Karl-Winnacker-Institut

Universität Hannover

Sensorgestützte Biokonversion zur Gewinnung natürlicher terpenoider Aromastoffe

S. Schäfer[1], R. Kaspera[2], U. Krings[2], J. Schrader[1], D. Sell[1], R. G. Berger[2]

[1]Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA e.V., Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt

[2] Institut für Lebensmittelchemie im Zentrum für Angewandte Chemie der Universität Hannover, Wunstorfer Str. 14, 30453 Hannover

finanzielle Unterstützung durch bmb+f

Einleitung

Biokonversionen gelten als etablierte Reaktionen zur alternativen Herstellung von natürlichen Aromastoffen [1]. Unter den biotechnologisch erzeugten Aromastoffen finden sich jedoch trotz einzigartiger Aromaeigenschaften kaum Terpenoide. Die Gründe liegen in der physikochemischen Natur der Substrate und Produkte. Geringe Wasserlöslichkeit, hohe Flüchtigkeit und Cytotoxizität behindern die Durchführung konventioneller Bioprozesse. Für eine effiziente Umsetzung ist es erforderlich, die Zugabe des Substrates in Abhängigkeit von der Zellvitalität zu steuern.

Ergebnisse

Während eines Aktivitäts-Screenings wurden Asco- und Basidiomyceten gefunden, die den sensorisch unbedeutenden Terpenkohlenwasserstoff Limonen in aromarelevante Verbindungen konvertieren (Abb. 1).

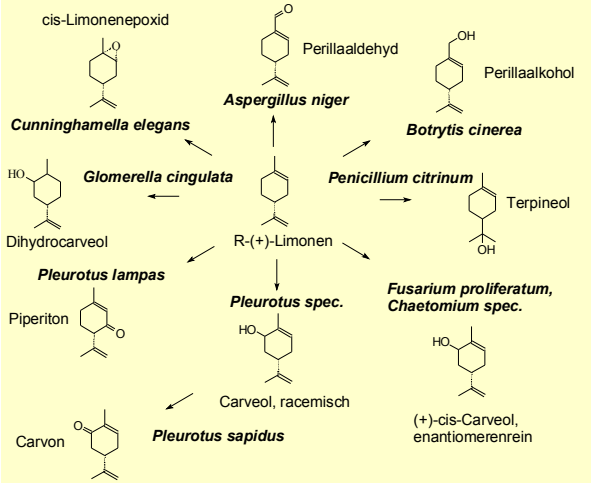


Abb.1: R-(+)-Limonenbiotransformationsprodukte.

Respirationsmessungen

Zur Messung der Stoffwechselaktivität wird ein off-line-Zweikanal-sauerstoffzehrungsgerät basierend auf dem Messprinzip nach Clark eingesetzt (Abb. 2), das die Respirationsaktivität zur Messung der Zellvitalität bestimmt. Vom Probevolumen (1-6 mL Submerskultur) wurde isotherm unter Luftausschluss der Sauerstoffgehalt mit einer Messrate von 1 Hz innerhalb weniger Minuten bestimmt. Die erste Ableitung der gemessenen Kurven dient als Maß der Sauerstoffzehrung der Probe.

