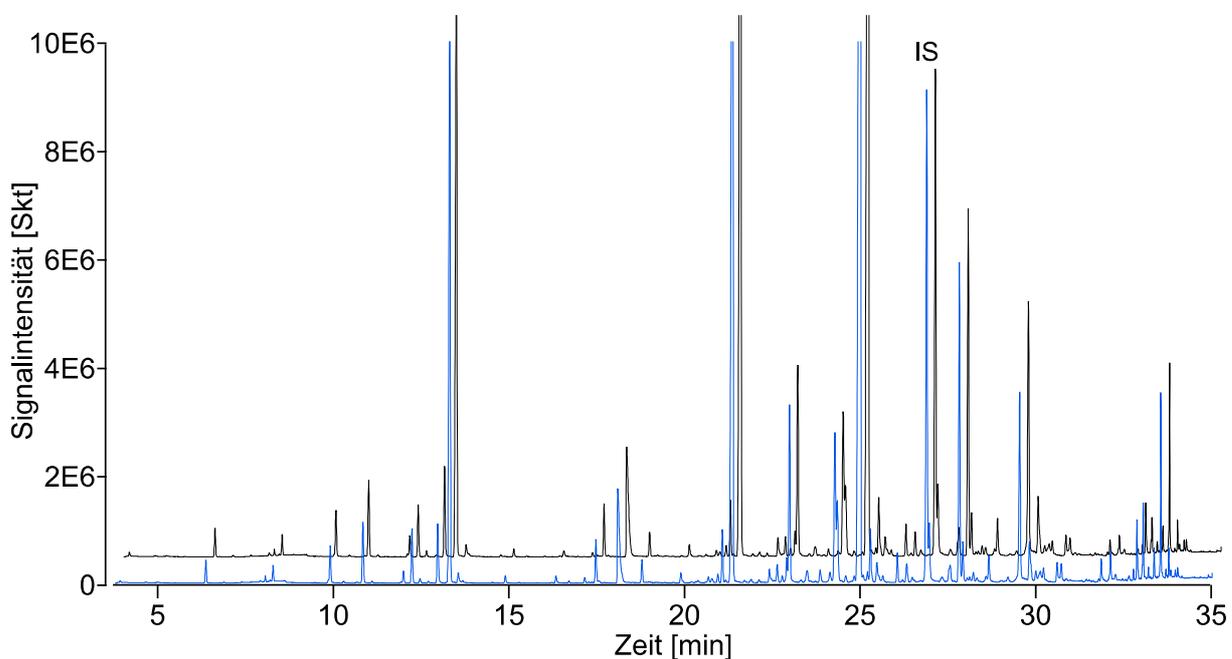


Abb. 3.26: GC-MS-MS-O-Chromatogramme der Festphasenmikroextraktion im Kopfraum der Transformation von Karottenschalen mit MsP1 (schwarz) und dem Blindwert (blau);
IS = Interner Standard (α -lonon)

Zwischen der Transformation und dem Blindwert wurden keine Unterschiede festgestellt. Sowohl in der Transformation als auch im Blindwert wurden geringe Mengen β -lonon detektiert. MsP1 war nicht in der Lage, das β -Carotin in der komplexen Matrix Karottenschalen zu spalten oder andere Inhaltsstoffe der Karottenschalen zu flüchtigen Verbindungen abzubauen.

4 Diskussion

Bereits über hundert Aromastoffe werden zurzeit in Form von Gemischen oder als Reinstoffe auf biotechnologischem Wege hergestellt. Dazu zählen unter anderem Vanillin aus Ferulasäure und 2-Phenylethanol aus L-Phenylalanin (Tab. 4.1) (Etschmann *et al.* 2005; Stentelaire *et al.* 2000). Zur biotechnologischen Gewinnung von Aromastoffen können neben Mikroorganismen auch Pflanzenzellen oder Enzyme verwendet werden. Die Verwendung von Enzymen (wie Lipasen, Esterasen oder Oxidasen) hat die Vorteile, dass Nebenreaktionen durch die Substrat- und Regiospezifität verringert werden (Longo und Sanroman 2006). Der mögliche Verlust von Aktivität während der Aufarbeitung und Anwendung stellt jedoch einen Nachteil bei der Verwendung von Enzymen dar. Mikroorganismen haben gegenüber Enzymen den Vorteil, dass sie die benötigten Co-Faktoren selbstständig regenerieren und durch ihre Enzymvielfalt ein großes Spektrum an Verbindungen metabolisieren können (Berger *et al.* 2010).

Die höchst entwickelten Pilze, die Basidiomyceten, besitzen eine vielfältige Enzymausstattung mit der sie in der Lage sind, sich an unterschiedliche Kohlen- oder Stickstoffquellen anzupassen. Bisher sind rund 31.500 Arten von Basidiomyceten bekannt (Kirk *et al.* 2008). Man unterscheidet zwischen Braun- und Weißfäulepilzen. Braunfäulepilze bauen hauptsächlich Polysaccharide wie Cellulose und Hemicellulosen ab, wobei das bräunliche Lignin zurück bleibt. Dadurch entsteht als Schadbild des Holzes der sogenannte „Würfelbruch“. Weißfäulepilze hingegen bauen das Lignin ab, sodass die weißliche Cellulose und Hemicellulose erhalten bleiben, die die Farbe des Befalls prägen (Bouws *et al.* 2008).

Auf Grund der Enzymausstattung der Basidiomyceten zum Abbau komplexer Substrate wurde die Idee der Gewinnung natürlicher Aromastoffe/-gemische oder Aromaextrakte auf Submerskulturen von Basidiomyceten übertragen.

Nach Art. 16 Abs. 2 der VO (EG) 1334/2008 darf die Bezeichnung natürlich für ein Aroma nur dann verwendet werden, „wenn der Aromabestandteil ausschließlich Aromaextrakte und/oder natürliche Aromastoffe enthält“. Ein natürlicher Aromastoff ist nach Art. 3 Abs. 2 lit. c der VO (EG) 1334/2008 „durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen, die als solche verwendet oder mittels eines oder mehrerer der in Anhang II aufgeführten herkömmlichen Lebensmittelzu-

bereitungsverfahren für den menschlichen Verzehr aufbereitet wurden. Natürliche Aromastoffe sind Stoffe, die natürlich vorkommen und in der Natur nachgewiesen wurden.“ Laut Art. 3 Abs. 2 lit. d sublit. ii der VO (EG) 1334/2008 ist ein Aromaextrakt ein „Erzeugnis, das kein Aromastoff ist und gewonnen wird aus Stoffen pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ursprungs, die keine Lebensmittel sind, und zwar durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren, wobei die Stoffe als solche verwendet oder mittels eines oder mehrerer der in Anhang II aufgeführten herkömmlichen Lebensmittelzubereitungsverfahren aufbereitet werden“. Art 3 Abs. 2 VO (EG) 1334/2008 und Art. 2 Abs. 1 der Richtlinie 88/344/EWG in Verbindung mit Anhang II 88/344/EWG erlaubt die Lösungsmittel-extraktion mit den dort aufgeführten Extraktionsmitteln unter Berücksichtigung der angegebenen Rückstandshöchstmengen im Lebensmittel. Unter Einhaltung der rechtlich vorgeschriebenen Bedingungen können die biotechnologisch gewonnenen Aromastoffe oder Aromaextrakte als natürlich deklariert werden.

Wirtschaftlich rentabel wird die biotechnologische Darstellung von Aromastoffen in der Regel erst, wenn der Aromastoff in einer Konzentration von über einem Gramm pro Liter vorliegt (Berger *et al.* 2010). Da hohe Konzentrationen der gewünschten Produkte jedoch meistens toxisch für den verwendeten Mikroorganismus sind, müssen diese z. B. durch Pervaporation oder durch Adsorption entfernt werden (Nacke *et al.* 2012; Stentelaire *et al.* 2000).

Tab. 4.1: Beispiele für natürliche Aromastoffe, die durch Biotransformation gebildet werden

Aromastoff	Präkursor	Mikroorganismus	Literatur
Vanillin	Ferulasäure	<i>A. niger</i> und <i>P. cinnabarinus</i>	(Stentelaire <i>et al.</i> 2000)
2-Phenylethanol	L-Phenylalanin	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Etschmann <i>et al.</i> 2005)
Himbeerketon	L-Phenylalanin	<i>N. niveo-tomentosa</i>	(Böker <i>et al.</i> 2001, Zorn <i>et al.</i> 2003)
Benzaldehyd	L-Phenylalanin	<i>I. benzoinum</i>	(Fabre <i>et al.</i> 1996)

4.1 Biotransformationen

Im durchgeführten Screening wurden 29 Basidiomyceten und sechs Substrate untersucht. Der Geruchseindruck von insgesamt 61 Biotransformationen wurde evaluiert. Dreizehn Stamm/Substrat-Kombinationen wiesen einen interessanten Geruchseindruck auf. Die Auswahl der weiter zu untersuchenden Transformationen erfolgte in Abstimmung mit den Projektpartnern. Da die Zitruspellets zu einer sehr späten Projektphase zur Verfügung gestellt wurden, war es während der Projektlaufzeit nicht möglich, die Identifizierung und Absicherung der Aromastoffe abzuschließen. Erste olfaktometrische Untersuchungen zeigten in der Biotransformation der Zitruspellets durch *W. cocos* – wie auch in der Biotransformation von Karottenschalen – die Bildung von Linalool, (*E*)-Geraniol und 2-Phenylethanol.

Die Geruchseindrücke von sieben der neun sensorisch interessanten Biotransformationen carotinoidreicher Substrate wurden reproduziert. Die Geruchseindrücke der Biotransformationen von Karottenschalen durch *M. cohortalis* und *P. sapidus* waren nicht reproduzierbar. Biotransformationen durch die Basidiomyceten *M. scorodoni* und *P. chrysosporium* wurden nicht weiter untersucht, da in der Literatur keine Angaben zu deren Genießbarkeit gemacht wurden. Auf Grund dessen wurden die Biotransformationen von Karottenschalen durch *L. edodes* und *W. cocos* weitergehend untersucht.

Die Biotransformation durch den essbaren Basidiomyceten *L. edodes* zeigte an Kulturtag 6 den interessantesten und intensivsten Geruchseindruck (3.4.1).

Anhand des Verlaufs des pH-Werts der Biotransformation und der optischen Begutachtung der Kulturen ließ sich vermuten, dass das Pilzwachstum durch die komplexe Kohlenhydratquelle nicht beeinflusst wurde.

Von 18 Geruchseindrücken wurden 16 einem Peak im Gaschromatogramm zugeordnet. Substanzvorschläge konnten jedoch nur für vier Peaks erhalten werden. Die Zuordnung der Geruchseindrücke gestaltete sich schwierig, da Geruchseindrücke teilweise keinem Peak zugewiesen werden konnten oder die Datenbankrecherche kein Ergebnis in Form von übereinstimmenden Massenspektren lieferte. Von den vier erhaltenen Substanzvorschlägen wurden drei durch Vergleich der Retentionsindizes nach Kováts und der Massenspektren mit Literatur und Referenzsubstanzen identifiziert. Durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse wurden Essigsäure (FD-Faktor 16),

2-Phenylethanol (FD-Faktor 16) und eine nicht identifizierte Substanz mit einem FD-Faktor von 16 als Hauptaromakomponenten bestimmt. Da nicht alle Hauptaromakomponenten mittels gaschromatographischer-massenspektrometrischer Analyse identifiziert wurden, wurde diese Stamm/Substrat-Kombination nicht weiter verfolgt.

Der Geruchseindruck der Biotransformation von Karottenschalen durch den essbaren Braunfäulepilz *W. cocos* wurde von den Prüfern ebenfalls an Kulturtag 6 am intensivsten und interessantesten empfunden.

Der pH-Wert der Biotransformationen von Karottenschalen durch *W. cocos* fiel über die Kulturdauer von 6 Tagen auf 2,9 ab (3.6.2.2). Arbeiten von Milagres *et al.* (2002) zeigten ebenfalls eine deutliche Absenkung des pH-Werts von 5,6 auf 2,3 über den Kultivierungszeitraum in Kulturen von *W. cocos* in einem Medium aus 2% Weizenkleie in Wasser. Die Kultivierung erfolgte bei 27 °C. Über die Kulturdauer wurde keine Angabe gemacht. Milagres *et al.* (2002) vermuteten als Ursache für den Abfall des pH-Wertes die Bildung von organischen Säuren, darunter Oxalsäure, deren Konzentration 16,7 µM betrug. Durch die Reduzierung des pH-Wertes soll die Verfügbarkeit von Fe³⁺-Ionen verbessert werden, die nach Arantes *et al.* (2011) am Abbau von Lignocellulosen durch nicht-enzymatische Reaktionen (Fenton-Reaktion, Fe³⁺ wird zur Regeneration von Fe²⁺ benötigt) beteiligt sind. Für den enzymatischen Abbau von Cellulose und Hemicellulosen stehen dem Braunfäulepilz Cellulasen, Xylanasen und β-Xylosidasen zur Verfügung. Deren Aktivität wurde in Submerskulturen von *W. cocos* mit Weizenkleie als einziger Nährstoffquelle von Milagres und Sales (2001) nachgewiesen.

Über den Kulturverlauf verfärbten sich die Karottenschalen in der Biotransformation von orange an Tag 1 nach braun an Tag 6 (Abb. 4.1). Die orangene Farbe der Karottenschalen im Substrat-Blindwert hingegen veränderte sich nicht. Die Farbe der Karottenschalen wird durch die Carotinoide verursacht, sodass die Farbveränderung in der Biotransformation auf den Abbau von Carotinoiden zurückzuführen sein könnte. Die Farbveränderung könnte aber auch durch den Abbau von Cellulose durch *W. cocos* bzw. das Zurückbleiben des Lignins in den Karottenschalen verursacht worden sein. In Karotten sind, abhängig vom Reifegrad und von der Sorte, ungefähr 2,9% Cellulose und 3,8% Lignin enthalten (Wang *et al.* 2010). Die Veränderung der Farbe durch den Cellulose-Abbau würde neben dem Absenken des pH-Wertes das typische Braunfäulepilz-Verhalten von *W. cocos* bestätigen.



Abb. 4.1: Kulturkolben der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* (links), des Pilz-Blindwertes (Mitte) und des Substrat-Blindwertes (rechts) an Kulturtag 6 im optimierten Medium M9

Der Geruchseindruck der Kulturkolben wurde direkt nach deren Öffnung durch mindestens drei Prüfer bewertet. Die Biotransformation unterschied sich deutlich von den beiden Blindwerten. Alle Karottenschalen-Blindwerte rochen nach Karotte, erdig, dumpf, süßlich, herb und fruchtig (Tab. 3.2). Der Geruchseindruck des Blindwertes von *W. cocos* wurde von allen Prüfern als „sehr angenehm, nach Zitrone, herben Kräutern und Zitronenmelisse“ riechend beschrieben.

Zur Charakterisierung der wichtigen Aromastoffe der Biotransformationen von Karottenschalen durch *W. cocos* wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Extraktion des Kulturüberstands und Konzentrierung des Extraktes
- Identifizierung und Quantifizierung der aromaaktiven Verbindungen mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie und Gaschromatographie-Massenspektrometrie
- Bestimmung der Hauptaromakomponenten durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse
- Berechnung der Aromawerte basierend auf den ermittelten Daten
- Aromasimulation

Die Aromasimulation wurde für die Biotransformation von Karottenschalen durch *W. cocos* unter optimierten Bedingungen durchgeführt.

Zur Erfassung der geruchsaktiven Verbindungen und zur Unterscheidung zu den geruchlosen flüchtigen Verbindungen wurden die Extrakte mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) oder Gaschromatographie-Olfaktometrie gekoppelt mit einem Tandemmassenspektrometer (GC-MS-MS-O) untersucht. Dabei wurde der Trägergasstrom nach der Trennsäule an einem T-Stück 1:1 gesplittet. Ein Teil des Gasstroms gelangte zum Flammenionisationsdetektor (FID) bzw. zum Massenspektrometer (MS) und der andere Teil über eine beheizte Transfersäule zum Olfaktometrie Detektor Port (ODP), wodurch die Detektion der Aromastoffe mit der Nase erreicht wird. Der GC-O macht die gleichzeitige Bestimmung der Geruchsqualität und der Retentionszeit möglich. Das erhaltene Peakprofil spiegelt jedoch nicht unbedingt das Aromaprofil der Probe wider. Aromastoffe, die auf Grund ihrer niedrigen Geruchsschwellen auch in sehr geringen Konzentrationen aromarelevant sind, werden entsprechend nur schwach oder gar nicht vom FID registriert (Blank 1997). Dadurch waren die Zuordnung der Geruchseindrücke zu einem Peak und die Identifizierung schwierig. In der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* wurden von 14 Geruchseindrücken 9 einem Peak zugeordnet (Abb. 3.14, Tab. 3.19). Davon wurden sechs mittels Datenbankvergleich der Massenspektren einem Substanzvorschlag zugewiesen. Bei drei Peaks war keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich.

Da die Bestimmung der aromaaktiven Verbindungen alleine jedoch keine Schlüsse auf den Beitrag der Verbindung zum Gesamtaroma zuließ, wurden die Hauptaromakomponenten durch Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse bestimmt (Schieberle 1995; Ullrich und Grosch 1987). Dazu wurde der Extrakt schrittweise 1:1 mit Pentan/Diethylether (1:1,12, v/v) verdünnt und jede Verdünnung am GC-O mit Flammenionisationsdetektor abgerochen bis kein Geruch mehr wahrgenommen wurde. Die höchste Verdünnung gab den Verdünnungsfaktor (*flavor dilution factor*; FD-Faktor) 2^n (n = Anzahl der 1:1 Verdünnungen) an. Der unverdünnte Extrakt besaß bestimmungsgemäß einen FD-Faktor von 1 (Ferreira *et al.* 2002; Schieberle und Grosch 1988).

Tab. 4.2: Überblick über die FD-Faktoren der identifizierten Aromastoffe in der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen in Medium M1 (A), von unbehandelten Karottenschalen in Medium M1 (B) und von unbehandelten Karottenschalen im optimierten Medium M9 (C) durch *W. cocos*

	Biotransformation A	Biotransformation B	Biotransformation C
Essigsäure	16	16	16
Linalool	64	64	32
(<i>E</i>)-Geraniol	8	2	4
2-Phenylethanol	64	64	64
β -Ionon	1	4	4

Die Umstellung auf unbehandelte Karottenschalen (Biotransformation B, Tab. 4.2) führte dazu, dass (*E*)-Geraniol nur noch in der ersten Verdünnung (FD-Faktor 2), β -Ionon hingegen auch noch in der dritten Verdünnung (FD-Faktor 8) und nicht nur im Ausgangsextrakt (FD-Faktor 1) olfaktometrisch detektiert wurde. Durch Veränderung der Medienzusammensetzung (Biotransformation C) wurde Linalool, bei gleichbleibender Konzentration (Tab. 3.16, Tab. 3.20), in der fünften Verdünnungsstufe das letzte Mal olfaktometrisch wahrgenommen. Für (*E*)-Geraniol wurde ein FD-Faktor von 4 bestimmt.

Die GC-O-Analyse wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zum einen verändert sich die olfaktometrische Empfindlichkeit der Prüfperson, zum anderen können Lücken, sogenannte „gaps“ auftreten. Gaps bezeichnen das Phänomen, dass die Komponente X in Verdünnung 1 nicht gerochen werden kann, jedoch in Verdünnung 2 wieder wahrgenommen wird (Abbott *et al.* 1993). Das Ergebnis der Gaschromatographie-Olfaktometrie ist ebenfalls abhängig von der verwendeten Trennsäule, die z. B. die Geruchsschwellenwerte beeinflusst (Blank *et al.* 1992).

Für die Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse wurden die gaschromatographisch-olfaktometrischen Analysen so durchgeführt, dass an Tag eins die Verdünnungen 1:4, 1:16, 1:64 und an Tag zwei die Verdünnungen 1:2, 1:8, 1:32 und 1:128 untersucht wurden. Durch dieses Vorgehen sollte das Auftreten von „gaps“ verhindert werden (Schieberle 1995).

Die Quantifizierung der Hauptaromakomponenten erfolgte über einen Internen Standard. Da der Interne Standard Verluste bei der Aufarbeitung ausschließen soll, muss

darauf geachtet werden, dass der Standard den Verbindungen strukturell möglichst ähnlich ist. Bei dem breiten strukturellen Spektrum der identifizierten Verbindungen (Essigsäure, Linalool, (*E*)-Geraniol, 2-Phenylethanol und β -Ionon) fiel die Wahl des internen Standards auf Thymol (Abb. 4.2).

In der Aromaforschung wird zur Quantifizierung meist die Stabilisotopenverdünnungsanalyse eingesetzt. Dazu werden ^{13}C - oder ^2H -markierte Aromastoffe als interne Standards verwendet. Die Unterschiede zwischen Analyt und Standard werden so möglichst gering gehalten und die Verluste in der Probenaufarbeitung ideal kompensiert. Ein Nachteil der Methode besteht jedoch darin, dass viele der Standards selbst synthetisiert werden müssen oder in der Anschaffung sehr teuer sind (Schieberle 1995).

Von Rothe und Thomas (1963) wurde der Aromawert, als das Verhältnis zwischen der Konzentration des Aromastoffes in der Probe und dem Schwellenwert des Aromastoffes in einer der Probe möglichst identischen Matrix, definiert. Ab einem Aromawert von eins trägt der Aromastoff zum Gesamtaroma der Probe bei. Durch synergetische Effekte können jedoch Ausnahmen auftreten (Grosch 2001; Widder und Grosch 1994). Bei der Berechnung der Aromawerte ist zu berücksichtigen, dass die in der Literatur angegebenen Geruchsschwellenwerte oftmals über einen weiten Bereich schwanken (Tab. 4.3). Dies kann zum einen daran liegen, dass die verwendeten Standards mit Spuren anderer aromaaktiver Verbindungen kontaminiert sind (Buttery und Ling 1997) oder dass ein zu kleines Prüfpanel zur Bestimmung des Geruchsschwellenwerts eingesetzt wurde (Czerny *et al.* 2008).

Tab. 4.3: Schwankungsbereich der Geruchsschwellenwerte [$\mu\text{g L}^{-1}$ Wasser]

Verbindung	Geruchsschwellen [$\mu\text{g L}^{-1}$ Wasser]	Literatur
Essigsäure	22.000–99.000	(Czerny <i>et al.</i> 2008; Karagül-Yüceer <i>et al.</i> 2003)
Linalool	0,14–6	(Buttery <i>et al.</i> 1971; Fritsch und Schieberle 2005)
(<i>E</i>)-Geraniol	1,10–75	(Czerny <i>et al.</i> 2008; Schuh und Schieberle 2006),
2-Phenylethanol	140–1000	(Czerny <i>et al.</i> 2008; Schuh und Schieberle 2006)
β -Ionon	0,007–23	(Buttery <i>et al.</i> 1971; Tandon <i>et al.</i> 2000)

Nach Gleichung 8 (2.12) ergeben sich daraus für Linalool Aromawerte zwischen 17 und 721, für (*E*)-Geraniol zwischen 0,8 und 56, für 2-Phenylethanol zwischen 0,5 und 4 und für β -Ionon zwischen 0,5 und 3. Lediglich der Aromawert der Essigsäure bleibt bei einem Wert von unter eins. Je nach dem welcher Geruchsschwellenwert aus der Literatur zur Berechnung der Aromawerte herangezogen wurde, lagen diese für (*E*)-Geraniol, 2-Phenylethanol oder β -Ionon über einem Wert von 1. Da flüchtige Verbindungen ab einem Aromawert von über eins zum Aroma der Probe beitragen, kann über den Einfluss der drei Aromastoffe auf den Geruch der Biotransformation keine Aussage getroffen werden. Im Fall von 2-Phenylethanol und Linalool ist jedoch davon auszugehen, dass beide Stoffe – auf Grund ihrer FD-Faktoren (64 für 2-Phenylethanol in allen Biotransformationen und 64 bzw. 32 für Linalool) – wichtig für das Aroma waren.

Zur Vermeidung dieses Schwankungsbereiches und der daraus resultierenden Unterschiede in den Aromawerten sollten die Geruchsschwellen der identifizierten Verbindungen besser systemspezifisch bestimmt werden.

Bei der Aromasimulation wurden alle quantifizierten Aromastoffe (Tab. 3.20) in ihrer Konzentration im optimierten Medium (pH mit 0,1 M Salzsäure auf 2,8 eingestellt) gemischt. Das Rekombinat wurde von den Prüfern mit dem Kulturüberstand der Biotransformation verglichen. Der Geruchseindruck der Biotransformation, die als Referenz diente, wurde als „blumig, fruchtig (Orangensaft), krautig, Nivea-Creme“ beschrieben. Das Aroma war identisch mit früheren Biotransformationen. Die olfaktometrische Untersuchung der Aromasimulation zeigte einen deutlich wahrnehmbaren Unterschied zur Biotransformation, der von allen Prüfern erkannt wurde.

Nach Grosch (2001) sind die Hauptursachen, dass die Aromasimulation nicht mit dem Original übereinstimmt darin zu suchen, dass die Quantifizierung der Aromastoffe nicht korrekt war und dass Substanzen nur olfaktometrisch, aber nicht gaschromatographisch detektiert wurden. Eine genaue Quantifizierung der Aromastoffe wird nur durch Stabilisotopenverdünnungsanalyse erreicht. Trotz struktureller Unterschiede zu den identifizierten Verbindungen wurde Thymol (Abb. 4.2) als Interner Standard verwendet, da diese Verbindung nicht in den untersuchten Extrakten enthalten war. Des Weiteren eluierte Thymol unter den gegebenen GC-Bedingungen zu einem Zeitpunkt, an dem es zu keiner Co-Elution mit anderen Aromastoffen kam. Die

Zugabe des Internen Standards erfolgte erst nach der Probenaufarbeitung, so dass Verluste während der Aufarbeitung nicht berücksichtigt wurden.

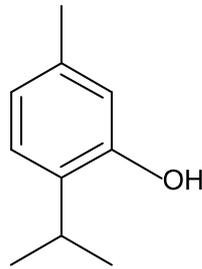


Abb. 4.2: Thymol

In der Aromarekombination wurden die Stoffe berücksichtigt, die nach Trennung über einen Gaschromatographen olfaktometrisch detektiert und identifiziert wurden. Zwei Verbindungen mit einem FD-Faktor von 4 bzw. 8 wurden nicht identifiziert und somit auch nicht in der Aromasimulation berücksichtigt. Ebenso wurden Einflüsse durch andere Stoffe in der Probe, die zu Wechselwirkungen und damit möglicherweise zu einer Verringerung der Flüchtigkeit führten, nicht berücksichtigt. Die Ursachen in den Unterschieden der Geruchseindrücke der Aromasimulation und der Biotransformation sind daher in der Identifizierung und der Quantifizierung der aromaaktiven Verbindungen zu suchen.

Der letzte Schritt in der Aromaanalytik ist das Durchführen von *omission*-Tests (Weglass-Versuchen). Dabei werden einzelne Aromastoffe oder Stoffe unter einem bestimmten Aromawert in der Rekombination weggelassen und das Aromaprofil im Vergleich zur Referenz beurteilt. Dadurch erfolgt die Bestimmung, welche Verbindungen wirklich am Gesamtaroma beteiligt sind.

Da durch die verwendete Methode zur Extraktion der Aromastoffe die Kulturen beendet oder die Kulturbedingungen durch Probenentnahme verändert wurden, wurde nach einer Methode zur online-Analyse der Aromastoffe im Kulturkolben gesucht. Die Untersuchung der Aromastoffe im Kopfraum des Kulturkolbens sollte zur Analyse der Aromabildung während der Kulturdauer genutzt werden. Die Festphasenmikroextraktion (SPME) wurde als alternative Extraktionsmethode gewählt, da sie lösungsmittelfrei, ohne thermische Belastung der Proben und ohne Veränderung der Kulturbedingungen direkt im Kopfraum des Kulturkolbens durchgeführt werden konnte. Dazu wurden die verwendeten Cellulosestopfen ausgehöhlt und mit einer sterilen Kanüle

durchstoßen. Durch die Kanüle wurde die SPME-Faser in den Kopfraum des Kolbens eingeführt. Die Extraktion fand während der Kultivierung im Inkubationsschüttler bei 24 °C für 40 min statt. Supelco, der Hersteller für SPME-Fasern, empfiehlt für einen weiten Bereich an flüchtigen bis mäßig-flüchtigen Analyten (C3 bis C20) die Verwendung von Divinylbenzen/Carboxen/Polydimethylsiloxan-Fasern. Bei der Untersuchung von flüchtigen Metaboliten in Kulturen von *Penicillium roqueforti* wurden mit Fasern, deren Beschichtung Carboxen enthielt, die größte Menge an flüchtigen Verbindungen (ermittelt anhand der Gesamtpeakfläche) erfasst (Jeleń 2003) und bestätigte die Wahl der verwendeten Faser.

Der Geruchseindruck der Kultur wird maßgeblich durch die flüchtigen Komponenten im Kopfraum des Kolbens geprägt. Daher sollten durch die SPME die gesuchten flüchtigen Verbindungen dort direkt erfasst werden und die gaschromatographische Analyse ermöglichen.

Zum Vergleich der SPME-Methode mit der klassischen Flüssig-Flüssig-Extraktion erfolgte diese im Anschluss an die Festphasenmikroextraktion des Kulturüberstandes aus der gleichen Probe. Der Vorteil der Flüssig-Flüssig-Extraktion liegt darin, dass der Extrakt aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal z. B. an einem anderen Gerät analysiert werden kann. Nachteilig sind jedoch der hohe Zeitaufwand (Extraktion und Konzentrierung), die Co-Extraktion von nicht-flüchtigen Verbindungen (wie z. B. Carotinoiden), der Verbrauch an reinem Lösungsmittel und die Co-Elution von Tiefsiedern mit dem Lösungsmittelpeak in der folgenden gaschromatographischen Analyse. Auf Grund der Co-Extraktion nicht flüchtiger Bestandteile der Biotransformation kann es zu einer größeren Verunreinigung des Messsystems kommen.

Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse zeigte große Unterschiede (Abb. 3.19) in den Ergebnissen der beiden Methoden. 2-Nonanon, α - und β -Caryophyllen wurden nur mittels Festphasenmikroextraktion detektiert. Komponenten mit einer Retentionszeit von über 25 min d. h. $KI > 1800$, wie Benzylalkohol und 2-Phenylethanol, hingegen wurden diskriminiert. Wird die SPME im Kopfraum durchgeführt, werden leichtflüchtige Verbindungen weniger diskriminiert als schwerflüchtige Komponenten. Die Konzentration leichtflüchtiger Verbindungen im Kopfraum ist größer als die der Schwerflüchtigen, da die Gleichgewichtseinstellung der leichtflüchtigen Stoffe schneller erreicht wird. Die optimale Extraktionszeit sollte

daher bis zu Erreichen der Gleichgewichtseinstellung des Systems Faser/Gasraum/Probe dauern (Câmara *et al.* 2006; Junker 2004). Auch die olfaktometrischen Untersuchungen des durch Flüssig-Flüssig-Extraktion erhaltenen Extrakts und der flüchtigen Verbindungen, die durch SPME erhalten wurden, zeigten Unterschiede (Tab. 3.25). Durch olfaktometrische Untersuchung nach HS-SPME der Biotransformation an Kulturtag 6 wurden 2-Heptanol, 1-Octen-3-ol, 3-Octanon und 3-Octanol detektiert. Linalool und 2-Phenylethanol, für die im Extrakt der Biotransformation die höchsten FD-Faktoren bestimmt wurden, wurden in der gaschromatographisch-olfaktometrischen Analyse der flüchtigen Verbindungen nach SPME nicht wahrgenommen (Tab. 3.25). Das Profil und die Peakfläche der mittels Festphasenmikroextraktion erhaltenen Aromastoffe ist abhängig von der Beschichtung, der Beschichtungsdicke und der Länge der Faser, sowie von der Affinität der flüchtigen Verbindungen zur Beschichtung, der Extraktionszeit und -temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Mediums. Das erhaltene Profil entspricht daher möglicherweise nicht dem Aroma der Probe (Câmara *et al.* 2006; Fiedler *et al.* 2001; Jeleń 2003). Da die Untersuchungen mittels SPME während der Kultivierung direkt im Kulturkolben erfolgen sollten, kann eine Optimierung nur durch Variation der Extraktionsdauer erreicht werden.

Die ausschlaggebenden Gründe dafür, die Aromabildung während der Biotransformation trotz der Unterschiede zur Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Festphasenmikroextraktion zu erfassen, lagen darin, dass die Kulturbedingungen (24 °C, 150 rpm, Kulturvolumen) nicht verändert werden mussten. Weiterhin war neben dem geringeren Zeitaufwand auch der Einsatz von Lösungsmitteln nicht nötig

Die Aromaveränderung der Biotransformation und der Blindwerte wurde mittels SPME über den Kulturzeitraum bestimmt, in dem die flüchtigen Verbindungen im Kopfraum der Kulturen an jedem Kulturtag extrahiert und anschließend gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert wurden. Mittels HS-SPME wurden in der Biotransformation im Vergleich zu den Blindwerten acht Komponenten erfasst, deren Konzentration deutlich gesteigert oder neu gebildet wurden (Abb. 3.20, Tab. 3.27). Die Verbindungen wurden jedoch in keiner der gaschromatographisch-olfaktometrischen Analysen der Biotransformation (Extrakt oder HS-SPME) wahrgenommen, so dass deren Einfluss auf das Aroma fraglich ist. Der Geruchseindruck der zur Aromaveränderung untersuchten Biotransformation (3.8.2) glich

jedoch dem vorheriger Biotransformationen (3.6.2.1). Die unter diesen Bedingungen erfassten flüchtigen Verbindungen gaben somit nicht den Geruchseindruck der Biotransformation wieder. Die Ursache ist demnach in der Extraktionsmethode der flüchtigen Verbindungen zu suchen. Die HS-SPME zum Methodenvergleich zeigte bereits, dass (*E*)-Geraniol und 2-Phenylethanol stark diskriminiert wurden. Bei der Untersuchung der Aromabildung wurden sie daher nicht erfasst.

Für die neu gebildeten Verbindungen wurden durch Vergleich der Massenspektren mit Hilfe einer Spektrendatenbank (NIST 2011) Substanzvorschläge erhalten. Die Zuordnung zu Strukturvorschlägen aus der Datenbank erwies sich im Fall der Sesquiterpene als sehr schwierig, da die Massenspektren teils sehr ähnlich waren. Anhand des Massenspektrums wurde dem Peak mit dem Kováts-Index 1634 das Sesquiterpen α -Copaen zu geordnet. Der Literaturwert für den Retentionsindex von α -Copaen liegt jedoch bei 1488 (Szafranek *et al.* 2005). Dem Peak mit dem Retentionsindex 1460 wurde durch Abgleich der Massenspektren das Sesquiterpen α -Cubeben zugewiesen. Der in der Literatur für α -Cubeben beschriebene Retentionsindex liegt bei 1482 (Choi 2003) und unterscheidet sich um mehr als 20 vom bestimmten. Der Unterschied zwischen dem Literaturwert des Kováts-Index und dem für α -Copaen bestimmten war viel zu groß um den Strukturvorschlag nach Abgleich der Massenspektren zu bestätigen. Die Literaturwerte der Retentionsindizes beider Verbindungen unterscheiden sich lediglich geringfügig und auch massenspektrometrisch war die Differenzierung der Sesquiterpene kaum möglich. Für beide Verbindungen (Molekülion m/z 204) sind die Ionen mit dem Masse-Ladungsverhältnis von 161, 105 und 119 am intensivsten. Das Fragment m/z 161 kann durch die Abspaltung eines Isopropylradikals vom Molekülion entstehen (Schmidt *et al.* 1999) Zu dem Massenfragment m/z 133, das in beiden Massenspektren in geringer Intensität vorhanden ist, kann es durch Neutralverlust von C_2H_4 des Fragments m/z 161 kommen. Der weitere Verlust von C_2H_4 des Fragments m/z 133 führt zu m/z 105. Aus dem Fragment m/z 161 kann durch Verlust von C_3H_6 das Fragment m/z 119 hervorgehen (Steliopoulos und Mosandl 2001).

Da die mittels gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse nach SPME detektierten Verbindungen nicht den Geruchseindruck des Kulturkolbens widerspiegeln, wurde auf weitere Versuche mittels SPME verzichtet. Alle Änderungs- bzw. Optimierungsmöglichkeiten würden die Kulturbedingungen verändern. Eine Erhö-

ung der Extraktionstemperatur bis zu einer gewissen Temperatur (abhängig von den zu untersuchenden Verbindungen) führt zur Steigerung der Konzentration (Câmara *et al.* 2006), jedoch stören hohe Temperaturen den Pilzmetabolismus oder töten den Mikroorganismus ab (Jeleń 2003). Auch eine Salzzugabe oder die Veränderung des pH-Wertes kann die Extraktion flüchtiger Verbindungen aus dem Kopfraum verbessern (Câmara *et al.* 2006). Daraus resultiert aber auch eine Beeinflussung der Kulturbedingungen. Als alternative Möglichkeiten zur Extraktion der Aromastoffe im Kopfraum des Kulturkolbens könnte ein *purge-and-trap*-Verfahren eingesetzt oder dynamische Kopfraum-Untersuchungen durchgeführt werden. Für beide Methoden muss jedoch ein Gasstrom durch den Kulturkolben getrieben werden, dessen Auswirkungen auf das Pilzwachstum nicht bekannt sind.

4.2 Biosynthesewege

In Submerskulturen von 40 Basidiomyceten in einem Medium bestehend aus Glucose, Asparagin und Hefeextrakt wurden über 340 flüchtige Verbindungen mit einem breiten Strukturspektrum (Alkohole, Aldehyde, Ketone) detektiert (Abraham und Berger 1994; Krings *et al.* 1995). Der Basidiomycet *W. cocos* bildete in diesem Medium unter anderem Limonen, 2-Methyl-1-butanol, 3-Octanol, Geraniol, Linalool, 2-Furanmethanol und 3-Octanon in Konzentrationen unter 1 mg L^{-1} (Krings *et al.* 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden in der Kultur von *W. cocos* (Pilz-Blindwert) in einem Medium aus Glucose, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumsulfat und Spurenelementen ebenfalls 2-Methyl-1-butanol, 3-Octanol und Linalool produziert. Die Aromastoffe 2-Methyl-1-butanol, 3-Octanol, Linalool, 2-Furanmethanol und (*E*)-Geraniol wurden auch in der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* identifiziert. Die Konzentration von Linalool konnte durch die Zugabe des Substrates noch erhöht werden.

Auf die möglichen Biosynthesewege der olfaktometrisch detektierten Aromastoffe 2-Phenylethanol, Linalool und (*E*)-Geraniol sowie der neu gebildeten Verbindungen Benzylalkohol und 2-Furanmethanol wird im Folgenden näher eingegangen. Der Bildungsweg des C13-Norisoprenoids β -Ionon wird im Abschnitt 4.3 genauer diskutiert.

2-Phenylethanol

2-Phenylethanol ist ein aromatischer Alkohol (Abb. 4.3) mit einem Geruchseindruck nach Rosen (San-Juan *et al.* 2010). In großen Mengen findet er Verwendung in der Parfümherstellung und in geringen Mengen auch in der Lebensmittelindustrie.

Eine Reihe von Pilzen ist dafür bekannt 2-Phenylethanol zu bilden, darunter z. B. *I. benzoinum*, der innerhalb von 20 Tagen 280 mg L^{-1} 2-Phenylethanol bildet (Fabre *et al.* 1996)

Ein Biosyntheseweg von 2-Phenylethanol wurde 1907 von Ehrlich das erste Mal beschrieben. Der erste Schritt führt oxidativ von der Aminosäure L-Phenylalanin (1) zu Phenylpyruvat (2) und wird von einer Transaminase katalysiert. Anschließend erfolgt eine Decarboxylierung zu Phenylacetaldehyd (3) gefolgt von der Reduktion zu 2-Phenylethanol (4) (Abb. 4.3).

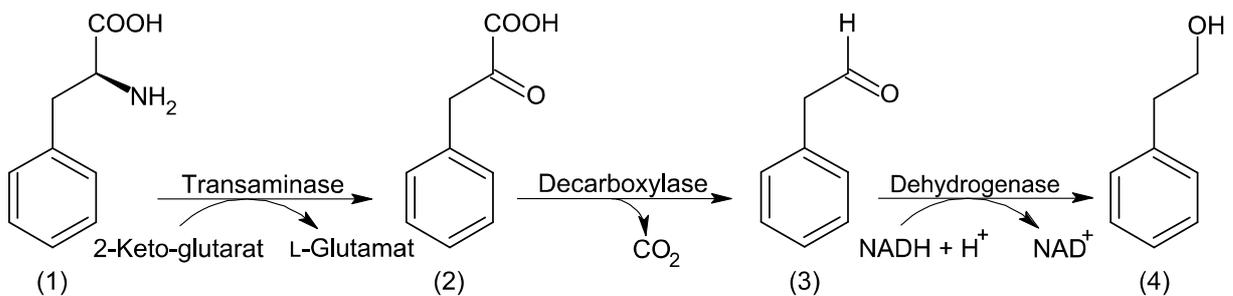


Abb. 4.3: Biosyntheseweg von 2-Phenylethanol (4) aus L-Phenylalanin (1)
(nach Ehrlich 1907, modifiziert nach Etschmann *et al.* 2002)

2-Phenylethanol kann nicht nur direkt über den Biosyntheseweg nach Ehrlich (1907), sondern auch über den Shikimisäure-Weg, der für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren verantwortlich ist, gebildet werden. In Hefen verläuft der Abbau von L-Phenylalanin nur dann über den Biosyntheseweg nach Ehrlich (1907), wenn die Aminosäure die einzige Stickstoffquelle darstellt (Albertazzi *et al.* 1994). Stehen noch andere Stickstoffquellen zur Verfügung, so erfolgt der Abbau über den Zimtsäure-Weg und die Bildung von Benzylalkohol wird gefördert. Jedoch wird selbst bei sehr hohen L-Phenylalanin-Konzentrationen der Zimtsäure-Weg nicht komplett unterdrückt (Akita *et al.* 1990). Ob der Basidiomycet *W. cocos* entsprechende Transaminasen, Decarboxylasen und Dehydrogenasen bildet und die Bildung von 2-Phenylethanol nach Abb. 4.3 und vergleichbar zu der Synthese in Hefen abläuft, ist noch unklar. In der Literatur waren keine Angaben über die genannten Enzyme in Kulturen von

W. cocos beschrieben. Eine Möglichkeit der Aufklärung der Biosynthese wäre eine Dotierung mit isotoopenmarkiertem L-Phenylalanin.

Im Pilz-Blindwert wurde kein 2-Phenylethanol gebildet, sodass die Ursache für die Bildung von 2-Phenylethanol in den zugesetzten Karottenschalen zu suchen ist. In 100 g essbarem Anteil von Karotten sind 31 mg L-Phenylalanin enthalten (Souci *et al.* 2008), sodass dem Pilz über die Substratzugabe^{vi} ungefähr 9 mg (100 mL)⁻¹ L-Phenylalanin zur Bildung von 2-Phenylethanol zu Verfügung standen.

Benzylalkohol

Der Geruchseindruck von Benzylalkohol wird als aromatisch, blumig, frisch, grün beschrieben (Komes *et al.* 2006). Anwendung findet er in Aromen, Kosmetika und als Lösungsmittel z. B. in der Lackindustrie. Der Biosyntheseweg von Benzylalkohol läuft parallel oder in Konkurrenz zur Bildung von 2-Phenylethanol. Sind – wie in der vorliegenden Arbeit – noch weitere Stickstoffquellen vorhanden, so wird L-Phenylalanin hauptsächlich über den Zimtsäure-Weg (Abb. 4.4) metabolisiert (Akita *et al.* 1990). Die Konzentrationssteigerung von Benzylalkohol im Vergleich zur Steigerung der Konzentration von 2-Phenylethanol nach Dotierung mit L-Phenylalanin lässt vermuten, dass der Abbau über den Zimtsäure-Weg bevorzugt wird (4.4.2).

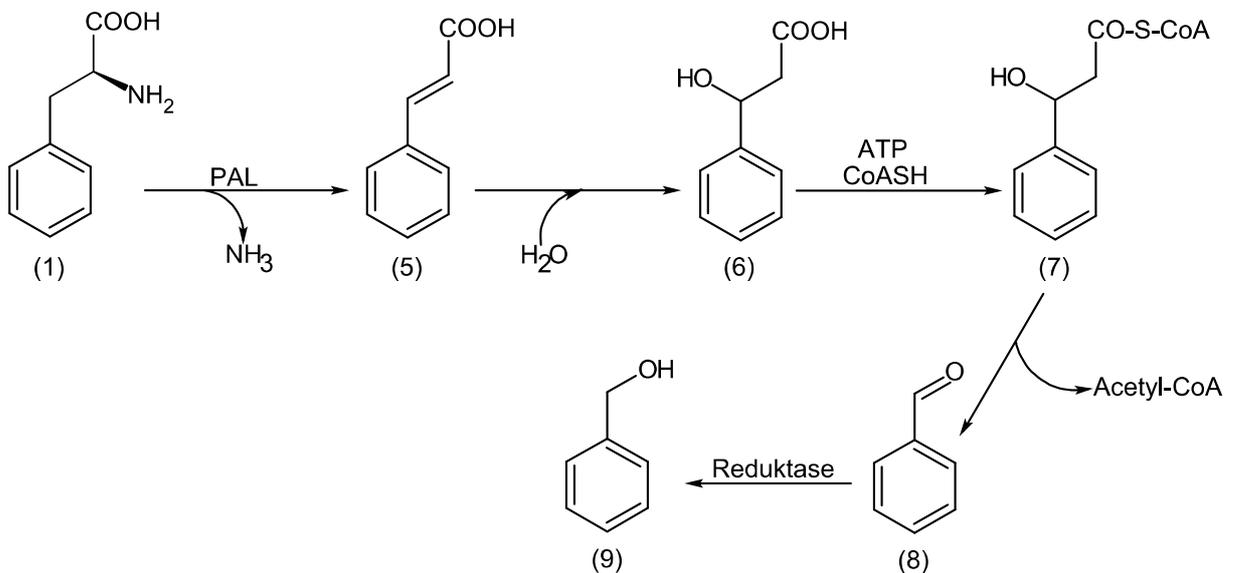


Abb. 4.4: Abbau von L-Phenylalanin (1) über den Zimtsäure-Weg bis zur Bildung von Benzaldehyd und anschließender Reduktion zu Benzylalkohol (9)
(modifiziert nach Etschmann *et al.* 2002)

^{vi} 27,6 g unbehandelte Karottenschalen in 100 mL Medium

Der erste Schritt der Reaktion wird von Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysiert und liefert die namensgebende Zimtsäure (5). Die Zimtsäure wird über mehrere Zwischenprodukte zu Benzaldehyd (8) abgebaut, welches zu Benzylalkohol (9) reduziert wird. Benzaldehyd wurde jedoch in den Kulturen mittels gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse nicht detektiert.

Die Aminosäuresequenz einer Phenylalanin-Ammonium-Lyase aus *Ustilago maydis* (Accession Nummer: AAL09388, NCBI) wurde gegen die bekannten Basidiomycetengenome (JGI DOE Joint Genome Institute, USA) geblastet (Blastparameter: tblastn, E-Wert: 10^{-5} , Word size: 3). Für *W. cocos* (Stamm MD-104) wurde eine PAL (Protein ID 28025) mit einem E-Wert von $5,69 \cdot 10^{-120}$ gefunden. Liegt diese PAL aktiv auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm (CBS 279.55) vor, würde dies die Biosynthese von Benzylalkohol über den Zimtsäure-Weg erklären.

Die Dotierung mit isotopenmarkiertem L-Phenylalanin könnte weitere Aufschlüsse zur Biosynthese ergeben, da Benzaldehyd als Vorstufe des Benzylalkohols nicht detektiert wurde. In der Kultur von *W. cocos* wird 2-Phenylethanol und Benzylalkohol nur bei Zugabe von Karottenschalen gebildet.

Terpenoide Linalool und (E)-Geraniol

Terpene sind formal aus Isopreneinheiten (C_5H_8 -Einheiten) aufgebaut und werden in Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Triterpene (C_{30}) und Tetraterpene (C_{40}) unterteilt. Über 40 Kohlenstoffatome enthaltende Terpene werden als Polyterpene bezeichnet. Als Grundgerüst dient Isopentenylidiphosphat bzw. dessen Isomer 3,3-Dimethylallyldiphosphat, die durch Kondensation Geranyl-diphosphat, das Grundgerüst der Monoterpene bilden. Die oxidierten Terpene wie Linalool und (E)-Geraniol bezeichnet man als Terpenoide. Die Bildung von Isopentenylidiphosphat und dessen Isomer kann, abhängig vom Organismus, über den Mevalonsäure-Weg oder einen Mevalonat-unabhängigen Weg (über 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP-Weg)) ablaufen (Lichtenthaler 1999). Studien mit ^{13}C -markiertem Acetat und Glucose zeigten, dass in Hefen und Pilzen die Bildung von Isoprenoiden über den Mevalonsäure-Weg abläuft (Disch und Rohmer 1998).

Geranyldiphosphat wird durch eine Kopf-Schwanz-Reaktion aus Isopentenylidiphosphat und 3,3-Dimethylallyldiphosphat gebildet. Der einzig bisher beschriebene Weg dieser Reaktion wird durch eine Geranyldiphosphat-Synthase katalysiert (Burke

et al. 1999). Da in Submerskulturen von *W. cocos* das Monoterpen Limonen und die Terpenoide Linalool und Geraniol detektiert wurden, wird davon ausgegangen, dass *W. cocos* zumindest über eine Geranyldiphosphat-Synthase verfügt sowie zur Oxyfunktionalisierung von Terpenen befähigt ist (Krings *et al.* 1995).

Linalool (Abb. 4.5) ist als acyclisches Monoterpenoid mit frischem, blumigem Duft ein wichtiger Aromastoff für die Parfümindustrie.

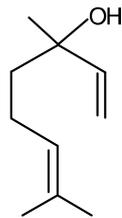


Abb. 4.5: Linalool

Eine Linalool-Synthase, die die Oxidation von Geranyldiphosphat zu Linalool katalysiert, wurde in *Clarkia breweri*, einem Nachtkerzengewächs detektiert. In Pilzen ist das Vorkommen jedoch fraglich (Dudareva *et al.* 1996).

In geringen Konzentrationen wurde Linalool *de novo* ebenfalls im Pilz-Blindwert gebildet. Auch Krings *et al.* (1995) zeigten das Vorkommen von Linalool in einer Konzentration kleiner 1 mg L^{-1} in Submerskulturen von *W. cocos*. In der Biotransformation der unbehandelten Karottenschalen wurde die Konzentration des Terpenoids im Vergleich zum Pilz-Blindwert um den Faktor 9 gesteigert.

Der Geruch des acyclischen Monoterpenoids (*E*)-Geraniol (Abb. 4.6) wird als blumig beschrieben. Verwendung findet es u. a. in der Parfüm- und Kosmetikindustrie.

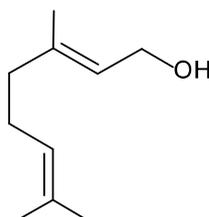


Abb. 4.6: (*E*)-Geraniol

In Basilikum (*Ocimum basilicum*) wurde eine Geraniol-Synthase nachgewiesen und der Bildungsweg von Geraniol aus Geranyldiphosphat mit Hilfe von isotonenmarkierten Wassers (H_2^{18}O) aufgeklärt. Im ersten Schritt der Reaktion wird Pyro-

phosphat abgespalten, wodurch ein Carbokation als Zwischenprodukt entsteht. Unter Wasseranlagerung reagiert dieses zu Geraniol. Die Bildung von Nerol ((Z)-Geraniol) wurde durch diese Geraniol-Synthase nicht erreicht (Iijima *et al.* 2004).

Über das Vorhandensein von Geraniol- und Linalool-Synthasen im Genom von *W. cocos* ist bisher noch nichts bekannt, so dass der Weg über solche hypothetisch bleiben muss.

Aromastoffe werden in Pflanzen oftmals in Form von glykosidisch gebundenen Vorstufen gespeichert und erst zu bestimmten Zeitpunkten der Reifung freigesetzt. Die enzymatische Spaltung oder die saure Hydrolyse der glykosidisch gebundenen Aromastoffe könnte in der Biotransformation zu den detektierten Terpenoiden geführt haben.

Eine weitere Möglichkeit der Bildung von Linalool und (*E*)-Geraniol liegt in der Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen durch *W. cocos*. In Versuchen mit α -Pinen-Zugabe zu Submerskulturen von *P. eryngii*, *P. sapidus*, *Stemphylium botryosum*, *Penicillium solitum* und *Chaetomium globosum* wurde gezeigt, dass alle fünf Pilze in der Lage waren α -Pinen zu Verbenol und Verbenon zu funktionalisieren (Krings *et al.* 2009). In der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchung der mittels SPME extrahierten flüchtigen Verbindungen von unbehandelten Karottenschalen in Medium M9 und deren Biotransformation durch *W. cocos* an Tag Null wurden unter anderem die Terpene α - und β -Pinen und Limonen detektiert. In rohen, getrockneten, eingekochten oder in gefrorenen Karotten wurden unter anderem auch α - und β -Pinen und Limonen sowie β -Myrcen und Sabinen gefunden (Alasalvar *et al.* 1999; Heatherbell *et al.* 1971; Kjeldsen *et al.* 2001, 2003; Soria *et al.* 2008). Arbeiten von Busmann und Berger (1994) zeigten bereits, dass Basidiomyceten Myrcen in Submerskulturen zu cyclischen und nicht-cyclischen Terpenoiden transformierten. In Submerskulturen von *P. sapidus* wurde (*R*)-(+)-Limonen, das als Reststoff in der citrus-verarbeitenden Industrie anfällt, zu 4-Hydroxy-mentha-1,8-dien hydroxyliert (Kaspera *et al.* 2005). Die Möglichkeit, dass die identifizierten Terpenoide Linalool und (*E*)-Geraniol ebenfalls durch Transformation der Terpene aus den Karottenschalen durch *W. cocos* entstanden sind, ist denkbar. Dieser Weg würde auch erklären, weshalb die Terpenoide im Substrat-Blindwerten und im Fall von (*E*)-Geraniol auch im Pilz-Blindwert nicht gebildet wurden. Der Gehalt der Terpene α - und β -Pinen und Limonen verringert sich über den Kulturverlauf jedoch

auch im Substrat-Blindwert. Mit Hilfe isotoopenmarkierter Standards sollte geklärt werden, ob *W. cocos* in der Lage ist, Terpene zu Linalool und (*E*)-Geraniol zu metabolisieren.

2-Furanmethanol

Der Vergleich mit den Blindwerten zeigte, dass 2-Furanmethanol in der Biotransformation neu gebildet wurde (Abb. 3.16, Tab. 3.21). In einem Medium bestehend aus Glucose, Asparagin und Hefeextrakt war *W. cocos* ebenfalls in der Lage 2-Furanmethanol zu bilden (Krings *et al.* 1995). Arbeiten von Brock *et al.* (2011) zeigten, dass 2-Furanmethanol auch von dem Schimmelpilz *Fusarium fujikuroi* gebildet wird. 2-Furanmethanol wurde nur in der Biotransformation von Karottenschalen gebildet, sodass das Substrat die Vorstufen zur Synthese von 2-Furanmethanol bot. Der Syntheseweg von 2-Furanmethanol in Pilzen ist noch ungeklärt.

4.3 β -Carotin-Abbau

Der Abbau von Carotinoiden kann enzymatisch und/oder nicht-enzymatisch ablaufen. Der nicht-enzymatische Abbau erfolgt meist unspezifisch durch Autoxidation, Photooxygenierung oder durch thermischen Abbau (Kanasawud und Crouzet 1990, Mordi *et al.* 1993, Winterhalter und Rouseff 2002).

Während des Autoklavierens (20 Minuten bei 120 °C) der Substrat-supplementierten Medien wurde β -Carotin Hitze ausgesetzt, wodurch ein thermischer Abbau eintrat. Da durch das Sterilisieren die Enzymaktivität verloren ging, ist davon auszugehen, dass die Gehalte der flüchtigen Verbindungen β -Ionon, 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid im Substrat-Blindwert hauptsächlich auf thermischen Abbau zurückzuführen waren. Ein nicht-enzymatischer Abbau nach der Sterilisation durch Autoxidation war jedoch nicht ganz auszuschließen. Die im Substrat-Blindwert detektierten β -Carotin-Abbauprodukte spiegelten somit den nicht-enzymatischen (thermischen) Abbau wider. Die Unterschiede in den Konzentrationen von β -Ionon, 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid in der Biotransformation im Vergleich zum Substrat-Blindwert sind daher auf den Braunfäulepilz *W. cocos* zurückzuführen.

Kanasawud und Crouzet (1990) untersuchten den thermischen Abbau von β -Carotin in wässrigen Lösungen bei 97 °C über einen Zeitraum von 3 h und stellten fest, dass

Dihydroactinidiolid als erste flüchtige Komponente während des Abbaus bei 97 °C bereits nach 30 min entsteht. Weitere identifizierte Verbindungen waren 5,6-Epoxy- β -ionon, β -ionon, 4-oxo- β -ionon, 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexan-1-carboxaldehyd, 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon und β -Cyclocitral. Als Vorstufen für Dihydroactinidiolid postulieren Kanasawud und Crouzet (1990) 5,8-Epoxy- β -carotin sowie 5,6-Epoxy- β -ionon (Abb. 4.7). Die Aussage wird dadurch unterstützt, dass der Gehalt von 5,6-Epoxy- β -ionon, nach einem Konzentrationsmaximum bei ca. 2 h wieder fällt und die Konzentration der anderen Verbindungen weiter steigt (Kanasawud und Crouzet 1990). Bosser *et al.* (1995) untersuchten ebenfalls die Bildung von Dihydroactinidiolid und konnten beweisen, dass 5,6-Epoxy- β -ionon in einer wässrigen Lösung innerhalb von 21 h bei einer Temperatur von 80 °C zu 98% in Dihydroactinidiolid transformiert wird.

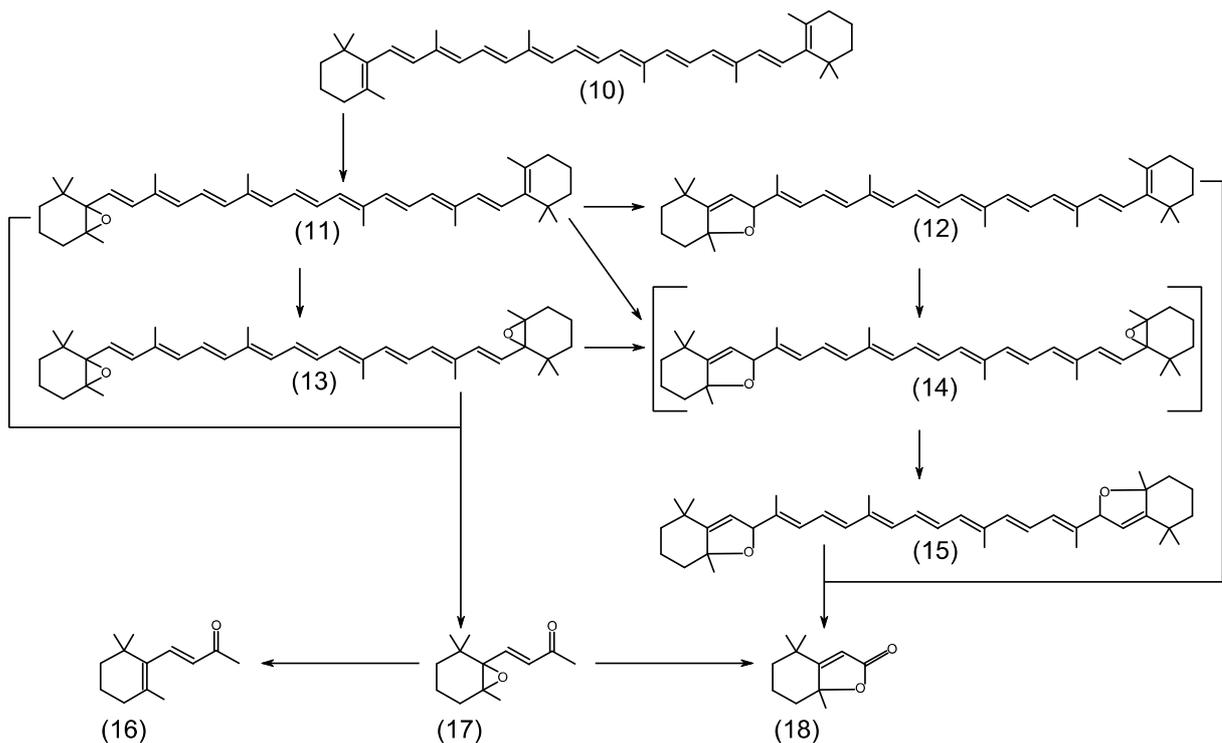


Abb. 4.7: Reaktionsschema des thermischen Abbaus von β -Carotin (10) zu flüchtigen und nicht-flüchtigen Verbindungen (modifiziert nach Kanasawud und Crouzet 1990): 5,6-Epoxy- β -carotin (11), 5,8-Epoxy- β -carotin (12), 5,6,5',6'-Diepoxy- β -carotin (13), 5,6,5',8'-Diepoxy- β -carotin (14), 5,8,5',8'-Diepoxy- β -Carotin (15), β -ionon (16), 5,6-Epoxy- β -ionon (17) und Dihydroactinidiolid (18)

Der enzymatische Abbau von Carotinoiden kann unspezifisch durch Co-Oxidation oder durch spezifische Spaltung erfolgen.

Bosser und Belin (1994) zeigten, dass β -Carotin durch freie Radikale abgebaut wurde, die durch ein Xanthin Oxidase/Acetaldehyd-System gebildet wurden. Das Enzym/Aldehyd-System bildet zuerst ein Superoxid-Anion, das dann Alkylradikale generiert, die wiederum β -Carotin angreifen. Der Abbau könnte möglicherweise über ein mesomeriestabilisiertes Carbokation ablaufen, das durch Reaktion mit Sauerstoff zu einem Hydroperoxid weiterreagiert. Nach anschließender Hock-Spaltung z. B. an der Bindung von C9-10 entstehen die zwei Apocarotinale β -Ionon und 10'-Apo- β -carotinal (Zorn *et al.* 2003b).

In einem Versuchsansatz mit β -Carotin und einem Xanthinoxidase/Acetaldehyd-System wurden nach 45 min β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon detektiert und nach 90 min auch geringe Mengen Dihydroactinidiolid nachgewiesen. Durch eine anschließende thermische Behandlung des Reaktionsansatzes wurde der Gehalt an Dihydroactinidiolid gesteigert, die Konzentrationen von β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon hingegen nahmen deutlich ab (Bosser *et al.* 1995). Dihydroactinidiolid kann durch thermische Behandlung von 5,6-Epoxy- β -ionon oder auch aus der Spaltung des 5,8-Epoxy- β -carotin direkt entstehen (Bosser *et al.* 1995; Kanasawud und Crouzet 1990). Die Bildung von 5,6-Epoxy- β -ionon durch Epoxidierung von β -Ionon oder direkt aus der Spaltung von 5,6-Epoxy- β -carotin (Abb. 4.7) ist vorstellbar. Die Hypothese, dass β -Ionon aus 5,6-Epoxy- β -ionon gebildet wird (Bosser *et al.* 1995) ist eher unwahrscheinlich.

Die spezifische enzymatische Spaltung kann zum Beispiel durch die Gruppe der carotinoid-spaltenden Oxygenasen (CCO) erfolgen. Das erste bekannte Enzym dieser Gruppe ist AtCCD1 aus *Arabidopsis thaliana*, das ein breites Substratspektrum (Carotine, Xanthophylle und Apo-Carotinoide) symmetrisch an C9-10 und C9'-10' zu einem C14- und zwei C13-Körpern spaltet (Schwartz *et al.* 2001). Weitere Vertreter dieser Gruppe und ebenfalls aus *A. thaliana* sind AtCCD7 und AtCCD8. AtCCD7 katalysiert den Abbau von β -Carotin an C9-10 zu 10'-Apo- β -carotinal (C27-Körper) und β -Ionon. Das entstandene C27-Abbauprodukt wird durch AtCCD8 an der Doppelbindung in Position 13-14 zu 13-Apo- β -Carotinon und einem C9-Dialdehyd abgebaut (Schwartz *et al.* 2004). Durch Versuche mit ^{18}O -isotopenmarkiertem

Wasser und Sauerstoff wurde gezeigt, dass es sich bei der carotinoid-spaltenden Oxygenase AtCCD1 um eine Dioxygenase handelt und der Abbau über Dioxetan als vermutetes Zwischenprodukt abläuft (Olson und Hayaishi 1965; Schmidt *et al.* 2006). Neben den CCDs aus Pflanzen wurden carotinoid-spaltende Enzyme auch in Basidiomyceten nachgewiesen. Eine Peroxidase aus *P. eryngii* spaltet β -Carotin an der thermodynamisch bevorzugten C9-10-Doppelbindung zu β -Ionon und 10'-Apo- β -carotinal (Zorn *et al.* 2003b). Aus dem Kulturüberstand von *M. scorodoni* wurden die zwei extrazellulären Enzyme MsP1 und MsP2 isoliert, die ebenfalls in der Lage sind β -Carotin zu spalten (Scheibner *et al.* 2008). Unter anderem wurden die Aromastoffe β -Ionon, 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid als β -Carotin-Abbauprodukte nachgewiesen (Zelena *et al.* 2009).

Die Konzentration der Norisoprenoide im Substrat-Blindwert gibt den Beitrag des β -Carotin-Abbaus während der thermischen Belastung beim Autoklavieren sowie durch die Autoxidation während der Kulturdauer wieder. Der Unterschied der Konzentrationen zu den Biotransformationen entspricht somit der Einwirkung durch den Pilz.

Tab. 4.4: Überblick über die Konzentrationen mit Schwankungsbereich [$\mu\text{g L}^{-1}$ Kulturüberstand] der Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen in Medium M1 (A), dem entsprechenden Blindwert (B), der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen in Medium M1 (C), dem dazugehörigen Blindwert (D), der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen im optimierten Medium M9 (E) und dem Blindwert (F)

	Biotrans. M1	KS-BW M1	Biotrans. M1	KS-BW M1	Biotrans. M9	KS-BW M9
	A	B	C	D	E	F
β -Ionon	5 \pm 0	30 \pm 1	10 \pm 1	20 \pm 0	10 \pm 0	30 \pm 3
5,6-Epoxy- β -ionon	10 \pm 2	30 \pm 1	30 \pm 0	50 \pm 0	5 \pm 0	20 \pm 3
Dihydroactinidiolid	400 \pm 30	240 \pm 2	350 \pm 10	190 \pm 2	440 \pm 4	240 \pm 0

In allen Biotransformationen war der Gehalt an C13-Norisoprenoiden geringer als in den Substrat-Blindwerten. Die Konzentration von Dihydroactinidiolid hingegen war in den Biotransformationen höher als in den Blindwerten. Der Vergleich der Gehalte von β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon im Blindwert zur Biotransformation lassen keine

Rückschlüsse darüber zu, ob β -Ionon zum Epoxid (Bossler *et al.* 1995) oder ob umgekehrt das Epoxid zu β -Ionon (Kanasawud und Crouzet 1990) abgebaut wurde. Wie Bossler *et al.* (1995) und Kanasawud und Crouzet (1990) zeigten, kann Dihydroactinidiolid durch thermische Behandlung aus 5,6-Epoxy- β -ionon und β -Ionon gebildet werden. Da die Biotransformationen jedoch keiner weiteren thermischen Belastung ausgesetzt wurden, kann die Steigerung der Dihydroactinidiolid-Konzentration in den Biotransformationen demnach nur enzymatisch erfolgt sein. Eine Umsetzung der C13-Norisoprenoide β -Ionon und 5,6-Epoxy- β -ionon zu Dihydroactinidiolid ist möglich, jedoch kann aufgrund der geringen Konzentrationen der C13-Norisoprenoide die Steigerung des Gehaltes an Dihydroactinidiolid (Steigerung von $160 \mu\text{g L}^{-1}$) in der Biotransformation nicht vollständig erklärt werden. Des Weiteren ist die Bildung von Dihydroactinidiolid auch über das 5,8-Epoxy- β -carotin und/oder das 5,8,5',8'-Diepoxy- β -carotin (Abb. 4.7) möglich. Über den genauen Mechanismus können jedoch nur Vermutungen angestellt werden.

4.4 Optimierung der Biotransformation von Karottenschalen durch *W. cocos*

Die Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen durch *W. cocos* zeigte einen sehr ansprechenden Geruchseindruck (3.5.1). Das Substrat wurde zu Beginn der Arbeit gefriergetrocknet eingesetzt, damit die Zugabe des Substrats mit einer definierten Korngröße und Restfeuchte erfolgte. Die Lyophilisation bis zu einer Restfeuchte von unter 10% (Tab. 3.1) dauerte ungefähr 5 Tage. Da diese Substratvorbehandlung in der industriellen Anwendung jedoch sehr zeit- und kostenintensiv ist, wurde untersucht, ob der gleiche Geruchseindruck durch die Biotransformation des unbehandelten Substrats erhalten wird.

Da durch Veränderung der Medienzusammensetzung auch die Zusammensetzung der gebildeten Aromastoffe beeinflusst werden kann (Gallois *et al.* 1990), wurde das Gesamtaroma aller veränderten Biotransformationen stets mit einer Referenz verglichen.

Das Gesamtaroma der Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen wurde als „fruchtig, Nivea-Creme, zitronig und blumig“ beurteilt und führte im Vergleich zur

Verwendung lyophilisierter Karottenschalen reproduzierbar zu identischen Geruchseindrücken (3.6.1). Auf die Substratvorbehandlung wurde daher verzichtet.

Die Hauptaromakomponenten der beiden Biotransformationen waren identisch (Linalool und 2-Phenylethanol) und auch deren FD-Faktoren waren gleich (Tab. 3.12, Tab. 3.16). Der Unterschied in den berechneten Aromawerten ergibt sich durch Unterschiede in den Konzentrationen der Aromastoffe.

Durch Umstellung auf unbehandelte Karottenschalen wurde die Konzentration von 2-Phenylethanol im Unterschied zur Biotransformation von lyophilisierten Karottenschalen leicht verringert. Die Konzentrationen von Linalool, (*E*)-Geraniol und β -Ionon wurden in den Biotransformationen unbehandelter Karottenschalen leicht gesteigert.

4.4.1 Optimierung der Medienzusammensetzung

Bei der Optimierung des zum Screening eingesetzten Mediums M1 war der wichtigste Aspekt ebenfalls der gleichbleibende Geruchseindruck. Neben der Kostenreduzierung wäre eine gleichzeitige Steigerung der Konzentrationen der Aromastoffe ideal.

In Medium M1 wurden dem Basidiomyceten in Form von Natriumaspartat und Ammoniumnitrat – neben dem zugesetzten Substrat – eine organische und eine anorganische Stickstoffquelle zur Verfügung gestellt. Die einzige Kohlenhydratquelle stellte das jeweils zugesetzte Substrat dar. Der Ersatz der Kohlenhydratquelle durch das Substrat sollte den Pilz dazu zwingen, seinen Kohlenhydratbedarf über die Metabolisierung des Substrats zu decken.

Die Untersuchungen der unterschiedlichen Medien (M3 bis M8, Tab. 3.18) zeigten anhand des Geruchseindrucks, dass auf eine zusätzliche Stickstoffquelle und auf den Zusatz der Vitamin-Lösung komplett verzichtet werden kann und der Pilz in der Lage war, seinen Bedarf an Kohlenstoff- und Stickstoff durch das Substrat zu decken.

Der Verlauf des pH-Werts der Biotransformation und des Pilz-Blindwertes waren in Medium M1 (Abb. 3.7) und M9 (Abb. 3.13) sehr ähnlich. In beiden Medien fiel der pH-Wert der beiden Kulturen deutlich. Der pH-Wert des Pilz-Blindwertes sank in

beiden Medien auf einen Wert um 2. Von einer Beeinflussung des Pilzwachstums im optimierten Medium M9 war daher nicht auszugehen.

Bei gleichbleibendem Geruchseindruck der Biotransformation in Medium M9 (Tab. 3.20) traten bei den Konzentrationen der identifizierten Verbindungen leichte Unterschiede zu der Biotransformation in Medium M1 auf (Tab. 3.12, Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Vergleich der Gehalte [$\mu\text{g L}^{-1}$ Kulturüberstand] der olfaktometrisch detektierten Verbindungen in der Biotransformation im Medium M1 (Konz. Biotransformation M1) und der Biotransformation im optimierten Medium M9 (Konz. Biotransformation M9)

Substanz	Konz. Biotransformation M1 [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Konz. Biotransformation M9 [$\mu\text{g L}^{-1}$]
Essigsäure	1.920 \pm 90	1.600 \pm 120
Linalool	70 \pm 10	100 \pm 7
(E)-Geraniol	130 \pm 40	60 \pm 0
2-Phenylethanol	560 \pm 40	530 \pm 3
β -Ionon	5 \pm 0	10 \pm 0

Dass der Geruchseindruck trotz der Konzentrationsunterschiede von den Prüfern als gleich beurteilt wurde, kann darauf zurückzuführen sein, dass die Aromawerte der Verbindungen mit einem Aromawert größer bzw. gleich eins in allen Biotransformationen über einem Wert von eins lagen. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass der Mensch nicht in der Lage ist, mehr als drei bis vier Aromastoffe in einer Mischung zu unterscheiden (Grosch 2001; Laing 1994) und dass Veränderungen in Aromamischungen durch Weglassen einer Komponente nur schwer erkannt werden (Laska und Hudson 1992).

Tab. 4.6 stellt die Kosten für das Medium M1 und das optimierte Kulturmedium M9 vergleichend gegenüber. Zugrunde gelegt wurden dabei die Kosten für Laborchemikalien in der in Tab. 2.1 angegebenen Qualität. Durch den Verzicht auf die zusätzlichen Stickstoffquellen und die Vitamin-Lösung wurde eine signifikante Senkung der Kosten des Kulturmediums von circa 98% erzielt. Auf die Zugabe der Spurenelementlösung konnte jedoch nicht verzichtet werden. Die in der Spurenelementlösung enthaltenen Fe^{3+} -Ionen werden z. B. zum Abbau von Lignocellulosen durch die

Fenton-Reaktion (Fe^{3+} wird zur Regeneration von Fe^{2+} benötigt) benötigt (Arantes *et al.* 2011).

Tab. 4.6: Kostenvergleich zwischen Medium M1 und optimiertem Kulturmedium M9 für die Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos*

Medium M1	Dosierung L ⁻¹	Preis kg ⁻¹ [€]	Preis L ⁻¹ Medium [€]
Natriumaspargat-Monohydrat	6,2 g	310,10	1,92
Ammoniumnitrat	2,4 g	23,84	0,06
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g	27,40	0,04
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g	13,05	0,01
Spurenelementlösung	1,0 mL		
BME-Lösung	10,0 mL	111,60	1,12
		Summe	3,15

Medium M9	Dosierung L ⁻¹	Preis kg ⁻¹ [€]	Preis L ⁻¹ Medium [€]
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g	27,40	0,04
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g	13,05	0,01
Spurenelementlösung	1,0 mL		
		Summe	0,05

4.4.2 Dotierung mit L-Phenylalanin

Mikroorganismen, insbesondere Hefen, sind in der Lage 2-Phenylethanol über ihren normalen Stoffwechsel zu bilden, wobei die Gehalte sehr niedrig bleiben (Etschmann *et al.* 2002). Nach den Arbeiten von Ehrlich (1907) zur Aminosäuregärung ist der allgemein akzeptierte Biosyntheseweg (Abb. 4.3) die Transaminierung von L-Phenylalanin (1) zu Phenylpyruvat (2) mit anschließender Decarboxylierung zu Phenylacetaldehyd (3) gefolgt von der Reduktion zu 2-Phenylethanol (4).

Eine Dotierung der Biotransformation mit L-Phenylalanin sollte demnach eine Steigerung der 2-Phenylethanol-Konzentration herbeiführen, wenn der Biosyntheseweg durch *W. cocos* nach Abb. 4.3 verläuft.

L-Phenylalanin kann jedoch auch über den Zimtsäure-Weg zu β -Ketoacid abgebaut werden und dann in den Citratzyklus einfließen (Etschmann *et al.* 2002). Welcher der beiden Abbauewege eingeschlagen wird, ist abhängig von der Stickstoffquelle im Medium. Stellt die Aminosäuren die einzige Stickstoffquelle dar, so wird der Abbau nach Ehrlich gegenüber dem Zimtsäure-Weg bevorzugt (Albertazzi *et al.* 1994). Eine komplette Umsetzung von L-Phenylalanin zu 2-Phenylethanol ist jedoch auch unter

optimalen Bedingungen nicht möglich, da geringe Mengen immer über den Zimtsäure-Weg abgebaut werden (Etschmann *et al.* 2002). Im verwendeten Medium stand neben der Aminosäure noch das Substrat als Stickstoffquelle zur Verfügung. Für das Substrat (unbehandelte Karottenschalen) wurde ein Rohproteingehalt von $9,2 \text{ g (100 g)}^{-1}$ bzw. ein Stickstoffgehalt von $1,5 \text{ g (100 g)}^{-1}$ Trockenmasse bestimmt. In einer Submerskultur mit einer Einwaage von 27,6 g unbehandelter Karottenschalen standen dem Mikroorganismus neben der dotierten Aminosäure ungefähr 36 mg Stickstoff zur Verfügung. Der Abbau von L-Phenylalanin erfolgte demnach über den Ehrlich- und Zimtsäure-Weg. 6% des zugesetzten L-Phenylalanins wurden in der Biotransformation zu 2-Phenylethanol und 27% zu Benzylalkohol umgesetzt (3.6.3). Daraus resultierte eine Steigerung der 2-Phenylethanol-Konzentration um 493% und eine Konzentrationssteigerung von 768% für Benzylalkohol. Da auf Grund der Stickstoffquellen L-Phenylalanin über Zimtsäure- und Ehrlich-Weg abgebaut wurde, ist davon auszugehen, dass unter den gegebenen Bedingungen der Zimtsäureweg bevorzugt wird.

Im Vergleich zu *W. cocos* liegt der Umsatz von L-Phenylalanin zu 2-Phenylethanol durch *A. niger* (Stamm CMICC 298302 (Wildtyp)) in einem Medium bestehend aus 60 g L^{-1} Glucose, 5 g L^{-1} Hefeextrakt und 6 g L^{-1} L-Phenylalanin mit 31% (Lomascolo *et al.* 2001) viel höher als in der vorliegenden Arbeit.

Auf weitere Dotierungen mit L-Phenylalanin wurde auf Grund der niedrigen Umsatzrate in Bezug auf den interessanteren Aromastoff 2-Phenylethanol verzichtet.

Ab einer Konzentration von 2 g L^{-1} ist 2-Phenylethanol dafür verantwortlich, dass *Kluyveromyces marxianus* das Wachstum einstellt, wohingegen *Saccharomyces cerevisiae* eine Konzentration bis zu 4 g L^{-1} toleriert (Stark 2001). Für *W. cocos* sind in der Literatur bisher keine 2-Phenylethanol-Gehalte beschrieben, die zu einer Beeinflussung des Wachstums führen. Eine Beeinflussung des Pilzwachstums oder eine Verringerung der Enzymaktivität durch Produkthemmung kann nicht ausgeschlossen werden. Bei weiteren Optimierungen bezüglich der 2-Phenylethanol-Konzentration müsste die maximal vom Mikroorganismus tolerierte Konzentration berücksichtigt werden. Eine Möglichkeit die Akkumulation von Metaboliten zu vermeiden, kann durch eine Entfernung aus dem Reaktionsansatz z. B. durch Pervaporation oder Adsorption erreicht werden. Etschmann *et al.* (2002) geben einen Über-

blick über die Methoden, die in Bezug auf Aromastoffe zur *in-situ* Produktentfernung angewendet werden können.

4.5 Maßstabsvergrößerung

Der Einsatz in der Industrie verlangt nach Produktionen in Bioreaktoren mit mehreren Kubikmetern Füllvolumen. Die durch die Rührwerkzeuge der Bioreaktoren ausgelösten Scherkräfte können die Mikroorganismen schädigen und dadurch die Expression gesuchter Enzyme unterdrücken oder verringern (Janshekar und Fiechter 1988). Die Reaktion der Pilze auf die im Reaktor herrschenden Scherkräfte ist Stamm- oder Speziesspezifisch (Nüske *et al.* 2002). Die Maßstabsvergrößerung wurde für die Biotransformation von unbehandelten Karottenschalen durch *W. cocos* im optimierten Medium untersucht.

Der Geruchseindruck der Biotransformation im 7,5-Liter-Fermenter mit einem Medienvolumen von 3 L an Kulturtag 6 war identisch mit den Biotransformationen im 250-mL-Schüttelkolben. Durch die Kultivierung im Bioreaktor wurde die Konzentration von Linalool um den Faktor 2 und die Konzentration von (*E*)-Geraniol um den Faktor 4 im Vergleich zur Schüttelkolbenkultur gesteigert. Lediglich die Konzentration von 2-Phenylethanol sank von $530 \mu\text{g L}^{-1}$ auf $480 \mu\text{g L}^{-1}$. Die Biotransformation konnte ohne Beeinflussung bzw. Veränderung der Kulturbedingungen und des Geruchseindrucks vom Schüttelkolbenmaßstab in einen 7,5-L-Fermenter überführt werden. Die Ergebnisse der Maßstabsvergrößerung um den Faktor 30 sprechen dafür, dass die Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* auch auf noch größere Volumina übertragen werden kann.

4.6 β -Carotin-Abbau durch MsP1

Arbeiten von Zelena *et al.* (2009) zeigten, dass die „*DyP-type*“ Peroxidase MsP1 aus *M. scorodoni* mit Wasserstoffperoxid als Cofaktor β -Carotin und die Apocarotinale β -Apo-8'-carotinal und β -Apo-12'-carotinal zu β -Ionon, 5,6-Epoxy- β -ionon, 2,6,6-Trimethylcyclohexanon, β -Cyclocitral und Dihydroactinidiolid abbaut. Nach Quantifizierung der entstandenen Norisoprenoiden ergab sich eine Bilanzlücke von 80%. In

der vorliegenden Arbeit wurden die Transformationen und Extraktionen in einem geschlossenen System durchgeführt, um Verluste an flüchtigen Verbindungen zu vermeiden. Der enzymatische Abbau von β -Carotin im geschlossenen System sowie die Erfassung der gebildeten flüchtigen Verbindungen mittels HS-SPME wurden vorher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Nach einer Transformationszeit von 12 min waren 97% des zugesetzten β -Carotins durch MsP1 abgebaut. Die Ausbeute an Norisoprenoiden lag bei 11 mol%. Die Erhöhung der Extraktionstemperatur auf 75 °C führte dazu, dass 3,8 mol% mehr β -Ionon und β -Cyclocitral erfasst wurden und auch 5,6-Epoxy- β -ionon und Dihydroactinidiolid gaschromatographisch-massenspektrometrisch detektiert wurden. Eine Verlängerung der Extraktionsdauer auf 60 min oder 120 min führte lediglich zu einer Steigerung von 0,7 mol% des Gesamtumsatzes zu Norisoprenoiden, so dass davon auszugehen ist, dass die Gleichgewichtseinstellung zwischen dem Analyten im Kopfraum und der Faser bereits nach 30 min erreicht wurde. Eine Verlängerung der Transformationszeit auf 60 min, 120 min und 180 min wurde untersucht, um zu überprüfen, ob gebildete Apocarotinale zu flüchtigen Verbindungen abgebaut werden. Eine Transformationszeitverlängerung führte jedoch nicht zu einer Steigerung der Ausbeute an Norisoprenoiden. Gründe dafür können sein, dass MsP1 nicht mehr aktiv vorlag oder durch eine zu hohe Konzentration der Abbauprodukte gehemmt wurde. Ein Verlust an flüchtigen Abbauprodukten, der die Bilanzlücke erklären könnte, wird aufgrund des geschlossenen Reaktionssystems ausgeschlossen. Demnach sollten die nicht-flüchtigen Abbauprodukte die Bilanzlücke schließen.

Der Vergleich der Chromatogramme zeigte, dass die Peakflächen der flüchtigen β -Carotin-Abbauprodukte abhängig von der Konzentration des Emulgators Tween[®]80 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat) waren. Tween[®]80 wird dafür benötigt das hydrophobe β -Carotin in Wasser zu emulgieren. Gleichzeitig werden auch die Abbauprodukte in der wässrigen Lösung emulgiert. Je höher die Tween[®]80-Konzentration ist, desto geringer sind die Peakflächen der β -Carotin-Abbauprodukte. Um den Einfluss des Tweens auf die Extraktion der flüchtigen Verbindungen zu berücksichtigen, wurden die Standardlösungen zur Response-Faktor-Bestimmung mit der entsprechenden Tween[®]80-Konzentration versetzt.

Die Ergebnisse der Umsetzung eines komplexen Substrates – unbehandelte Karottenschalen – mit MsP1 zeigten keine β -Carotin-Abbauprodukte. Die Chromato-

gramme des Blindwerts und der Transformation wiesen keine Unterschiede auf. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass MsP1 alleine nicht in der Lage ist, β -Carotin in komplexen Substraten umzusetzen. Durch Zusatz anderer Enzyme müsste das β -Carotin erst zugänglich gemacht werden, um dann von MsP1 zu den Norisoprenoiden abgebaut zu werden.

Auch andere Inhaltsstoffe der Karottenschalen wurden durch MsP1 nicht abgebaut, so dass für die Umsetzung komplexer Substrate Biotransformationen durch Basidiomyceten besser geeignet sind als Ein-Enzym-Systeme.

5 Ausblick

Die aus den Biotransformationen von Karottenschalen durch *W. cocos* erhaltenen Aromagemische sind prinzipiell zur Aromatisierung von Lebensmitteln oder Kosmetika geeignet. Um jedoch den erhaltenen Extrakt als natürlichen Aromaextrakt bezeichnen und einsetzen zu können, muss die Extraktion der Aromastoffe aus dem Kulturüberstand mit einem anderen Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch erfolgen, da Pentan in Anhang II 88/344/EWG nicht aufgeführt wird.

Durch eine Optimierung der Medienzusammensetzung konnte bereits eine Kostenreduzierung um 98% erreicht werden, die Konzentrationen der gebildeten Aromastoffe wurden dadurch nur minimal verändert. Weitere Versuche (wie z. B. Belichtung, pH-Wert-Anpassung) zur Steigerung der Konzentrationen sollten durchgeführt werden. Dazu sollten z. B. mit Hilfe isotopenmarkierter Präkursoren die Biosynthesewege aufgeklärt werden. Ebenso könnte die Detektion von nicht flüchtigen Abbauprodukten mittels Hochleistungsflüssigchromatographie untersucht werden. Eine Detektion von Apocarotinalen könnte die Bildung der Norisoprenoide – insbesondere von Dihydroactinidiolid – aufklären. Im weiteren Verlauf könnten so gezielte Schritte zur Optimierung erfolgen. Der Kulturüberstand sollte auf die enthaltenen Enzyme hin untersucht werden. Diese können zum einen ebenfalls zur Aufklärung der Synthesewege beitragen und zum anderen für andere Untersuchungen eingesetzt und ihr Potential ausgetestet werden.

Der Versuch der online-Extraktion der Aromastoffe im Kulturkolben sollte weiterentwickelt und wenn möglich als Alternative zur Flüssig-Flüssig-Extraktion etabliert werden. Mögliche Verfahren hierfür wären dynamische Kopfraum-Untersuchungen oder die Festphasenmikroextraktion im Medium der Kultur. In Screenings nach Aromastoffen bzw. flüchtigen Komponenten in Submerskulturen von Basidiomyceten würde eine solche Methode zu einer Zeit- und Chemikaliensparnis führen.

Die Detektion und Identifikation der nicht flüchtigen β -Carotin-Abbauprodukte nach Umsetzung mit MsP1 sollte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie erfolgen.

Durch weiteren Zusatz von MsP1 sollte der Abbau der Apocarotinale zur Steigerung der flüchtigen Norisoprenoide untersucht werden. Des Weiteren sollte überprüft werden ab welcher Konzentration der Norisoprenoide eine Hemmung von MsP1 eintritt. Um eine mögliche Produkthemmung zu verhindern, sollten Verfahren wie die

organophile Pervaporation getestet werden. Der Einsatz von MsP1 zur Gewinnung natürlicher Aromastoffe durch Spaltung von β -Carotin in komplexen Substraten sollte weiter untersucht werden.

6 Literatur

Abbott N, Etievant P, Issanchou S, Langlois D (1993) Critical evaluation of two commonly used techniques for the treatment of data from extract dilution sniffing analysis. *J Agric Food Chem* 41:1698–1703.

Abraham BG, Berger RG (1994) Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *J Agric Food Chem* 42:2344–2348.

Akita O, Ida T, Obata T, Hara S (1990) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* producing a large quantity of β -phenethyl alcohol and β -phenethyl acetate. *J Ferment Bioeng* 69:125–128.

Alasalvar C, Grigor JM, Quantick PC (1999) Method for the static headspace analysis of carrot volatiles. *Food Chem* 65:391–397.

Albertazzi E, Cardillo R, Servi S, Zucchi G (1994) Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. *Biotechnol Lett* 16:491–496.

Arantes V, Milagres AMF, Filley TR, Goodell B (2011) Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:541–555.

Ben Aziz A, Grossmann S, Ascarelli I, Budowski P (1971) Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry* 10:1445–1452.

Berger RG, Krings U, Zorn H (2010) Biotechnological flavour generation. In: Taylor AJ, Linforth RST (Hrsg.) *Food flavour technology*, 2. Aufl. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.; Ames, USA. Seiten 89–126.

Berger RG, Neuhäuser K, Drawert F (1987) Biotechnological production of flavor compounds: III. High productivity fermentation of volatile flavors using a strain of *Ischnoderma benzoinum*. *Biotechnol Bioeng* 30:987–990.

Binder RG, Benson ME, Flath RA (1990) Volatile components of safflower. *J Agric Food Chem* 38:1245–1248.

Blank I (1997) Gas chromatography-olfactometry in food aroma analysis. In: Marsili R (Hrsg.) *Techniques for analyzing food aroma*. Marcel Dekker, New York, USA. Seiten 293–329.

Blank I, Sen A, Grosch W (1992) Potent odorants of the roasted powder and brew of arabica coffee. *Z Lebens Unters Forsch* 195:239–245.

Boa E (2004) Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rom, IT

Böker A, Fischer M, Berger R (2001) Raspberry ketone from submerged cultured cells of the basidiomycete *Nidula niveo-tomentosa*. *Biotechnol Prog* 17:568–572.

Bosser A, Belin JM (1994) Synthesis of β -ionone in an aldehyde/xanthine oxidase/ β -carotene system involving free radical formation. *Biotechnol Prog* 10:129–133.

Bosser A, Paporey E, Belin JM (1995) A simple way to (\pm)-dihydroactinidiolide from β -ionone related to the enzymic co-oxidation of β -carotene in aqueous solution. *Biotechnol Progr* 11:689–692.

Bouws H, Wattenberg A, Zorn H (2008) Fungal secretomes – nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:381–388.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Brock NL, Tudzynski B, Dickschat JS (2011) Biosynthesis of sesqui- and diterpenes by the gibberellin producer *Fusarium fujikuroi*. *ChemBioChem* 12:2667–2676.

Burke CC, Wildung MR, Croteau R (1999) Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13062–13067.

Busmann D, Berger RG (1994) Conversion of myrcene by submerged cultured basidiomycetes. *J Biotechnol* 37:39–43.

Buttery RG, Ling LC (1997) 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine and 2-ethyl-3,6-dimethylpyrazine: odor thresholds in water solution. *Lebensm Wiss Technol* 30:109–110.

Buttery RG, Seifert RM, Guadagni DG, Ling LC (1971) Characterization of additional volatile components of tomato. *J Agric Food Chem* 19:524–529.

Câmara JS, Alves MA, Marques JC (2006) Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in madeira wines. *Anal Chim Acta* 555:191–200.

Cheung PCK (1997) Dietary fibre content and composition of some edible fungi determined by two methods of analysis. *J Sci Food Agric* 73:255–260.

Choi H (2003) Characterization of *Citrus unshiu* (*C. unshiu* Marcov. forma *Miyagawawase*) blossom aroma by solid-phase microextraction in conjunction with an electronic nose. *J Agric Food Chem* 51:418–423.

Chung TY, Eiserich JP, Shibamoto T (1993) Volatile compounds isolated from edible korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). *J Agric Food Chem* 41:1693–1697.

Culleré L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V (2004) Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality spanish aged red wines. *J Agric Food Chem* 52:1653–1660.

Czerny M, Christlbauer M, Christlbauer M, Fischer A, Granvogl M, Hammer M, Hartl C, Hernandez NM, Schieberle P (2008) Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur Food Res Technol* 228:265–273.

Disch A, Rohmer M (1998) On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 168:201–208.

Drawert F, Berger RG, Neuhäuser K (1983) Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms 4. Characterization of the major principles of the odor of *Pleurotus euosmus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 18:124–127.

Dudareva N, Cseke L, Blanc VM, Pichersky E (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *Plant Cell* 8:1137–1148.

Ehrlich F (1907) Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. *Ber Dtsch Chem Ges* 40:1027–1047.

Etschmann MMW, Bluemke W, Sell D, Schrader J (2002) Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:1–8.

Etschmann MMW, Sell D, Schrader J (2005) Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnol Bioeng* 92:624–634.

Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union (26.12.2008) Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 des europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln sowie zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1601/91 des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 2232/96 und (EG) Nr. 110/2008 und der Richtlinie 2000/13/EG.

Fabre CE, Blanc PJ, Goma G (1996) Production of benzaldehyde by several strains of *Ischnoderma benzoinum*. *Sci Aliment* 16:61–68.

Ferreira V, Pet'ka J, Aznar M (2002) Aroma extract dilution analysis. Precision and optimal experimental design. *J Agric Food Chem* 50:1508–1514.

Fiedler K, Schütz E, Geh S (2001) Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *Int J Hyg Environ Health* 204:111–121.

Fischer KH, Grosch W (1987) Volatile compounds of importance in the aroma of mushrooms (*Psalliota bispora*). LWT - Food Sci Technol 20:233–236.

Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (2009) Nootkatone - A biotechnological challenge. Appl Microbiol Biotechnol 83:35–41.

Frazzetto G (2003) White biotechnology. EMBO Rep 4:835–837.

Fritsch HT, Schieberle P (2005) Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a bavarian pilsner-type beer. J Agric Food Chem 53:7544–7551.

Gallois A, Gross B, Langlois D, Spinnler H, Brunerie P (1990) Influence of culture conditions on production of flavour compounds by 29 ligninolytic basidiomycetes. Mycol Res 94:494–504.

Ginns JH (1984) New names, new combinations and new synonymy in the Corticiaceae, Hymenochaetaceae and Polyporaceae. Mycotaxon 21:325–333.

Grosch W (2001) Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. Chem Senses 26:533–545.

Habu T, Flath RA, Mon TR, Morton JF (1985) Volatile components of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*). J Agric Food Chem 33:249–254.

Heatherbell DA, Wrolstad RE, Libbey LM (1971) Carrot volatiles. 1. Characterization and effects of canning and freeze drying. J Food Sci 36:219–224.

Ho CW, Aida WMW, Maskat MY, Osman H (2007) Changes in volatile compounds of palm sap (*Arenga pinnata*) during the heating process for production of palm sugar. Food Chem 102:1156–1162.

Högnadóttir Á, Rouseff RL (2003) Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 998:201–211.

Hülsdau B (2007) Oxidativer Abbau von Carotinoiden durch Pilzenzyme. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover

Iijima Y, Gang DR, Fridman E, Lewinsohn E, Pichersky E (2004) Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. Plant Physiol 134:370–379.

Janshekar H, Fiechter A (1988) Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors. J Biotechnol 8:97–112.

Janssens L, de Pooter HL, Schamp NM, Vandamme EJ (1992) Production of flavours by microorganisms. Process Biochem 27:195–215.

Jeleń HH (2003) Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Lett Appl Microbiol* 36:263–267.

Jirovetz L, Smith D, Buchbauer G (2002) Aroma compound analysis of *Eruca sativa* (*Brassicaceae*) SPME headspace leaf samples using GC, GC-MS, and olfactometry. *J Agric Food Chem* 50:4643–4646.

Junker HP (2004) Einsatzmöglichkeiten der Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) zum Nachweis von forensisch-toxikologisch relevanten Verbindungen in biologischen Matrices. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Kanasawud P, Crouzet JC (1990) Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 1. β -Carotene degradation. *J Agric Food Chem* 38:237–243.

Karagül-Yüceer Y, Vlahovich KN, Drake M, Cadwallader KR (2003) Characteristic aroma components of rennet casein. *J Agric Food Chem* 51:6797–6801.

Kaspera R, Krings U, Pescheck M, Sell D, Schrader J, Berger RG (2005) Regio- and stereoselective fungal oxyfunctionalisation of limonenes. *Z Naturforsch* 60c:459–466.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*. CAB International. Wallingford, UK.

Kjeldahl J (1883) Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Fresenius J Anal Chem* 22:366–382.

Kjeldsen F, Christensen LP, Edelenbos M (2001) Quantitative analysis of aroma compounds in carrot (*Daucus carota* L.) cultivars by capillary gas chromatography using large-volume injection technique. *J Agric Food Chem* 49:4342–4348.

Kjeldsen F, Christensen LP, Edelenbos M (2003) Changes in volatile compounds of carrots (*Daucus carota* L.) during refrigerated and frozen storage. *J Agric Food Chem* 51:5400–5407.

Kloer DP, Schulz GE (2006) Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* 63:2291–2303.

Komes D, Ulrich D, Lovric T (2006) Characterization of odor-active compounds in croatian rhine riesling wine, subregion zagorje. *Eur Food Res Technol* 222:1–7.

Kováts E (1958) Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv Chim Acta* 41:1915–1932.

Kreisel H (2005) Liste der ethnomykologisch und biotechnologisch relevanten Pilze – Literatur – Kunst – Volksmedizin – Pharmazie – Techniken – Drogen. *Feddes Repert* 116:339–391.

Krings U, Abraham BG, Berger RG (1995) Plant impact volatiles from higher fungi: a biotechnological perspective. *Perfum Flavor* 20:79–86.

Krings U, Lehnert N, Fraatz MA, Hardebusch B, Zorn H, Berger RG (2009) Autoxidation versus biotransformation of α -pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of α -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. *J Agric Food Chem* 57:9944–9950.

Laing DG (1994) Perceptual odour interactions and objective mixture analysis. *Food Qual Pref* 5:75–80.

Langhoff S (2002) Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover

Laska M, Hudson R (1992) Ability to discriminate between related odor mixtures. *Chem Senses* 17:403–415.

Lee S, Noble AC (2003) Characterization of odor-active compounds in californian chardonnay wines using GC-olfactometry and GC-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 51:8036–8044.

Leffingwell JC, Alford ED (2005) Volatile constituents of perique tobacco. *J Environ Agric Food Chem* 5:899–915.

Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Thibault J, Ceccaldi BC, Brunerie P, Asther M (1996) A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol* 50:107–113.

Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Ibdah M, Meir A, Yosef E, Zamir D, Tadmor Y (2005) Not just colors – carotenoid degradation as a link between pigmentation and aroma in tomato and watermelon fruit. *Trends Food Sci Technol* 16:407–415.

Lichtenthaler HK (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:47–65.

Liu D, Wang F, Yang L, Zheng Y, Liu J (2007) A new cadinane sesquiterpene with significant anti-HIV-1 activity from the cultures of the basidiomycete *Tyromyces chioneus*. *J Antibiot* 60:332–334.

Lomascolo A, Lesage-Meessen L, Haon M, Navarro D, Antona C, Faulds C, Marcel A (2001) Evaluation of the potential of *Aspergillus niger* species for the bioconversion of L-phenylalanine into 2-phenylethanol. *World J Microbiol Biotechnol* 17:99–102.

Longo MA, Sanromán MA (2006) Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol Biotechnol* 44:335–353.

- Luff G, Schoorl W** (1929) Suiker titratie. Chem Weekblad 26:130–134.
- Marschall L** (2000) Im Schatten der chemischen Synthese. Campus. Frankfurt, New York, USA. Seite 274
- Matissek R, Steiner G, Fischer M** (2010a) Aminosäuren, Peptide, Proteine und Nucleinsäuren. In: Matissek R, Steiner G, Fischer M (Hrsg.) Lebensmittelanalytik, 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg. Seiten 85–126.
- Matissek R, Steiner G, Fischer M** (2010b) Kohlenhydrate. In: Matissek R, Steiner G, Fischer M (Hrsg.) Lebensmittelanalytik, 4. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg. Seiten 127–172.
- Milagres AMF, Arantes V, Medeiros CL, Machuca A** (2002) Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. Enzyme Microb Technol 30:562–565.
- Milagres AMF, Sales RM** (2001) Evaluating the basidiomycetes *Poria medula-panis* and *Wolfiporia cocos* for xylanase production. Enzyme Microb Technol 28:522–526.
- Mordi RC, Walton JC, Burton GW, Hughes L, Ingold KU, Lindsay DA, Moffatt DI** (1993) Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. Tetrahedron 49:911–928.
- Nacke C, Hüttmann S, Etschmann MMW, Schrader J** (2012) Enzymatic production and in situ separation of natural β -ionone from β -carotene. J Ind Microbiol Biotechnol online verfügbar unter DOI: 10.1007/s10295-012-1182-1. Seite 1–8.
- Nishimura O** (1995) Identification of the characteristic odorants in fresh rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution analysis and modified multidimensional gas chromatography-mass spectroscopy. J Agric Food Chem 43:2941–2945.
- Nüske J, Scheibner K, Dornberger U, Ullrich R, Hofrichter M** (2002) Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. Enzyme Microb Technol 30:556–561.
- Olson JA, Hayaishi O** (1965) The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. Proc Natl Acad Sci 54:1364–1370.
- Pennarun A, Prost C, Demaimay M** (2002) Identification and origin of the character-impact compounds of raw oyster *Crassostrea gigas*. J Sci Food Agric 82:1652–1660.
- Pino JA, Mesa J, Muñoz Y, Martí MP, Marbot R** (2005) Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. J Agric Food Chem 53:2213–2223.
- Portz A** (2012) Enzymatische Umsetzung von β,β -Carotin zu Norisoprenoiden im geschlossenen System – Bilanzierung des Umsatzes mittels Kopfraumanalyse. Masterthesis, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Priestao HA, van Baren CM, Di Leo Lira P, Coussio JD, Bandoni AL (2003) Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. *JPhytochemistry* 63:221–225.

Pühse M, Szweda RT, Ma Y, Jeworrek C, Winter R, Zorn H (2009) *Marasmius scorodonius* extracellular dimeric peroxidase – Exploring its temperature and pressure stability. *BBA-Proteins Proteom* 1794:1091–1098.

Rani P, Kalyani N, Prathiba K (2008) Evaluation of lignocellulosic wastes for production of edible mushrooms. *Appl Biochem Biotech* 151:151–159.

Rat der Europäischen Gemeinschaft (24.04.2010) Richtlinie des Rates vom 13. Juni 1988 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über Extraktionslösungsmittel, die bei der Herstellung von Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten verwendet werden. 88/344/EWG, vom 24.06.1988.

Reid ID, Seifert KA (1982) Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration, and lignin degradation by white-rot fungi. *Can J Bot* 60:252–260.

Reif C, Arrigoni E, Neuweiler R, Baumgartner D, Nyström L, Hurrell RF (2012) Effect of sulfur and nitrogen fertilization on the content of nutritionally relevant carotenoids in spinach (*Spinacia oleracea*). *J Agric Food Chem* 60:5819–5824.

Rothe M, Thomas B (1963) Aromastoffe des Brotes. *Z Lebens Unters Forsch* 119:302–310.

Ryvarden L, Gilbertson RL (1984) Type studies in the Polyporaceae 15. *Mycotaxon* 19:137–144.

San-Juan F, Pet'ka J, Cacho J, Ferreira V, Escudero A (2010) Producing headspace extracts for the gas chromatography-olfactometric evaluation of wine aroma. *Food Chem* 123:188–195.

Scheibner M (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover

Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtze M, de Boer L, Berger RG, Zorn H (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade β -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1241–1250.

Schieberle P (1995) New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In: Gaonkar AG (Hrsg.) *Characterization of food: Emerging methods*. Elsevier, Amsterdam, NL; New York, USA. Seiten 403–431.

Schieberle P, Grosch W (1988) Identification of potent flavor compounds formed in an aqueous lemon oil/citric acid emulsion. *J Agric Food Chem* 36:797–800.

Schmidt CO, Bouwmeester HJ, Franke S, König WA (1999) Mechanismus of the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*. *Chirality* 11:353–362.

Schmidt H, Kurtzer R, Eisenreich W, Schwab W (2006) The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *J Biol Chem* 281:9845–9851.

Schoorl N (1929) Zucker-Titration. *Z Lebens Unters Forsch* 57:566–576.

Schuh C, Schieberle P (2006) Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from darjeeling black tea: quantitative differences between tea leaves and infusion. *J Agric Food Chem* 54:916–924.

Schwartz SH, Qin X, Loewen MC (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem* 279:46940–46945.

Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* 276:25208–25211.

Setzer WN, Noletto JA, Lawton RO (2006) Chemical composition of the floral essential oil of *Randia matudae* from Monteverde, Costa Rica. *Flavour Fragr J* 21:244–246.

Soria AC, Sanz J, Villamiel M (2008) Analysis of volatiles in dehydrated carrot samples by solid-phase microextraction followed by GC-MS. *J Sep Sci* 31:3548–3555.

Souci SW, Fachmann W, Kraut H, Kirchhoff E (2008) Food composition and nutrition tables. MedPharm Scientific Publishers; CRC Press. Stuttgart, Boca Raton, USA. Seiten 772–773

Sprecher E (1959) Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* 53:565–574.

Stark D (2001) Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by "*Saccharomyces cerevisiae*". Dissertation, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH.

Steliopoulos P, Mosandl A (2001) Electron impact-induced fragmentation of the sesquiterpene germacrene D. *Eur J Mass Spectrom* 7:503–508.

Stentelaire C, Lesage-Meessen L, Oddou J, Bernard O, Bastin G, Ceccaldi BC, Asther M (2000) Design of a fungal bioprocess for vanillin production from vanillic acid at scalable level by *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biosci Bioeng* 89:223–230.

Sun T, Simon PW, Tanumihardjo SA (2009) Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors. *J Agric Food Chem* 57:4142–4147.

Szafranek B, Chrapkowska K, Pawińska M, Szafranek J (2005) Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. *J Agric Food Chem* 53:2817–2822.

Tandon KS, Baldwin EA, Shewfelt RL (2000) Aroma perception of individual volatile compounds in fresh tomatoes (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) as affected by the medium of evaluation. *Postharvest Biol Technol* 20:261–268.

Tellez MR, Canel C, Rimando AM, Duke SO (1999) Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochemistry* 52:1035–1040.

Ullrich F, Grosch W (1987) Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z Lebens Unters Forsch* 184:277–282.

Urlacher VB, Makhsumkhanov A, Schmid RD (2006) Biotransformation of β -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:53–59.

Waché Y, Bosser-DeRatuld A, Belin JM (2002) Production of aroma compounds by enzymatic cooxidation of carotenoids. In: Winterhalter P, Rouseff RL (Hrsg.) Carotenoid-derived aroma compounds. Bd. 802. American Chemical Society, Washington, USA. Seiten 102–113.

Wang X, Sun X, Liu H, Ma Z (2010) Carrot fiber. *Shipin Gongye Keji* 31:81–83, 87.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Hrsg.) PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, USA. Seiten 315–322.

Widder S, Grosch W (1994) Study on the cardboard off-flavour formed in butter oil. *Z Lebens Unters Forsch* 198:297–301.

Winterhalter P, Rouseff RL (2002) Carotenoid-derived aroma compounds: An introduction. In: Winterhalter P, Rouseff RL (Hrsg.) Carotenoid-derived aroma compounds. Bd. 802. American Chemical Society, Washington, USA. Seiten 1–17.

Wolf FA (1922). The fruiting stage of the Tuckahoe, *Pachyma cocos*. *J Elisha Mitchell Sci Soc* 38:127–138.

Zelena K, Hardebusch B, Hülsdau B, Berger RG, Zorn H (2009) Co-oxidation of β -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *J Agric Food Chem* 57:9951–9955.

Zorn H, Fischer-Zorn M, Berger RG (2003) A labeling study to elucidate the biosynthesis of 4-(4-hydroxyphenyl)-butan-2-one (raspberry ketone) by *Nidula niveo-tomentosa*. *Appl Environ Microbiol* 69:367–372.

Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Berger RG (2003a) Cleavage of β,β -carotene to flavor compounds by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:331–336.

Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Nimt M, Berger RG (2003b) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β -carotene to flavor compounds. *Biol Chem* 384:1049–1056.

7 Anhang

7.1 Biotransformation von Zitruspellets durch *W. cocos*

Die Detektion und die vorläufige Identifizierung der aromaaktiven Verbindungen (Tab. 3.8, Tab. 3.9) erfolgte nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (2.9.1) gaschromatographisch mittels GC-FID-O (2.10.1, Tab. 2.12) und GC-MS auf polaren Trennphasen (2.10.2, Tab. 2.13). Durch Vergleich der Retentionsindizes nach Kováts (2.10.4) sowie der Massenspektren der zugeordneten Probenpeaks mit dem von Referenzsubstanzen wurde auf bestimmte Verbindungen geschlossen.

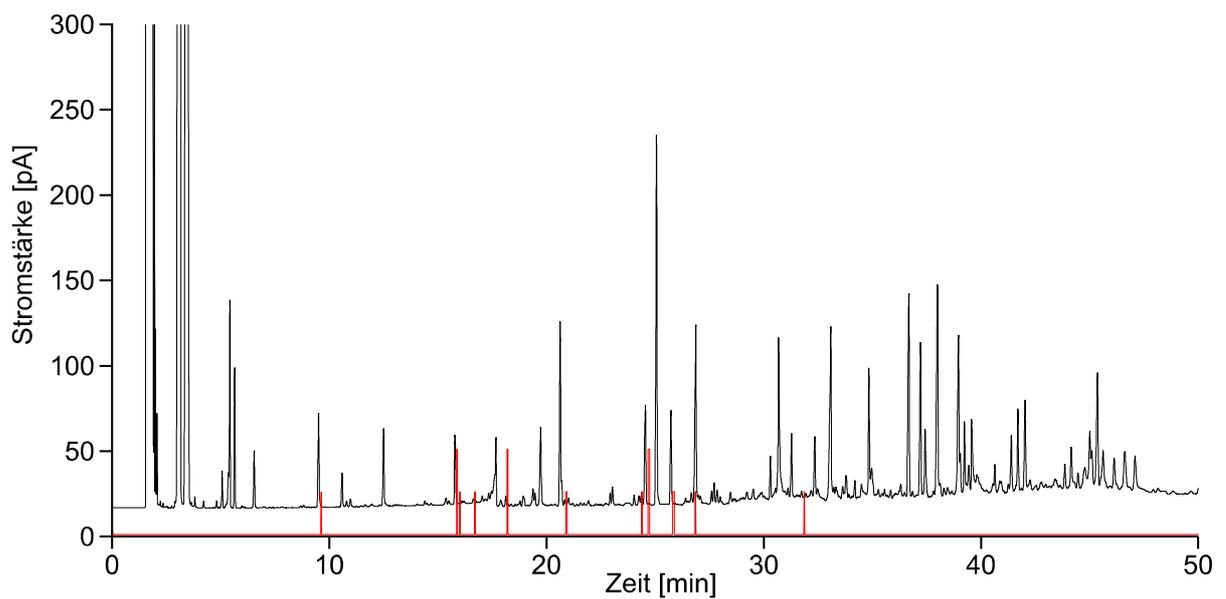


Abb. 7.1: GC-FID-O-Chromatogramm der Biotransformation von Zitruspellets durch *W. cocos* (Kulturtag 8) mit FID- (schwarz) und ODP-Spur (rot)

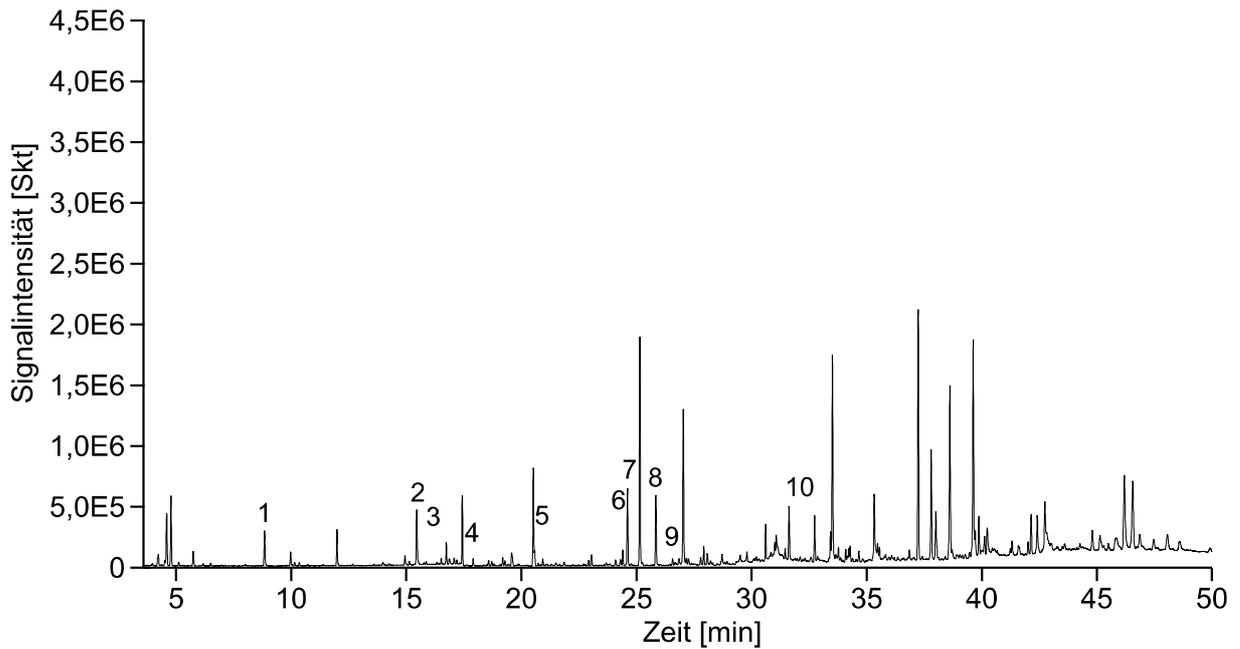


Abb. 7.2: GC-MS-Chromatogramm der Biotransformation von Zitruspellets durch *W. cocos* (Kulturtag 8)

Tab. 7.1: Aromaaktive Substanzen aus der Biotransformation von Zitruspellets durch *W. cocos* mit Kováts-Indizes (KI) auf einer HP-Innowax; n.b.: keine sichere Zuordnung zu einer Struktur möglich

#	Geruchseindruck	KI GC-O	KI GC-MS	Strukturvorschlag	Geruch Lit.
1	muffig	1196	-	n.b.	
2	Essig	1442	1449	Essigsäure	Essig ¹
3	pilzig, muffig	1477	-	n.b.	
4	blumig, zitronig	1540	1547	Linalool	blumig ²
5	muffig, stinkig	1667	-	n.b.	
6	leicht Kräuter	1830	-	n.b.	
7	süß, blumig, Veilchen	1835	1843	(<i>E</i>)-Geraniol	Rose, Geranie ²
8	süß, blumig, Honig	1893	1900	2-Phenylethanol	Rose ³
9	leicht Orange	1952	-	n.b.	
10	rauchig	2179	-	n.b.	

¹(Culleré *et al.* 2004), ²(Högnadóttir und Rouseff 2003), ³(San-Juan *et al.* 2010)

7.2 Maßstabsvergrößerung der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W.cocos* in Medium M9

7.2.1 Kultur- und Geräteparameter

pH-Wert, Rührerdrehzahl, Belüftung und Temperatur wurden über den Kulturverlauf der Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch *W. cocos* im 7,5-L-Fermenter aufgezeichnet (Abb. 7.3).



Abb. 7.3. Kultur- und Geräteparameter über den Kulturverlauf (pH-Wert = grün, Rührerdrehzahl = rot, Temperatur = gelb und Luftzufuhr = rosa) im 7,5-L-Fermenter

7.3 Screeningergebnisse

7.3.1 Carotinoidreiche Substrate

Die Geruchseindrücke (Tab. 7.2 bis Tab. 7.28) über den Kulturverlauf wurden gemäß 2.7.1 bestimmt.

Tab. 7.2: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen durch *B. adusta*

Kultur	Tag 2	Tag 5	Tag 6
Biotransformation KS	leicht fruchtig, Holz	chlorig, stechend	chlorig, muffig

Tab. 7.3: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *C. lignatilis*

Kultur	Tag 2	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	Karotte, Plastik	Kartoffel, Brot, Stärke	Karotte, Terpentin, Holz
Biotransformation BS	frisches Heu, Gras, Spinat	Spinat, frischer Grasschnitt	grüner Tee, Heu

Tab. 7.4: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *C. passeckerianus*

Kultur	Tag 2	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	gäriges Obst, Alkohol	erdig, unangenehm	Keller, chlorig, Schimmel
Biotransformation BS	stechend, Grasschnitt	Ammoniak, gäriges Gras	Silage, Ammoniak

Tab. 7.5: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *C. helenae*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	süßlich, dumpf	Champignon, muffig, staubig	Terpentin, holzig, erdig, muffig
Biotransformation BS	leicht fruchtig, Zitrone, Heu	Gras, Spinat	Heu

Tab. 7.6: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *G. applanatum*

Kultur	Tag 2	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	angenehm. Eistee, Karotte	Tee	leicht Karotte, leicht chlorig
Biotransformation BS	warmes, frisches Heu	Heu, Tee	Heu, chlorig, Plastik

Tab. 7.7: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *H. capnoides*

Kultur	Tag 4	Tag 6
Biotransformation KS	Klebstoff, würzig, pfeffrig	Klebstoff, süßlich
Biotransformation BS	Gras, Heu, muffig	Gras, Heu, Tee

Tab. 7.8: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *I. benzoinum*

Kultur	Tag 2	Tag 6	Tag 8
Biotransformation KS	Kleber, Kunststoff, Knete, süß	Marzipan	staubig, muffig, süß
Biotransformation BS	Spinat, frisches Gras	Rucola	Heu, Stall

Tab. 7.9: Geruchseindrücke der Biotransformation von Blattspinat durch *K. mutabilis*

Kultur	Tag 2	Tag 5	Tag 7
Biotransformation BS	Spinat, frisches Heu, Gras	Spinat, Gras	vergorenes Heu, Gras

Tab. 7.10: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *L. edodes*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	süßlich, stechend, Karotte	gäriger, Apfel, Streuobst	gäriges Obst, staubig
Biotransformation BS	stechend, gäriges Gras	gäriges Gras, Kompost	gäriges Gras

Tab. 7.11: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *L. squarrosulus*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 7
Biotransformation KS	Karotte, Gras- und Blumenschnitt	Alkohol, dumpf, süß	pfeffrig, staubig
Biotransformation BS	Spinat, grün, Gras, Heu	Spinat, grün, herb	chlorig, Plastik. modrig

Tab. 7.12: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *M. cohortalis*

Kultur	Tag 2	Tag 7
Biotransformation KS	Knete, fruchtig, Kunststoff	Kunststoff
Biotransformation BS	süß, geröstet, Gras	staubig, Spinat, beißend

Tab. 7.13: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen durch *M. scorodoni*

Kultur	Tag 2	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	süß, Karotte	süß, Karotte, muffig	Anis, süß

Tab. 7.14: Geruchseindrücke der Biotransformation von Blattspinat durch *N. niveo-tomentosa*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation BS	Spinat, Gras	vergorenes Gras, süß, Kompost	nasses Gras

Tab. 7.15: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *P. serotinus*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 8
Biotransformation KS	Alkohol, Karotte	Pilz, Karotte	nussig, staubig
Biotransformation BS	Gras, Spinat	Spinat, Kürbis, Heu	frischer Grasschnitt

Tab. 7.16: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen durch *P. chrysosporium*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	Kräuter, gebrannte Nüsse	Karotte, neutral	neutral, Pfefferminzbonbon

Tab. 7.17: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *P. eous*

Kultur	Tag 5	Tag 7	Tag 9
Biotransformation KS	staubig, Heu, Holz	Anis, Pilz, Karotte	staubig, Erde, Keller
Biotransformation BS	Spinat, Grasschnitt	stechend, gäriges Gras, Ammoniak	gäriges Gras

Tab. 7.18: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *P. eryngii*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 7
Biotransformation KS	süß, Kunststoff, Knete, Anis	süß, Knete, Kunststoff, staubig	Plastik, staubig, stechend
Biotransformation BS	Spinat, staubig, Heu	herb-würzig, alter Tee	gäriges Gras, Heu

Tab. 7.19: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen durch *P. ostreatus*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Biotransformation KS	Karotte, fruchtig, süß	Anis, süß	süß, fruchtig, Honig

Tab. 7.20: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *P. sapidus*

Kultur	Tag 2	Tag 6	Tag 8
Biotransformation KS	Alkohol, fruchtig, Menthol	Urin, Kunststoff	Rauch, Lagerfeuer, leicht fruchtig, Himbeere
Biotransformation BS	süß, Grasschnitt	gäriges Gras, Heu	-

Tab. 7.21: Geruchseindrücke der Biotransformation von Blattspinat durch *P. melanopus*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation BS	Spinat, warmes Gras	Gras, Heu, Stall	Spinat, staubig, süß

Tab. 7.22: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen durch *P. sp*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 9
Biotransformation KS	Karotte, süß, angenehm, Pfefferminze	Karotte, Minze	Karotte, Rauch, Tabak	Karotte, kalter Rauch

Tab. 7.23: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *P. caesia*

Kultur	Tag 3	Tag 6	Tag 9
Biotransformation KS	süß, Weizenbier	Weizenbier, süßlich, Gebäck	Alkohol, medizinisch
Biotransformation BS	Heu, Pferdemist	muffig, schweißig	Ammoniak, Urin

Tab. 7.24: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *P. sanguineus*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	gärrig, Obst, Wurst	animalisch	Erbrochenes
Biotransformation BS	Spinat, Eber	Wachs, Minze	frisch, Minze, Heu, Spinat

Tab. 7.25: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *T. suaveolens*

Kultur	Tag 2	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	fruchtig, herb, Knete	beißend, Knete, Lösungsmittel	staubig, Holz, Leim
Biotransformation BS	süßlich, Grasschnitt, Stall	Stall, Tee	Kompost, Teer

Tab. 7.26: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *T. versicolor*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	hefig, Alkohol, süß	chlorig, muffig	Pilz, Waldboden, erdig
Biotransformation BS	grüner Tee, Pfefferminze	Tee, Heu, Spinat	Tee, Suppe (Brühe)

Tab. 7.27: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *T. chioneus*

Kultur	Tag 3	Tag 5	Tag 7
Biotransformation KS	süß, Himbeere	Himbeerbrause, fruchtig	sauer, Pilz, gäriges Obst
Biotransformation BS	kalter Spinat, Gras, Heu	Stall, Grasschnitt	Silage, Grasschnitt

Tab. 7.28: Geruchseindrücke der Biotransformation von Karottenschalen und von Blattspinat durch *W. cocos*

Kultur	Tag 3	Tag 6	Tag 11
Biotransformation KS	Zitrone, krautig, fruchtig	Zitrone, krautig, fruchtig	Limette, frisch, minzig
Biotransformation BS	Zitrone, Heu	Zitrone, Gras, Pilz	Heu

7.3.2 Weitere Substrate

Die Geruchseindrücke der Biotransformationen mit den Substraten Sellerietrester, Zwiebschalen, Lauchtreste oder Zitruspellets (Tab. 7.29 bis Tab. 7.35) über den Kulturverlauf wurden analog 2.7.1 bestimmt.

Tab. 7.29: Geruchseindrücke der Biotransformation von Zitruspellets durch *I. benzoinum*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Biotransformation CPP	nasses Holz, Benzaldehyd	chlorig, muffig	chlorig, süßlich, Benzaldehyd

Tab. 7.30: Geruchseindrücke der Biotransformation von Sellerietrester, Zwiebelschalen und von Lauchtrester durch *L. edodes*

Kultur	Tag 1	Tag 3	Tag 5
Biotransformation ST	Sellerie, süß	süß, Kunststoff, dumpf	Sellerie, süß, Plastik
Biotransformation ZS	Zwiebel, rauchig	herzhafte Zwiebelsuppe	Zwiebel, Speck
Biotransformation LT	Zwiebel, Lauch, Heu	Lauch, Zwiebel, Gras	Spinat, Gras, Lauch

Tab. 7.31: Geruchseindrücke der Biotransformation von Zitruspellets durch *P. citrinopileatus*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Biotransformation CPP	kaltes Lagerfeuer, kalter Rauch	holzig, rauchig, pfeffrig	kaltes Lagerfeuer, kalter Rauch

Tab. 7.32: Geruchseindrücke der Biotransformation von Sellerietrester, Zwiebelschalen und von Lauchtrester durch *P. eryngii*

Kultur	Tag 1	Tag 3	Tag 5
Biotransformation ST	süß, Plastik, leicht Brühe	süß, Sellerie, Anis	Marzipan
Biotransformation ZS	rauchig, Zwiebelsuppe	herzhafte Zwiebelsuppe	rauchig, Fleisch, Zwiebel
Biotransformation LT	frischer Lauch, Zwiebel	Lauch, Zwiebel, Gras	Lauch, Zwiebel, Gras

Tab. 7.33: Geruchseindrücke der Biotransformation von Zitruspellets durch *P. sapidus*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 6
Biotransformation CPP	Saunaholz	Zement, Sand	Steine, säuerlich-fruchtig

Tab. 7.34: Geruchseindrücke der Biotransformation von Zitruspellets durch *T. chioneus*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8
Biotransformation CPP	Rauch, Aschenbecher	Rauch, geräuchertes Fleisch	geräuchertes Fleisch	geräuchertes Fleisch

Tab. 7.35: Geruchseindrücke der Biotransformation von Zitruspellets, von Sellerietrester, Zwiebschalen und von Lauchtrester durch *W. cocos*

Kultur	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8
Biotransformation CPP	orange, rauchig	blumig, parfümiert	Orange, Flieder, fruchtig	Flieder, Orange
Biotransformation ST	Pflaume, Pfirsich	fruchtig, süß, Pflaume	süß, parfümiert	-
Biotransformation ZS	Zwiebel	Zwiebelsuppe, Lösungsmittel	Lösungsmittel, Zwiebelsuppe	-
Biotransformation LT	Lauch, Zwiebel	Lauch, Zwiebel	Lauch, Heu	-

7.4 Response-Faktoren

Tab. 7.36: Response-Faktoren der olfaktometrisch detektierten Verbindungen in der Biotransformation von Karottenschalen durch *W. cocos*

Aromastoff	Response-Faktor
Essigsäure (<i>m/z</i> 45, 60)	5,658 ± 0,20*
1-Octen-3-ol	1,901 ± 0,06
Linalool	1,405 ± 0,02
(<i>E</i>)-Geraniol (<i>m/z</i> 41, 69)	3,221 ± 0,04
Benzylalkohol	1,429 ± 0,09
2-Phenylethanol	1,208 ± 0,04
β -Ionon (<i>m/z</i> 177)	3,679 ± 0,04

*Fehlergrenze ist hier die halbe Differenz der Doppelbestimmung, ansonsten Standardabweichung der Dreifachbestimmung

7.5 Kulturüberstände

Tab. 7.37: Volumen der extrahierten Kulturüberstände der Doppelbestimmung

#	Kultur	Volumen [mL]	
		I	II
1	Biotransformation lyophilisierter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M1	67	69
2	Pilz-Blindwert <i>W. cocos</i> M2	91	89
3	Substrat-Blindwert lyophilisierter Karottenschalen (zu 1) M1	48	50

#	Kultur	Volumen [mL]	
		I	II
4	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M1	87	83
5	Substrat-Blindwert unbehandelter Karottenschalen (zu 4) M1	61	60
6	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M9	90	85
7	Pilz-Blindwert <i>W. cocos</i> M11	86	83
8	Substrat-Blindwert unbehandelter Karottenschalen (zu 6) M9	52	60
9	Maßstabsvergrößerung	77	77
10	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M9 nach SPME	104	104
11	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M3	105	105
12	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M4	102	105
13	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M5	105	102
14	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M6	104	103
15	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M7	103	103
16	Biotransformation unbehandelter Karottenschalen durch <i>W. cocos</i> M8	102	105

7.6 Massenspektren

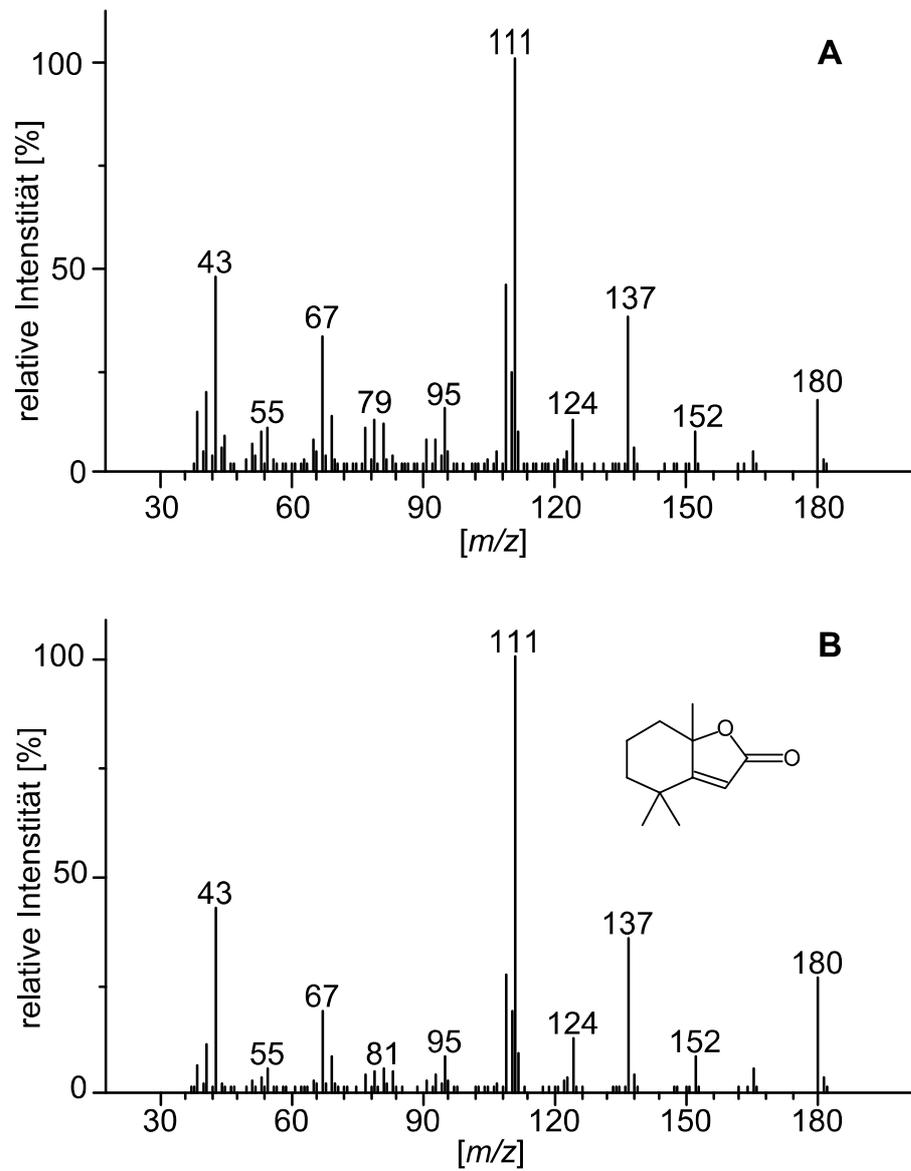


Abb. 7.4: Massenspektrum Dihydroactinidiolid: Probe (A), Datenbank NIST (B)

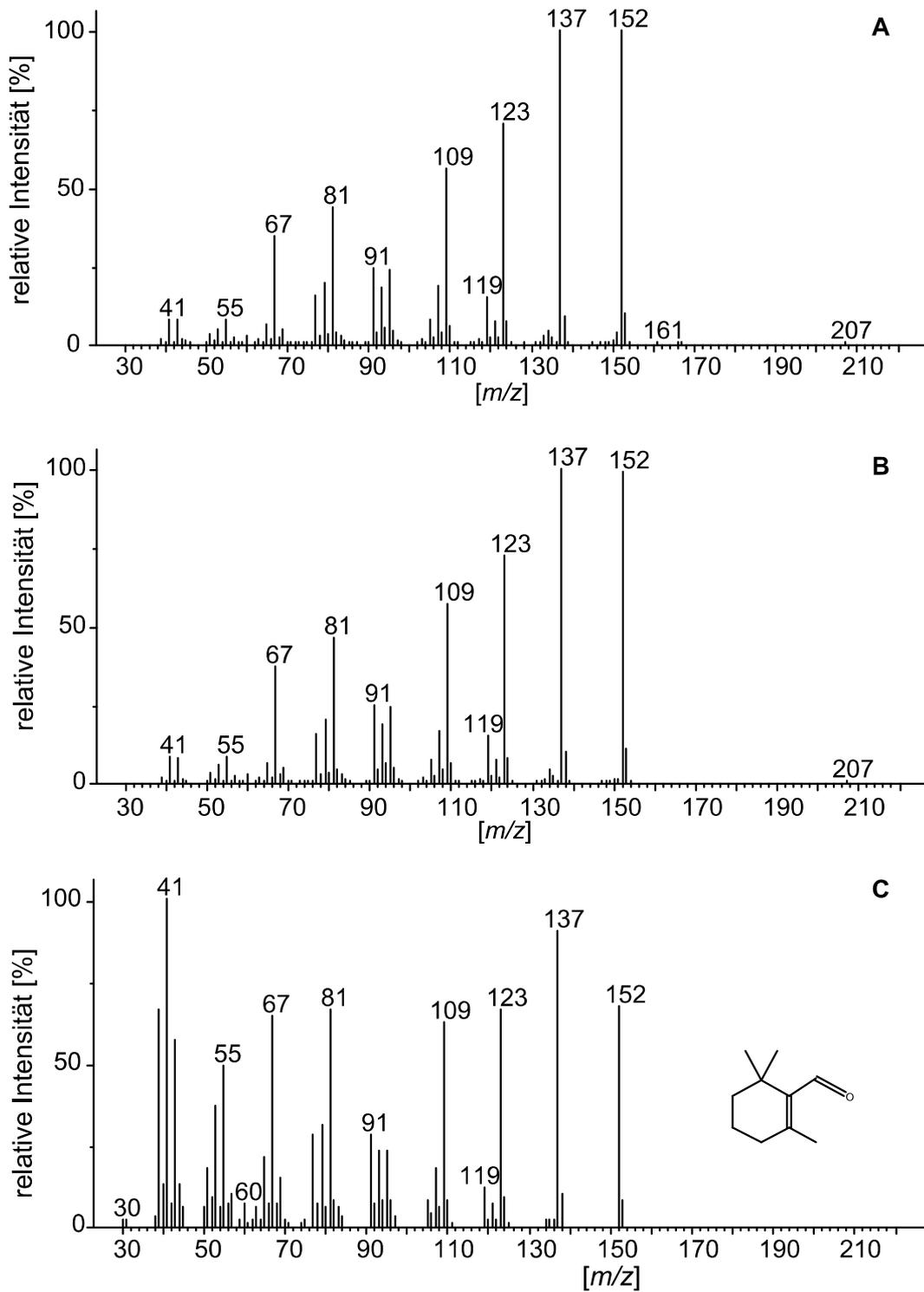


Abb. 7.5: Massenspektrum β -Cyclocitral: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

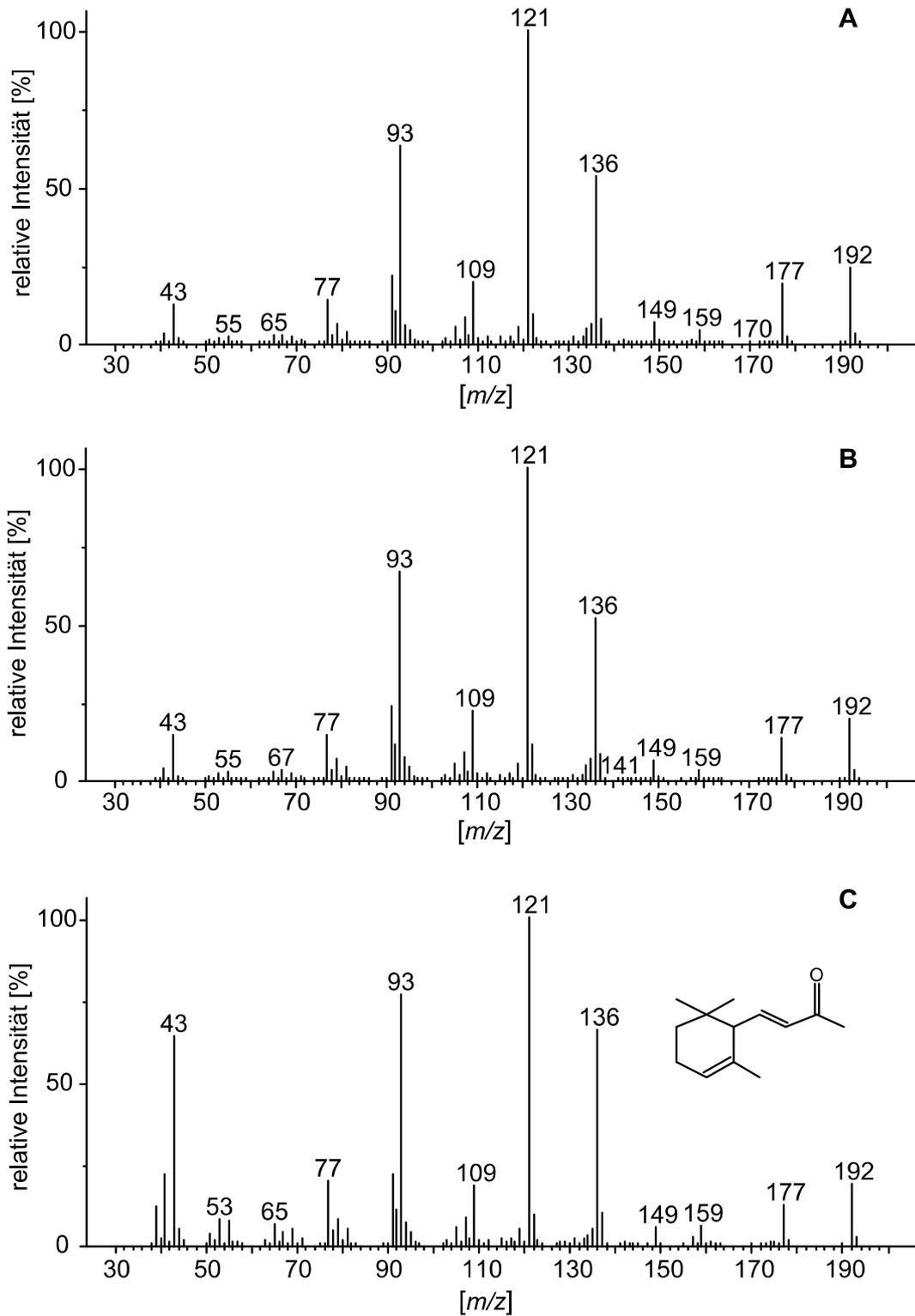


Abb. 7.6: Massenspektrum α -Ionon: Probe (A), authentischer Standard (B),
Datenbank NIST (C)

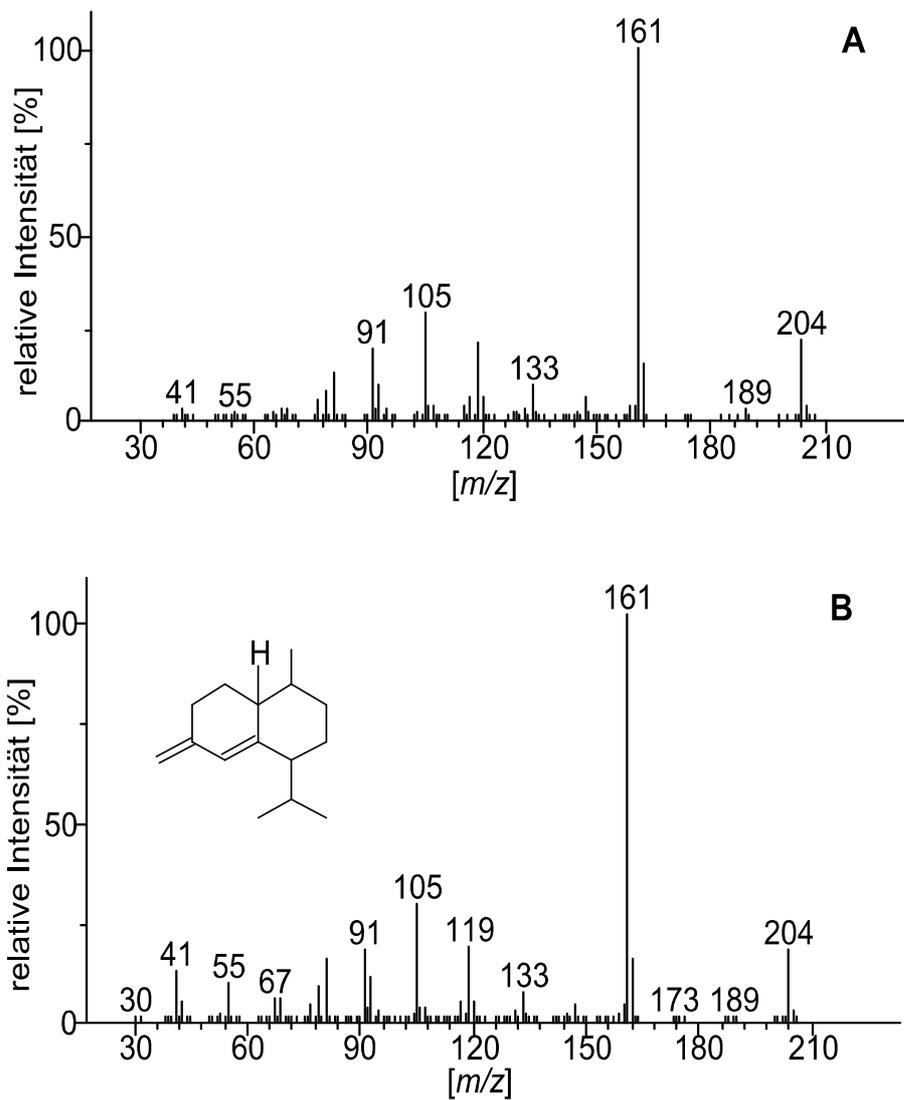


Abb. 7.7: Massenspektrum (+)-epi-Bicyclosquiphellandren: Probe (A), Datenbank NIST (B)

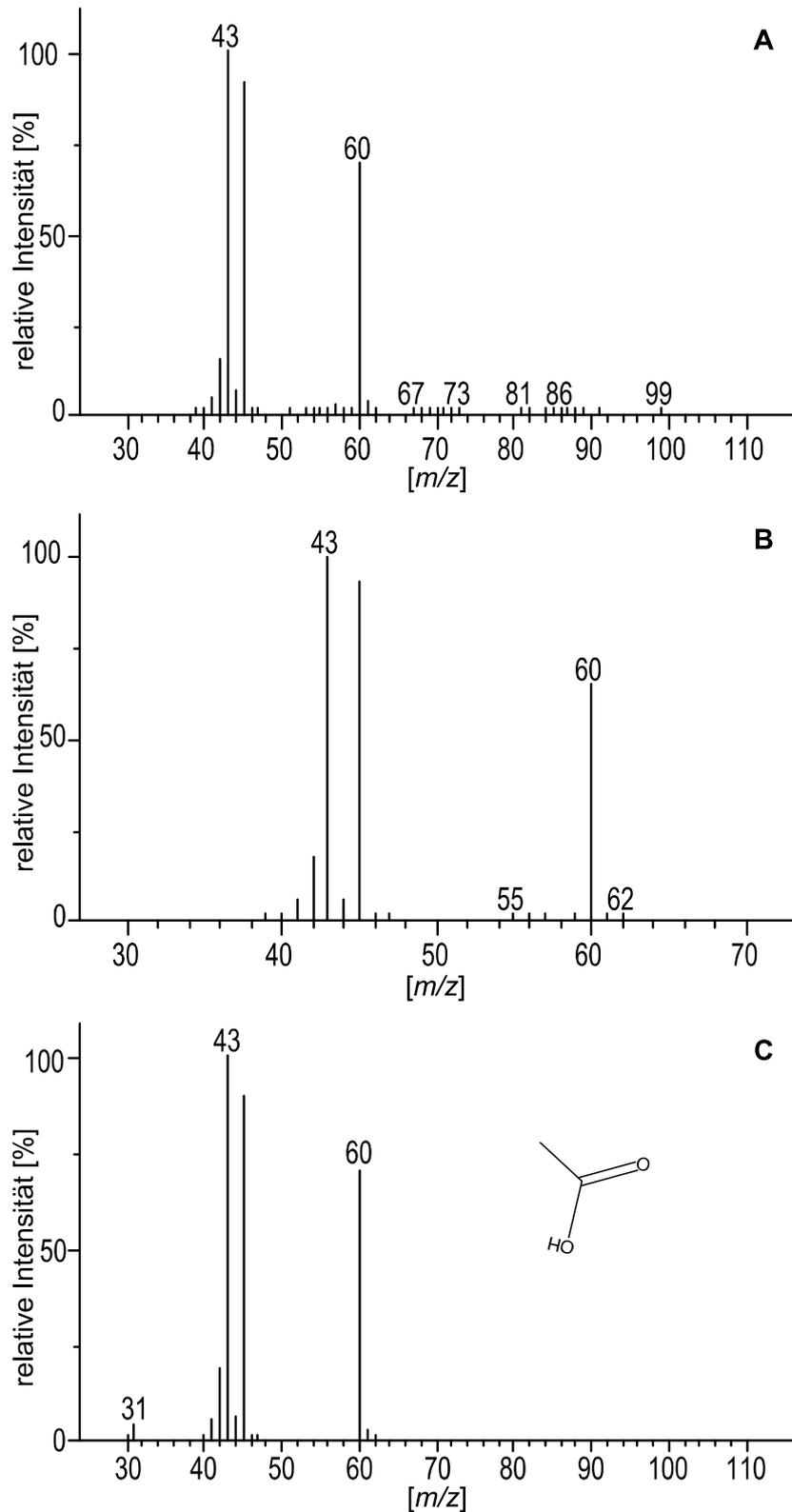


Abb. 7.8: Massenspektrum Essigsäure: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

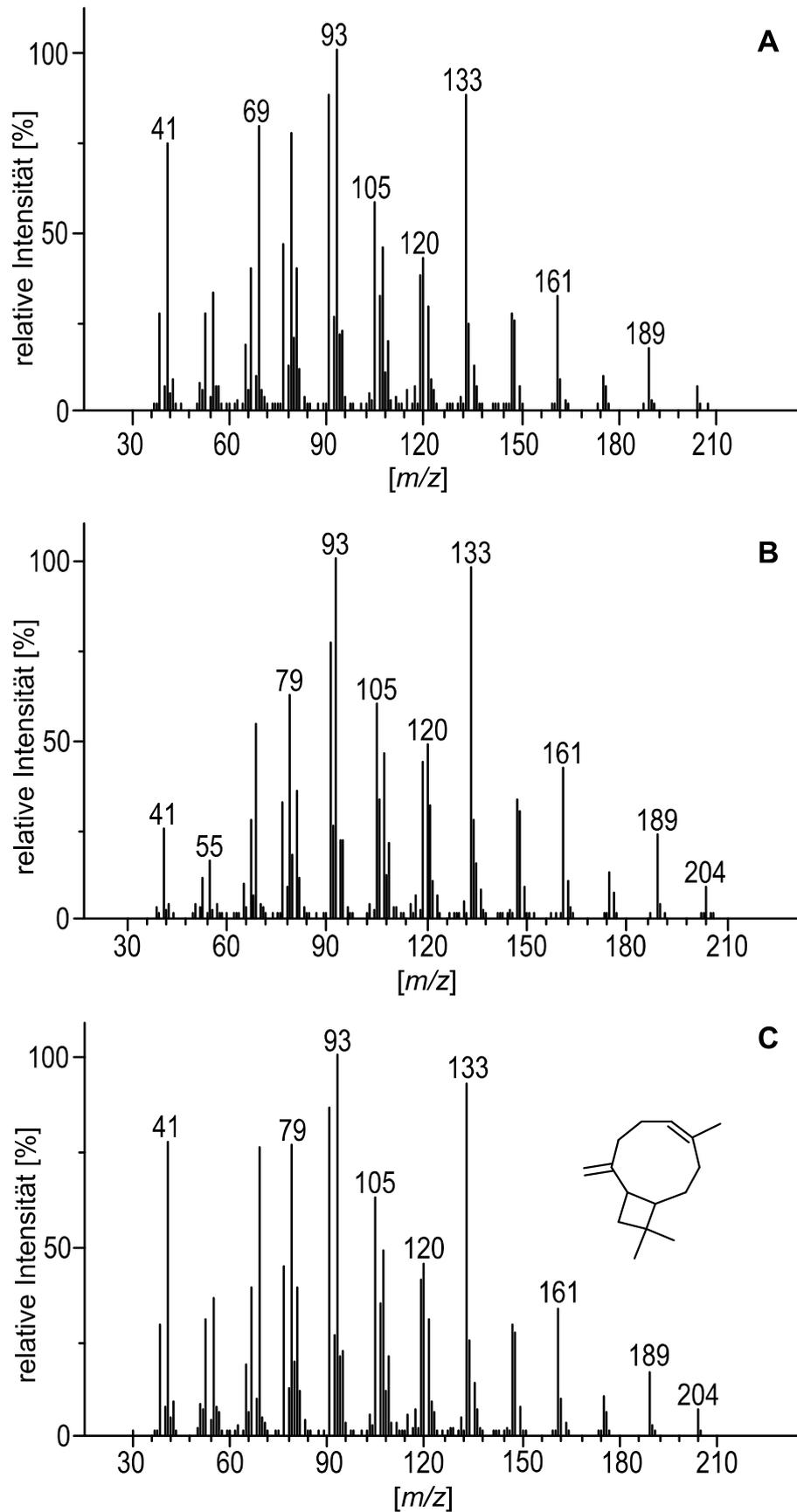


Abb. 7.9: Massenspektrum β -Caryophyllen: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

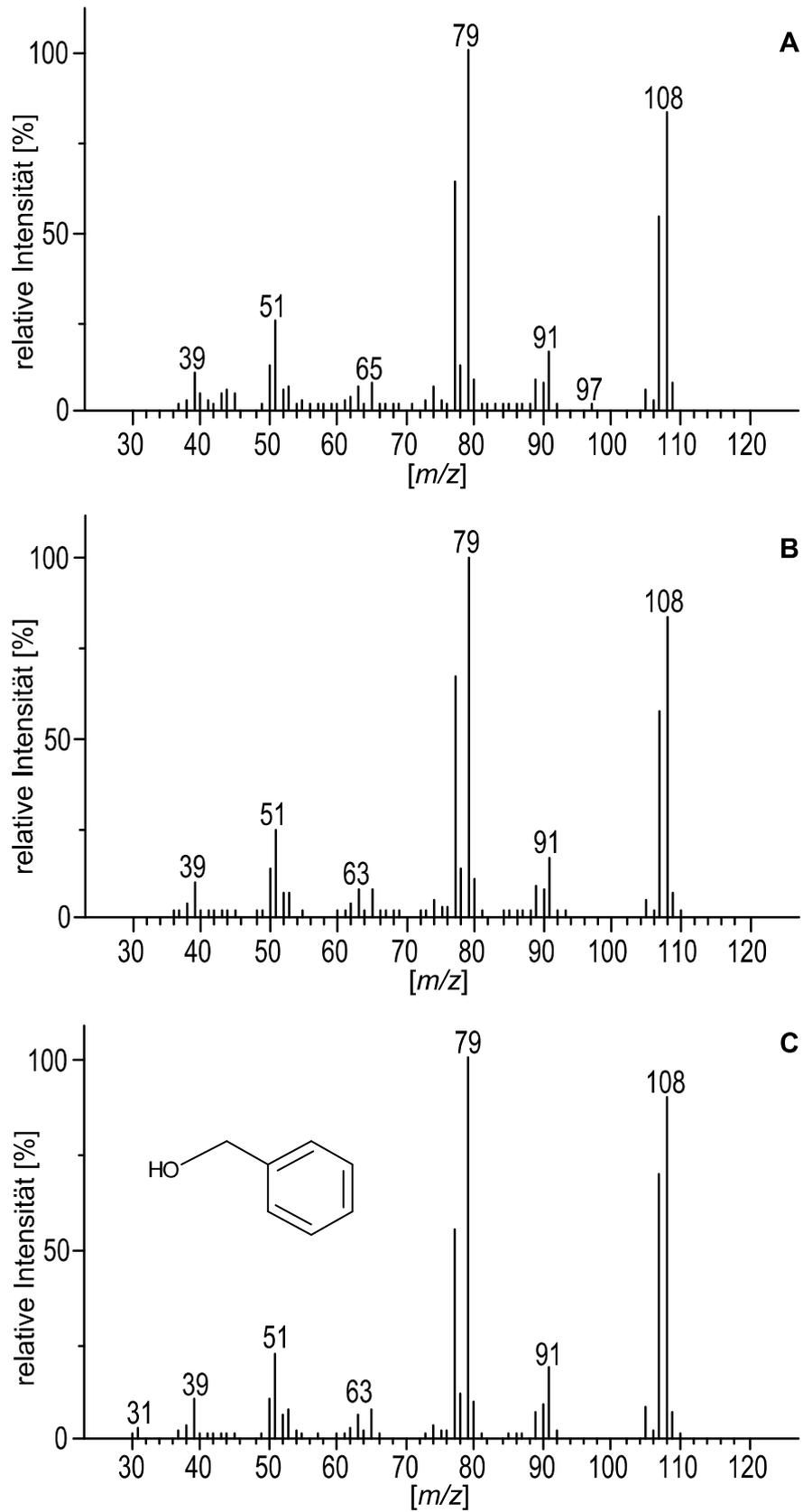


Abb. 7.10: Massenspektrum Benzylalkohol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

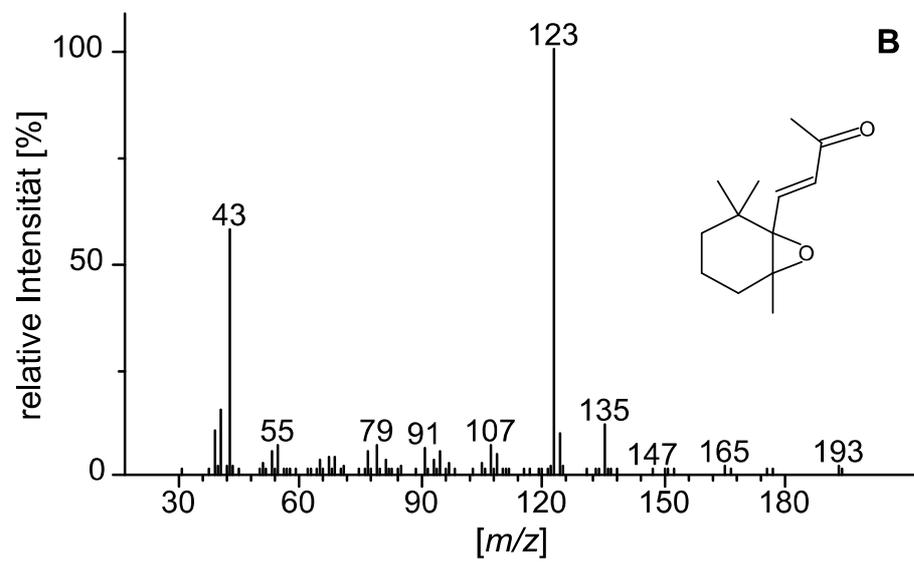
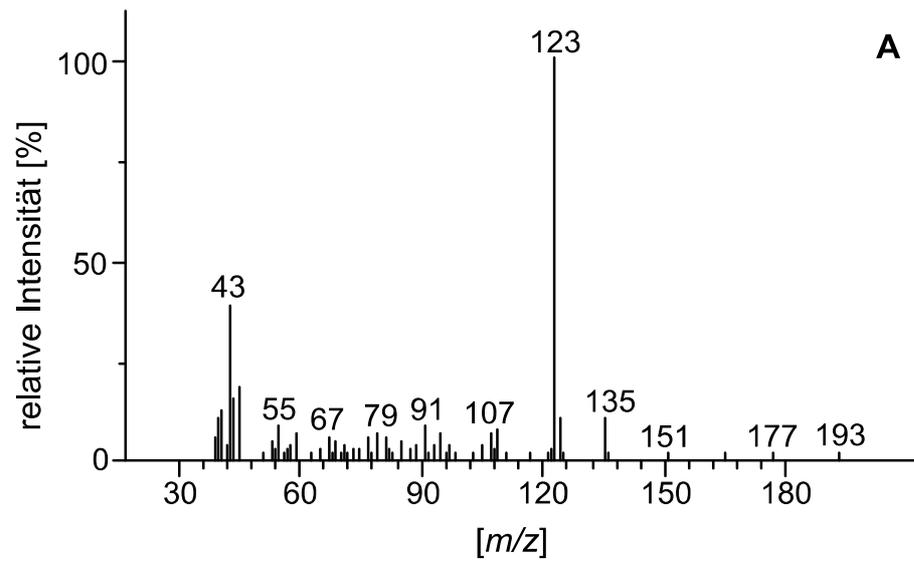
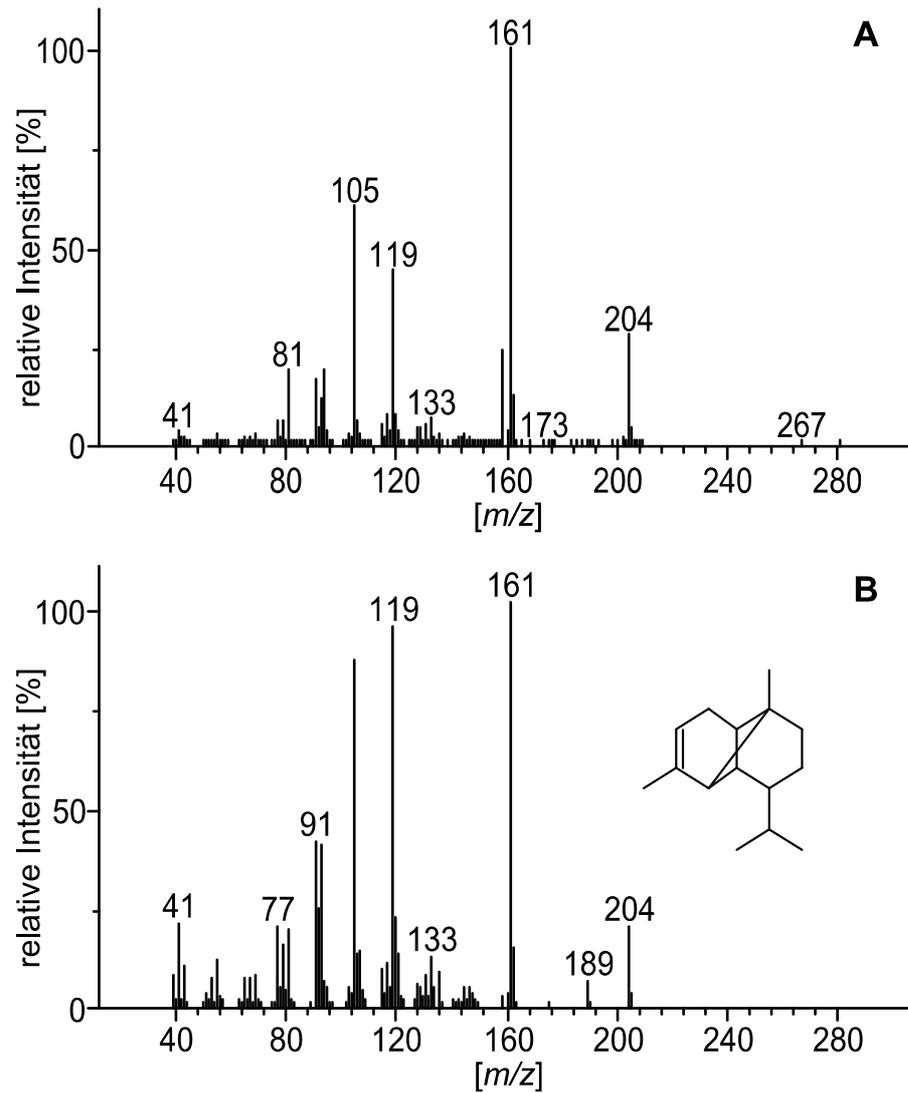


Abb. 7.11: Massenspektrum 5,6-Epoxy- β -ionon: Probe (A), Datenbank NIST (B)

Abb. 7.12: Massenspektrum α -Copaen: Probe (A), Datenbank NIST (B)

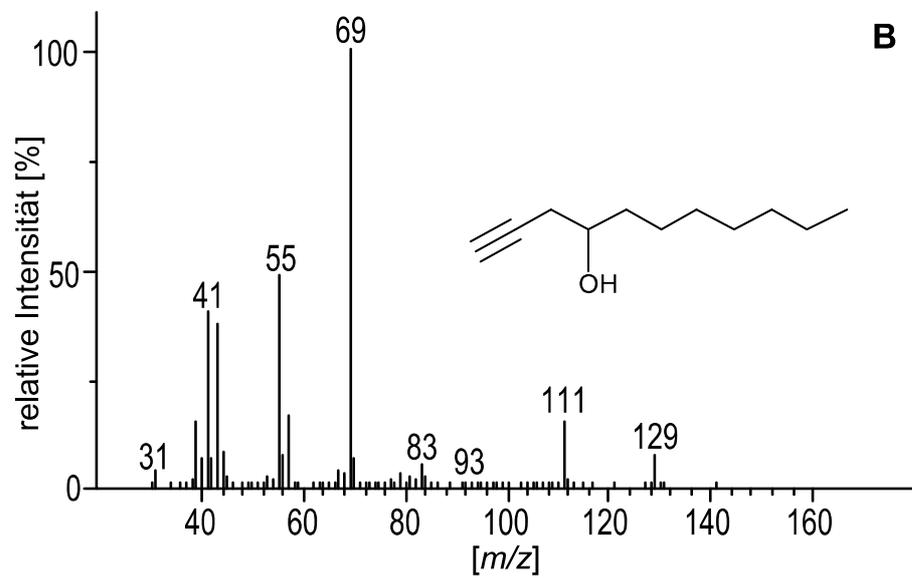
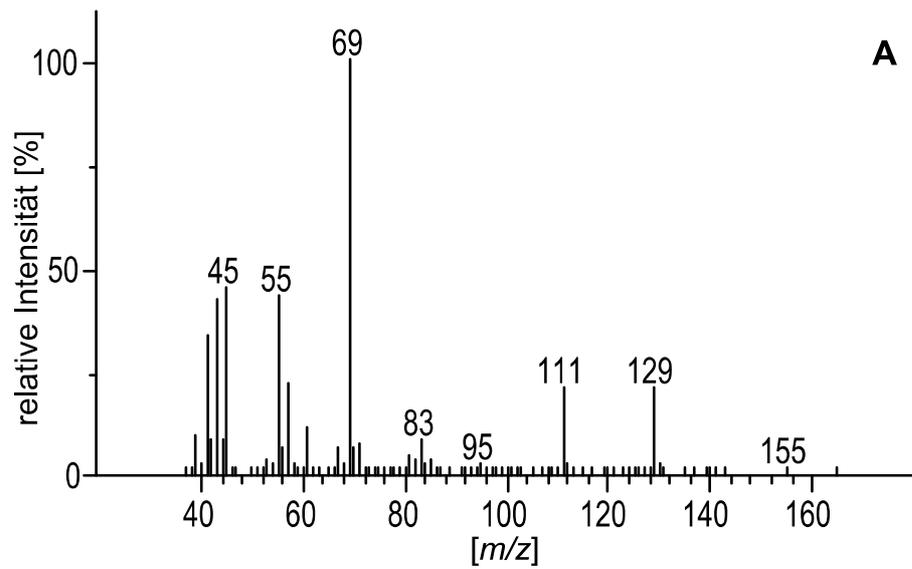


Abb. 7.13: Massenspektrum 1-Undecyn-4-ol: Probe (A), Datenbank NIST (B)

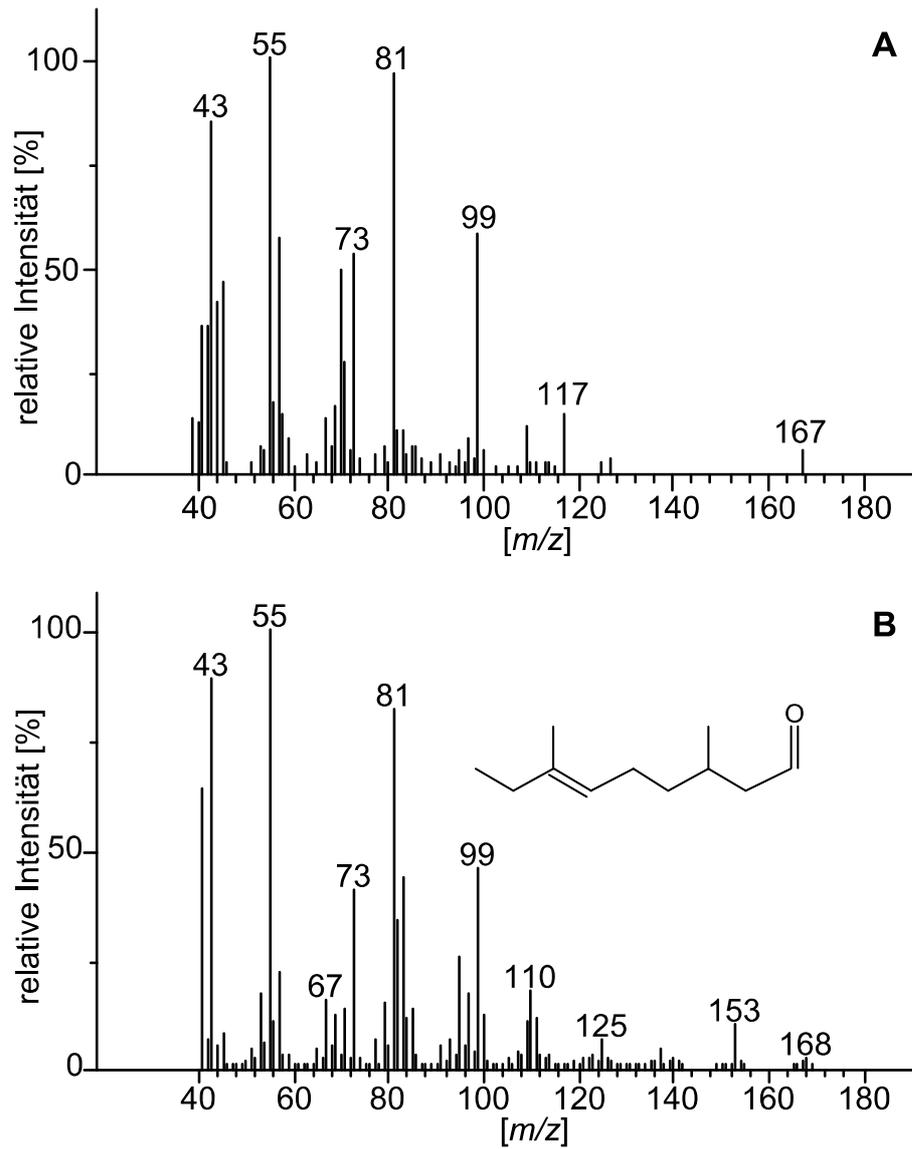


Abb. 7.14: Massenspektrum 3,7-Dimethyl-6-nonenal: Probe (A), Datenbank NIST (B)

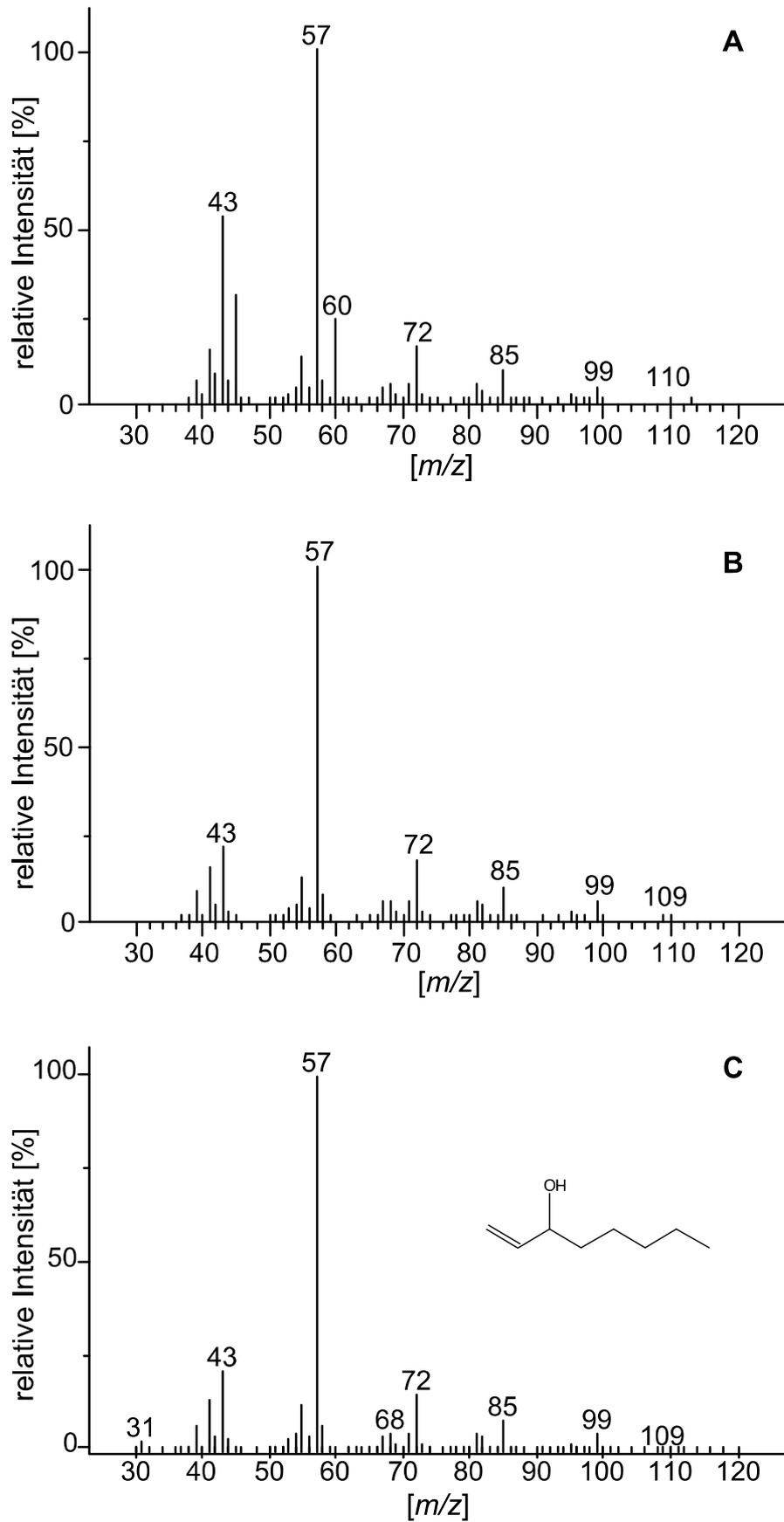


Abb. 7.15: Massenspektrum 1-Octen-3-ol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

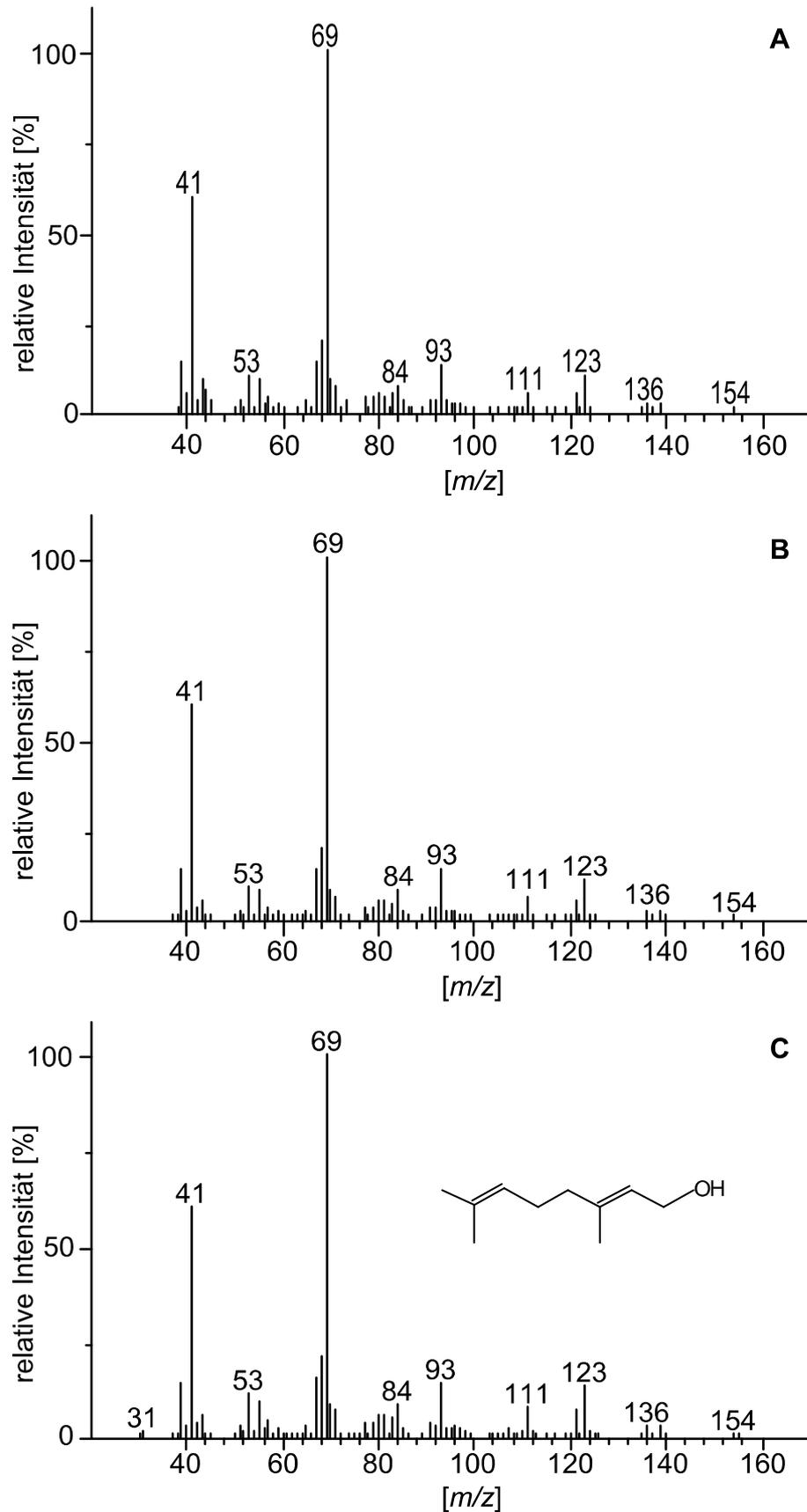


Abb. 7.16: Massenspektrum (*E*)-Geraniol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

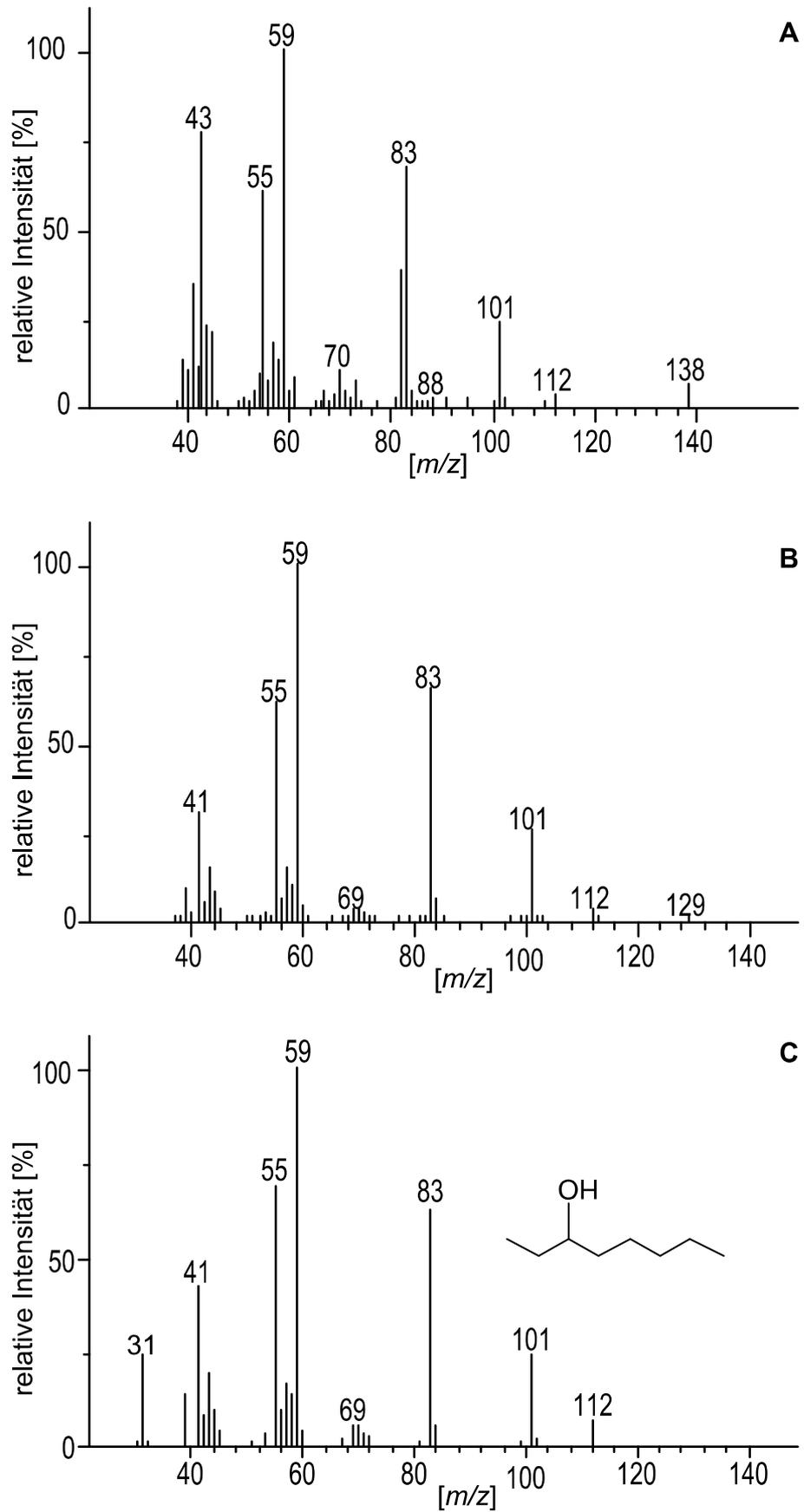


Abb. 7.17: Massenspektrum 3-Octanol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

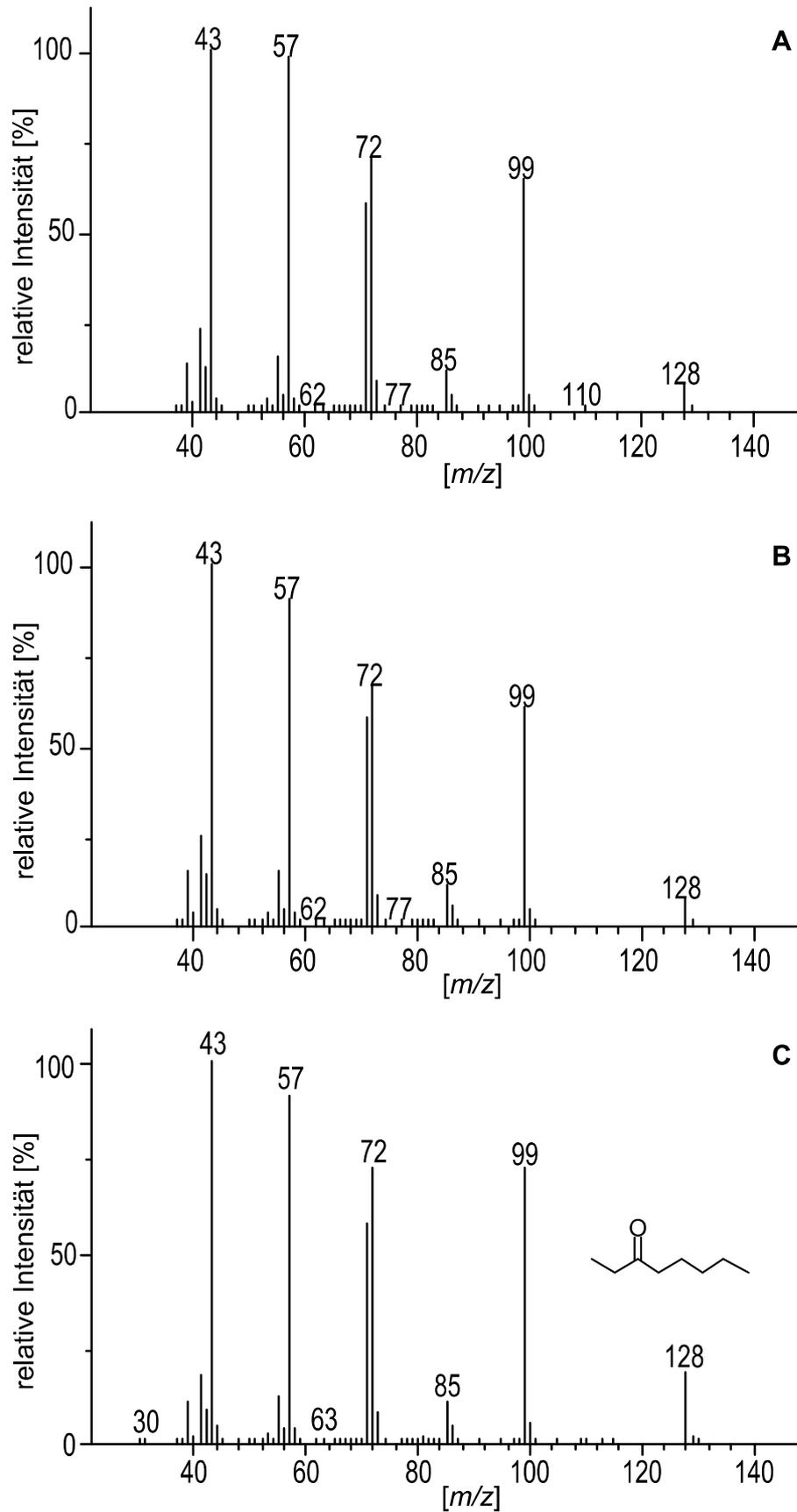


Abb. 7.18: Massenspektrum 3-Octanon: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

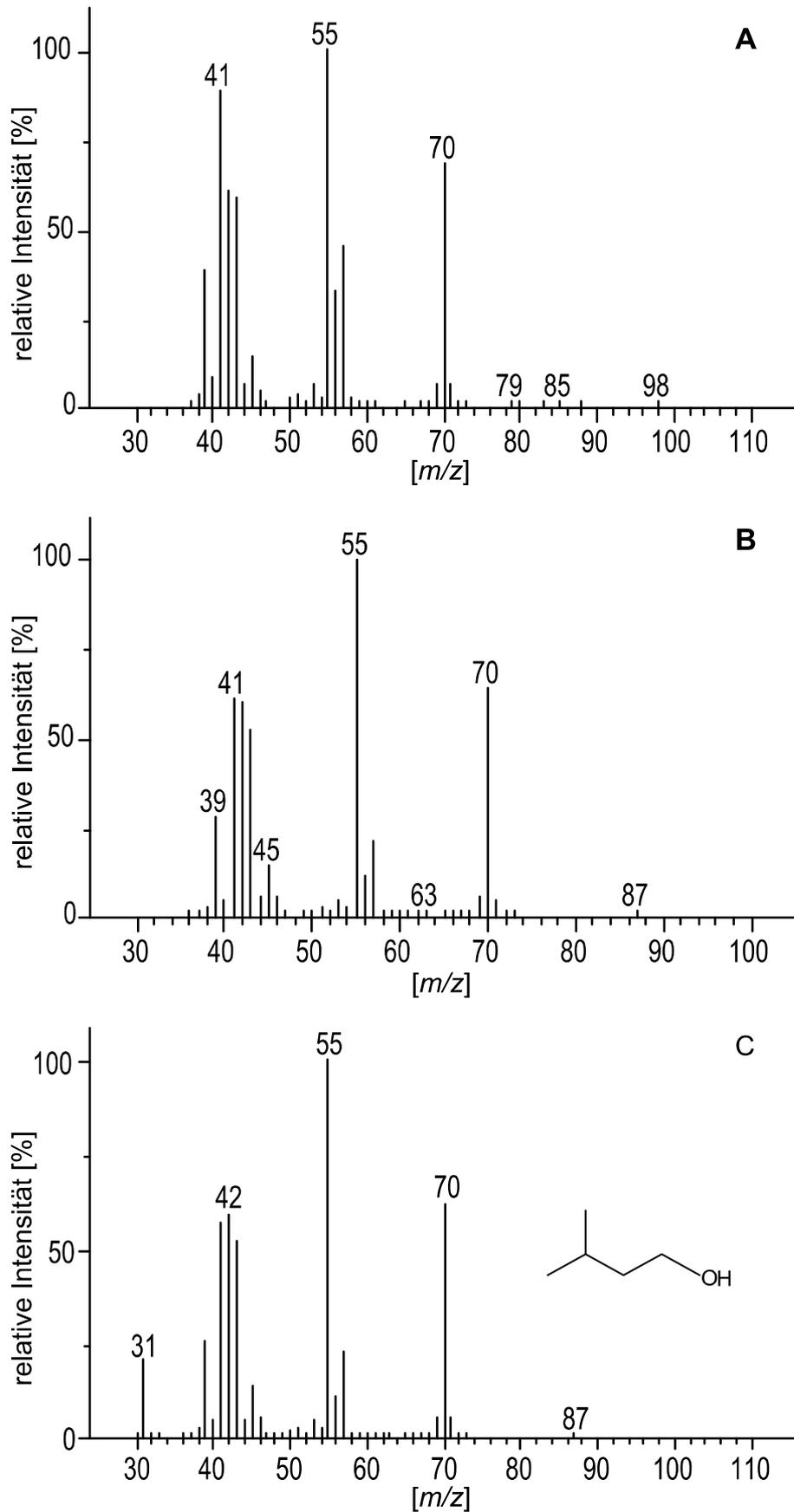


Abb. 7.19: Massenspektrum 3-Methyl-1-butanol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

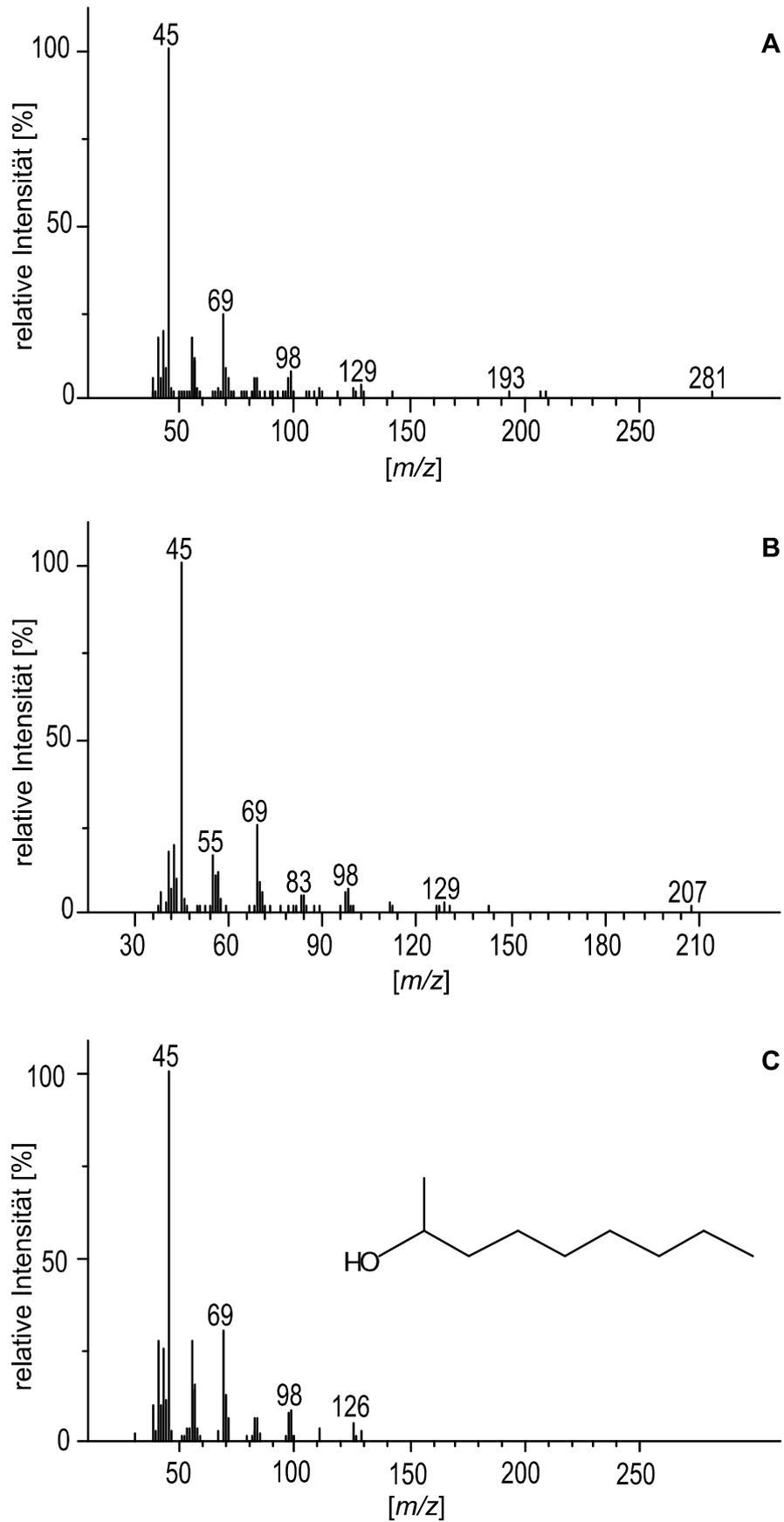


Abb. 7.20: Massenspektrum 2-Nonanol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

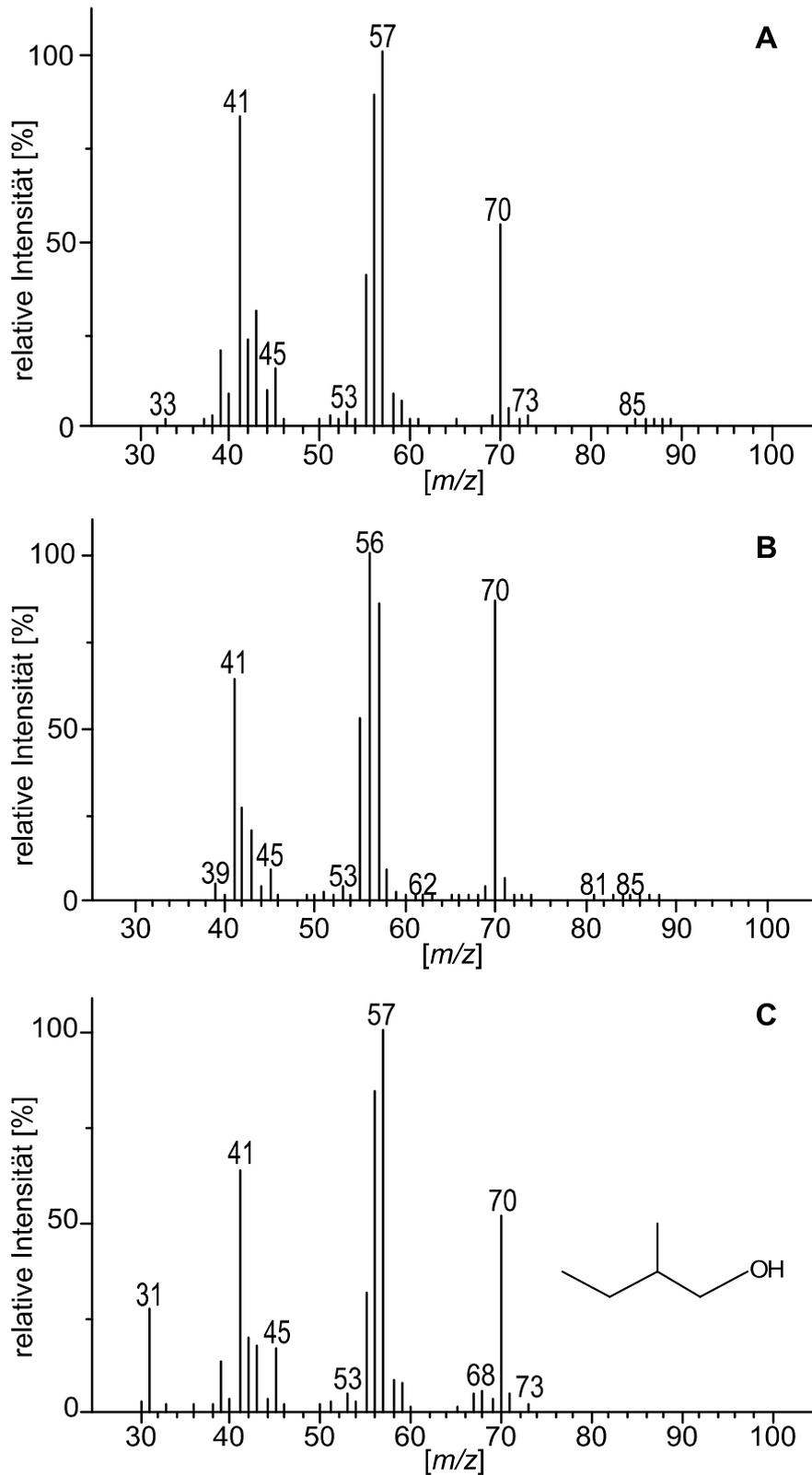


Abb. 7.21: Massenspektrum 2-Methyl-1-butanol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

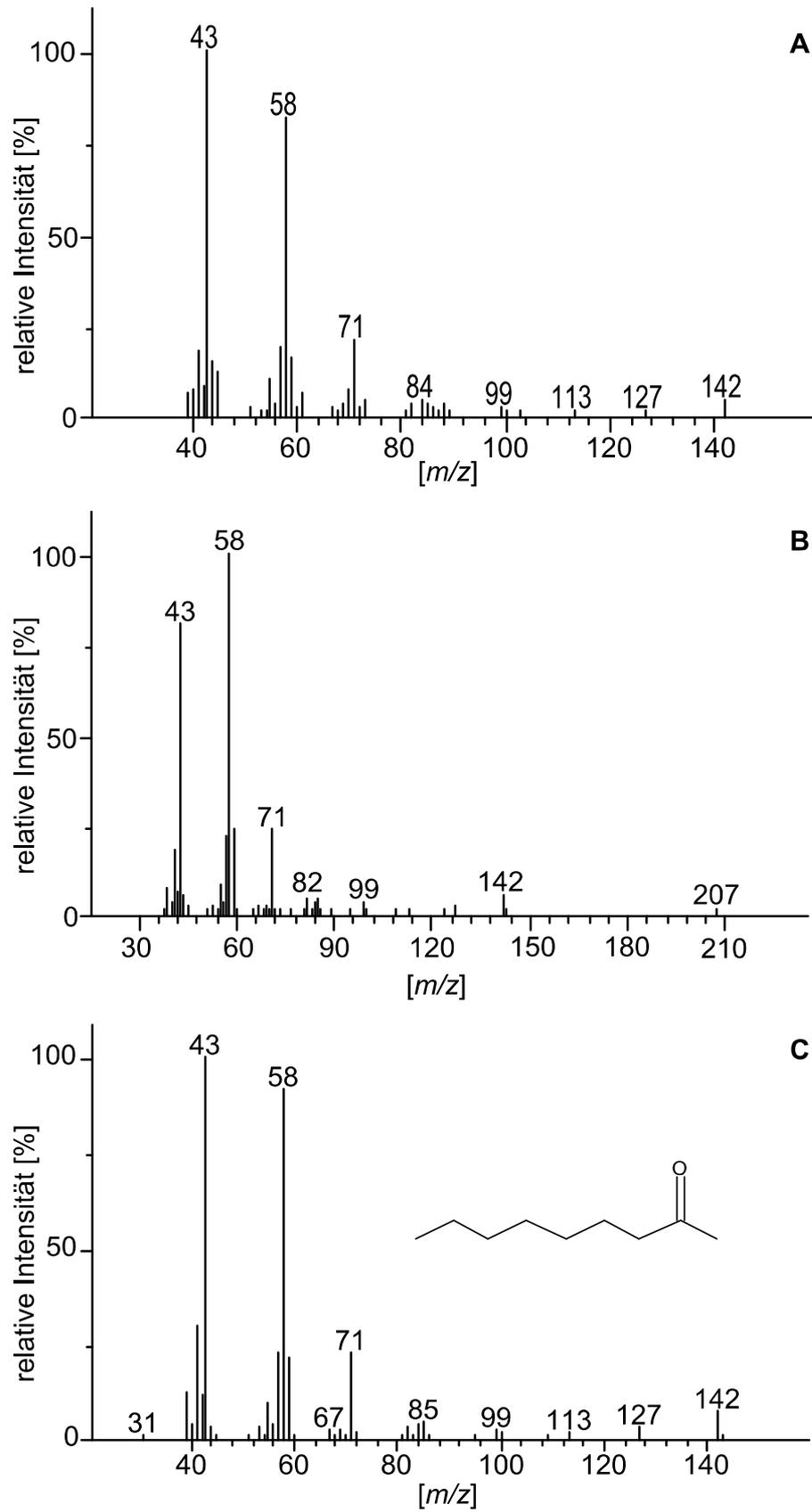


Abb. 7.22: Massenspektrum 2-Nonanon: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

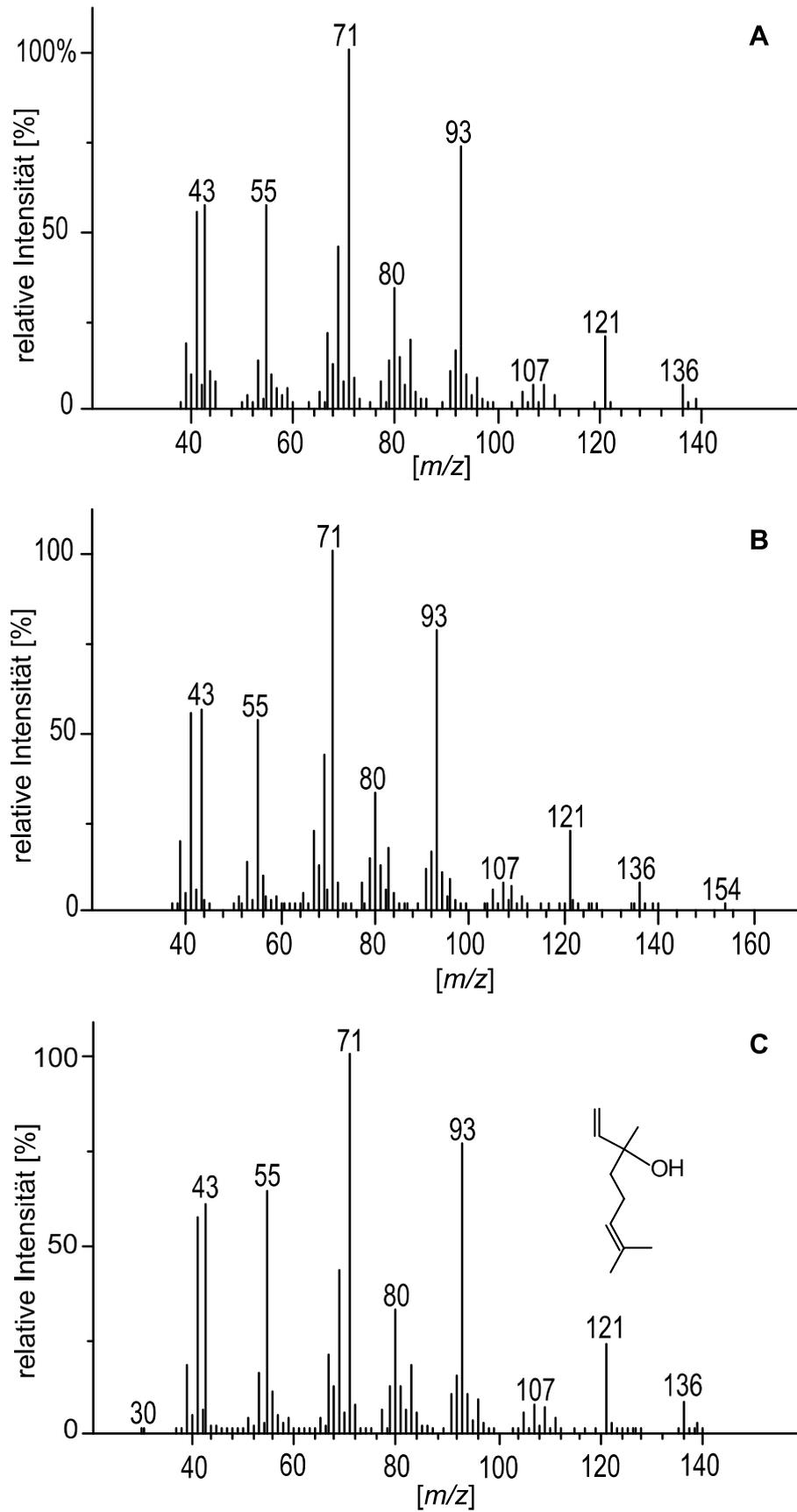


Abb. 7.23: Massenspektrum Linalool: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

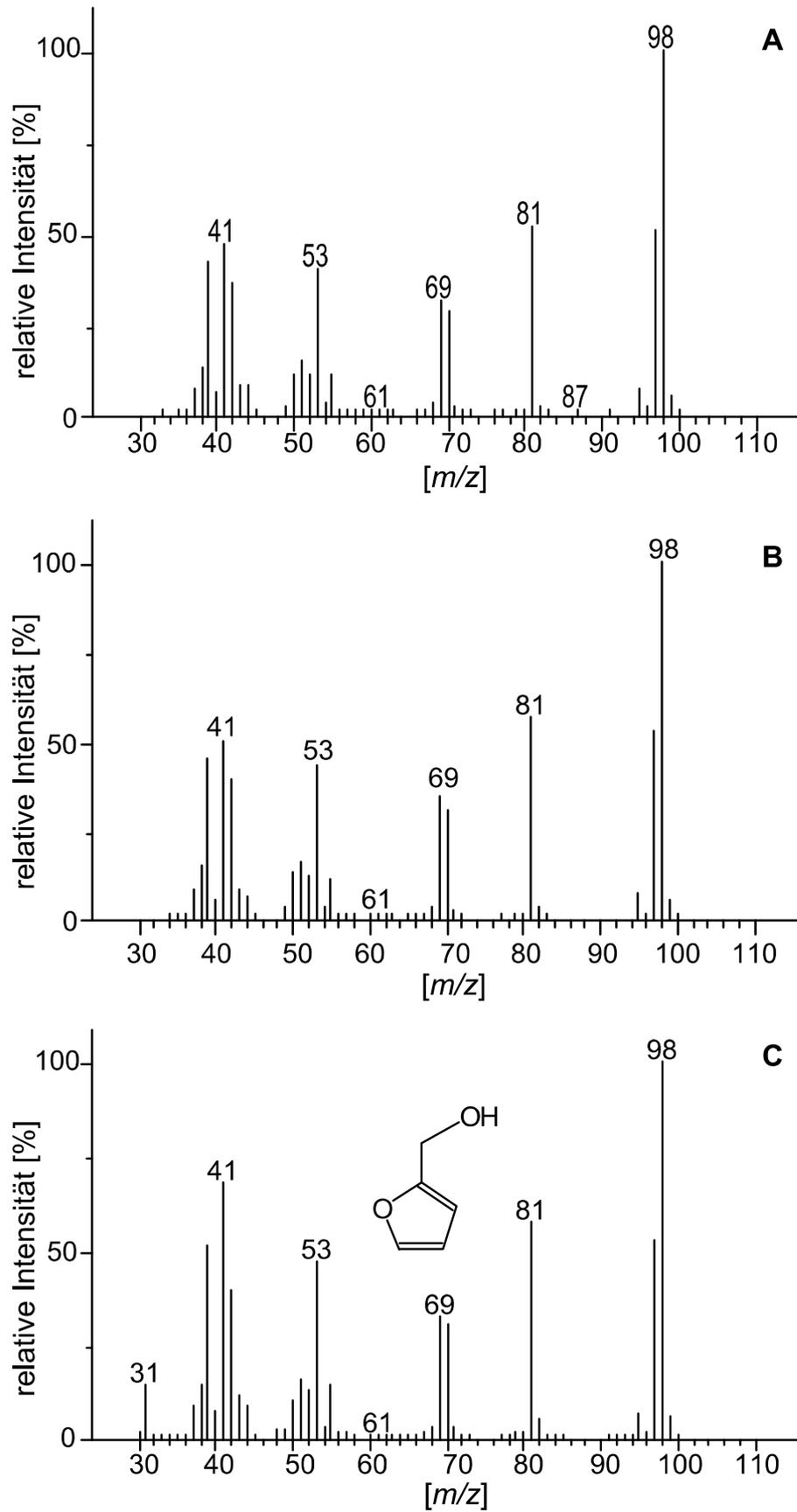


Abb. 7.24: Massenspektrum 2-Furanmethanol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

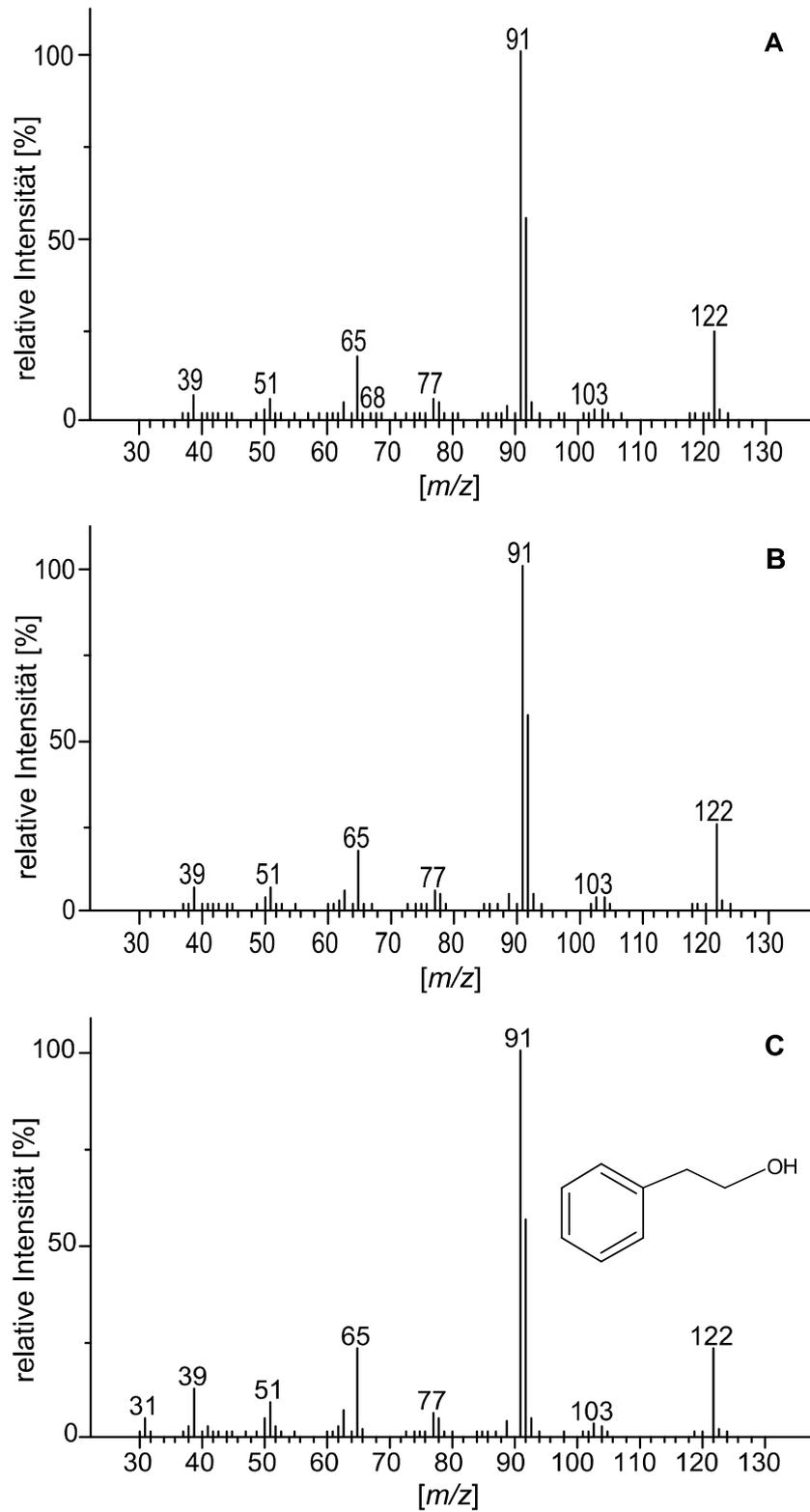


Abb. 7.25: Massenspektrum 2-Phenylethanol: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

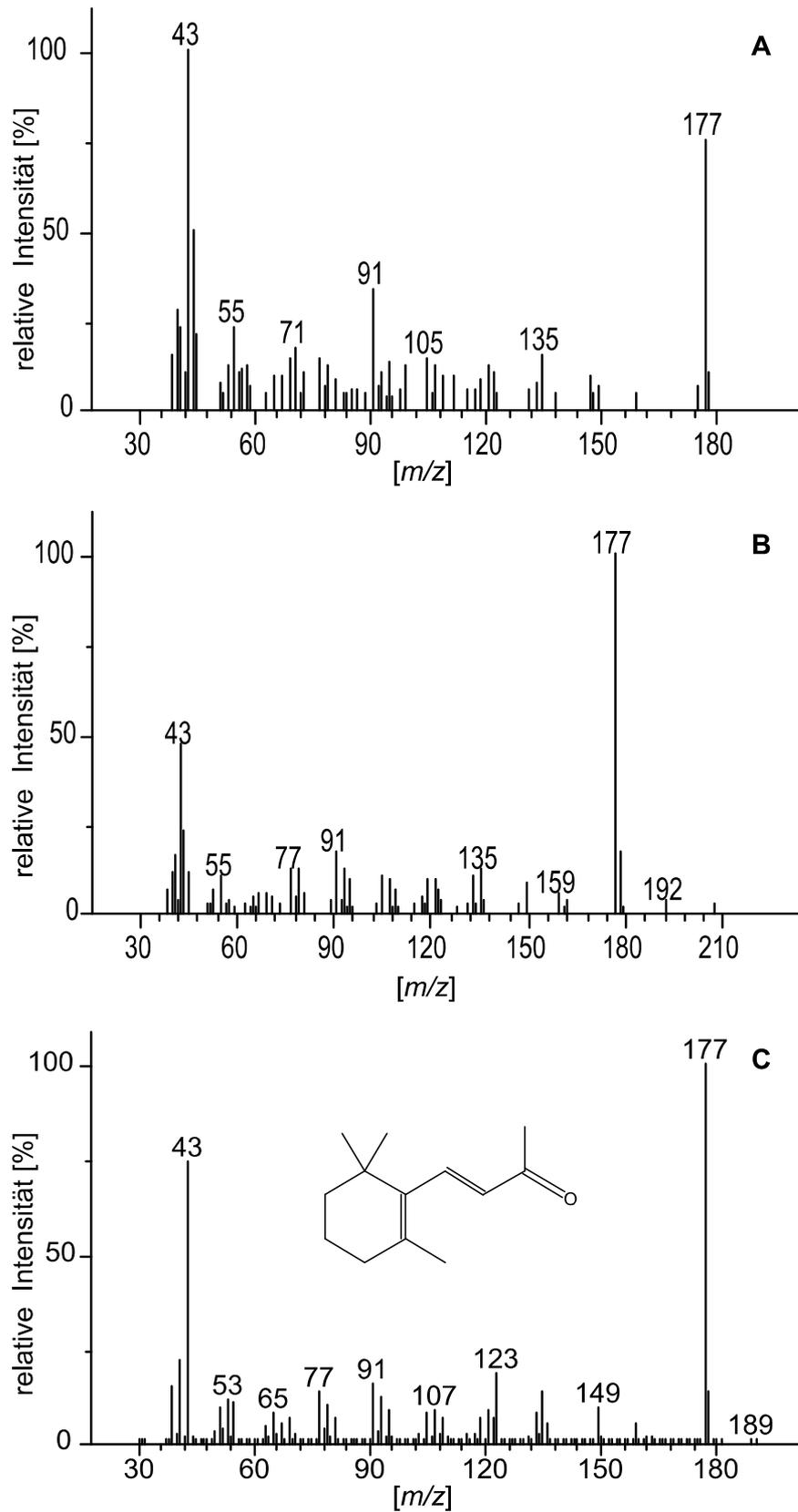
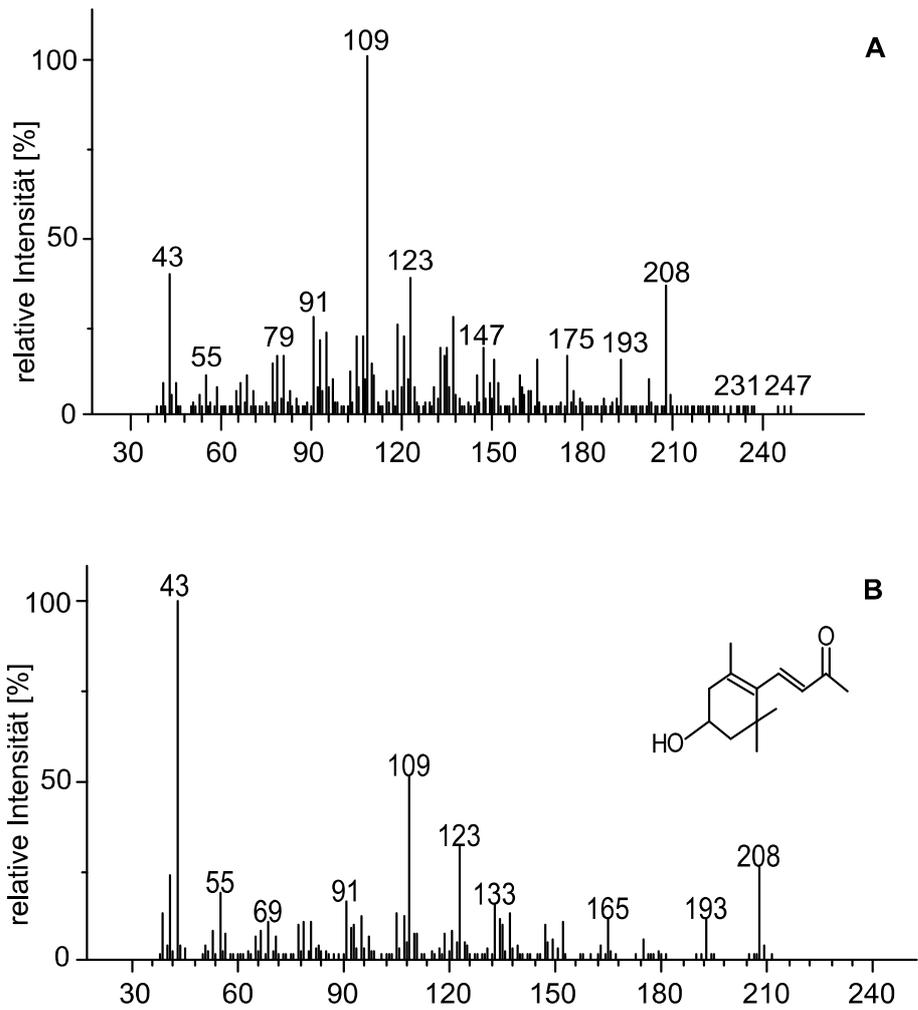


Abb. 7.26: Massenspektrum β -Ionon: Probe (A), authentischer Standard (B), Datenbank NIST (C)

Abb. 7.27: Massenspektrum 3-Hydroxy- β -ionon: Probe (A), Datenbank NIST (B)

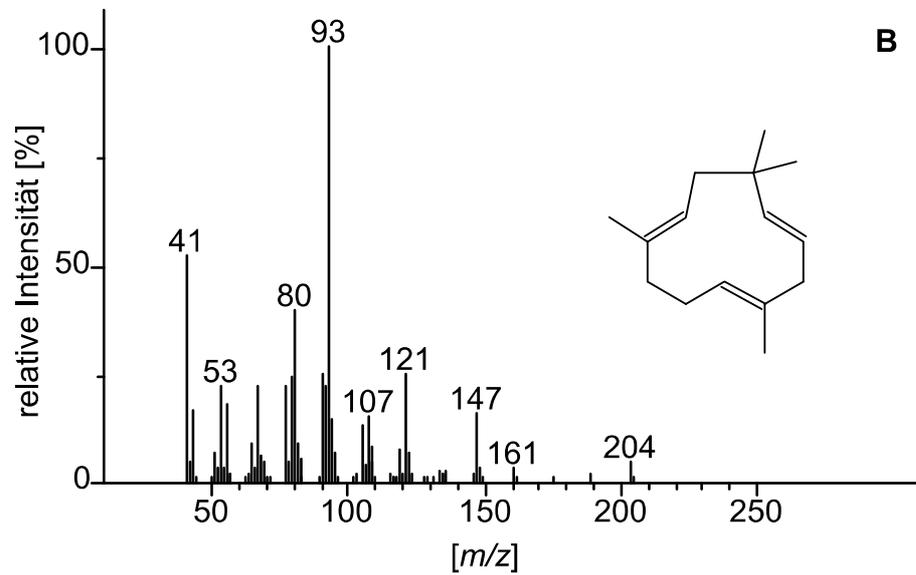
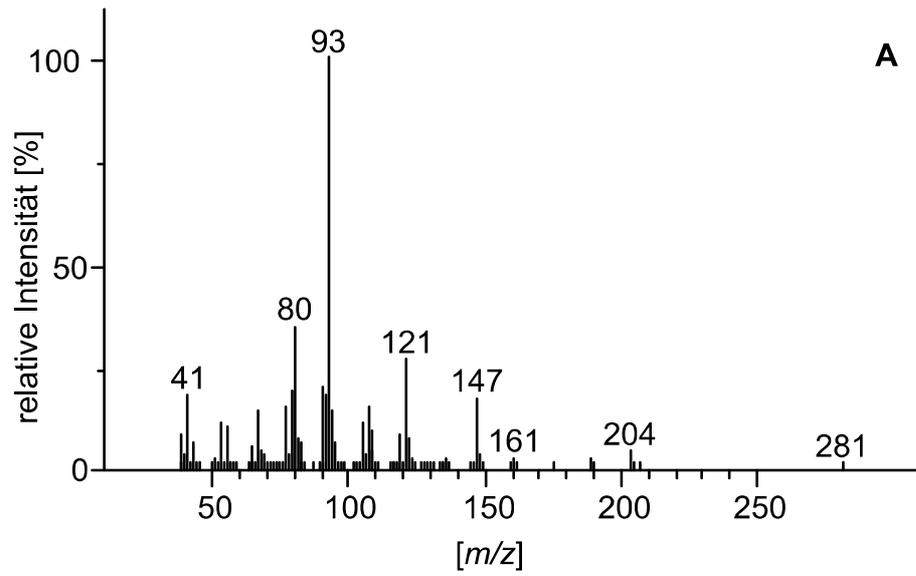
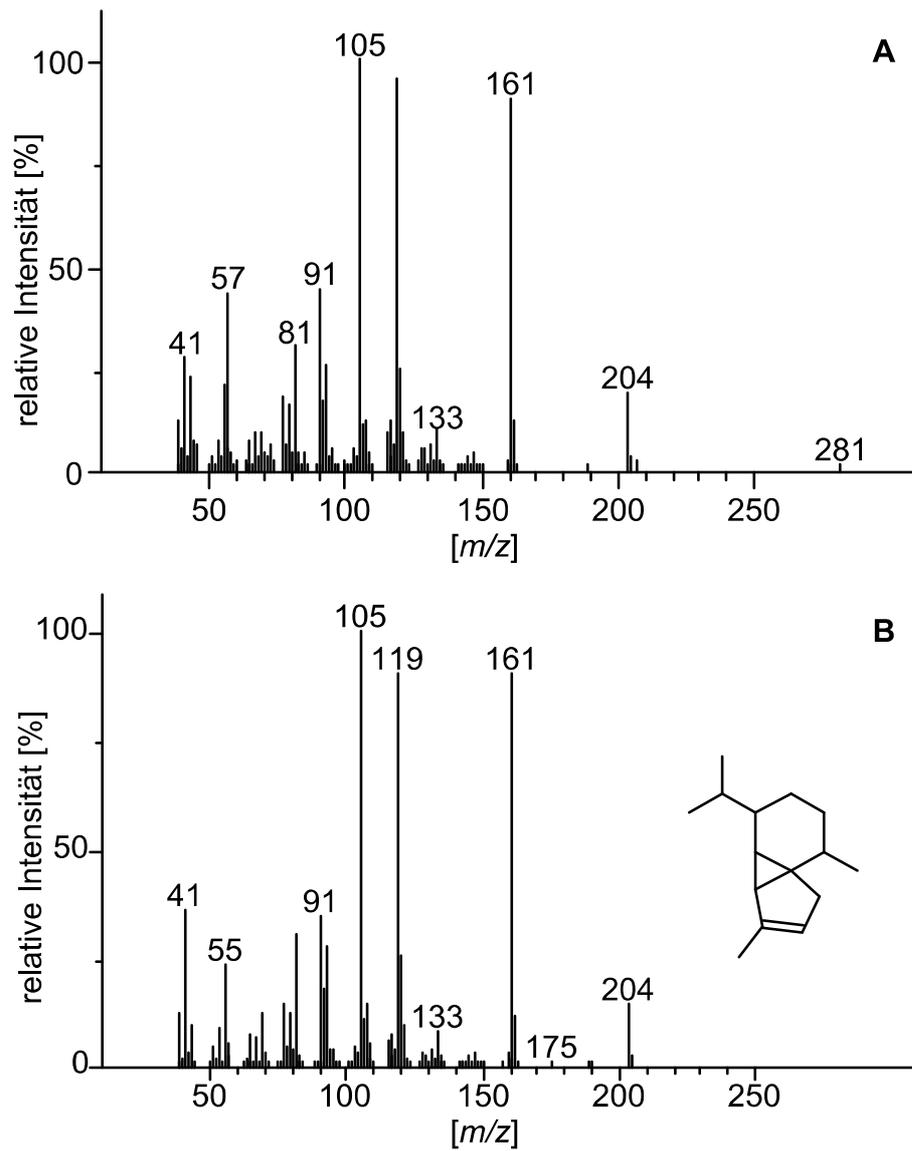
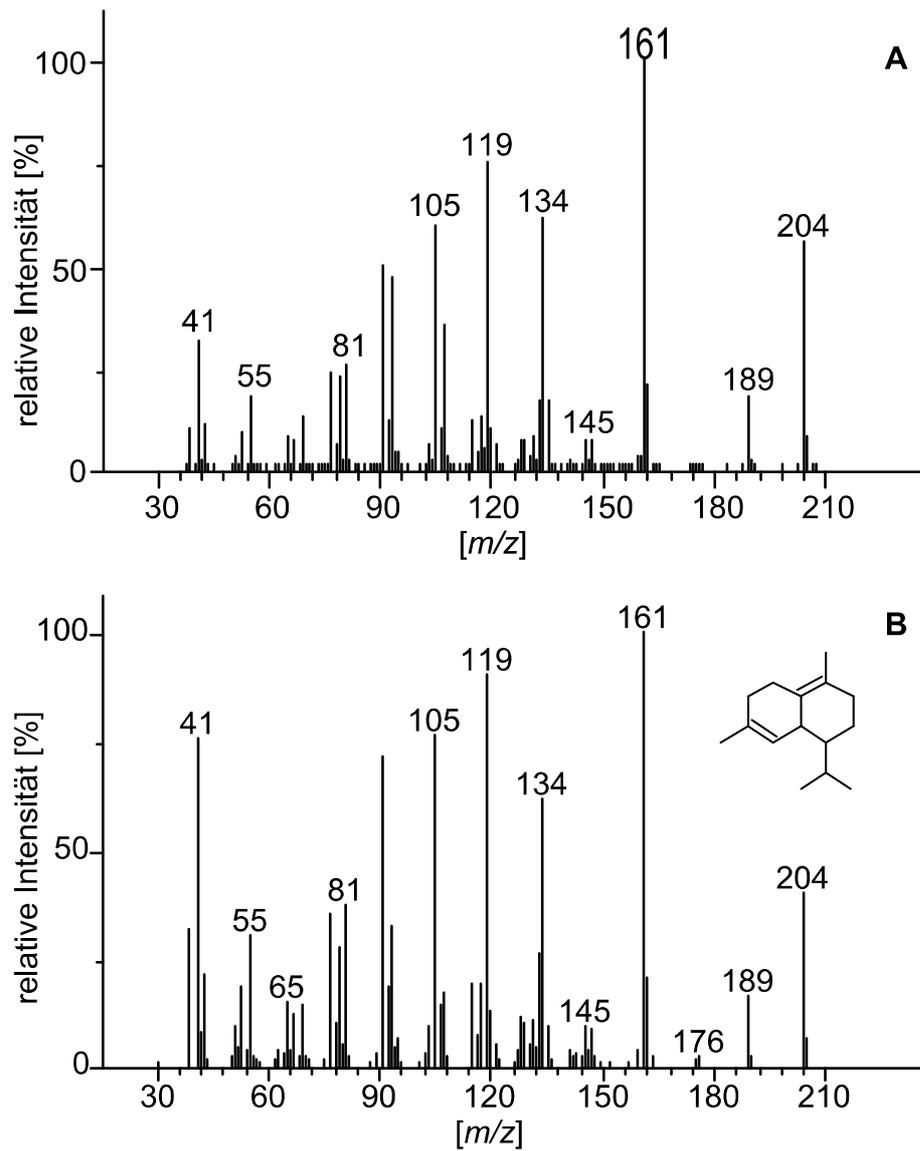


Abb. 7.28: Massenspektrum α -Caryophyllen: Probe (A), Datenbank NIST (B)

Abb. 7.29: Massenspektrum α -Cubeben: Probe (A), Datenbank NIST (B)

Abb. 7.30: Massenspektrum δ -Cadinene: Probe (A), Datenbank NIST (B)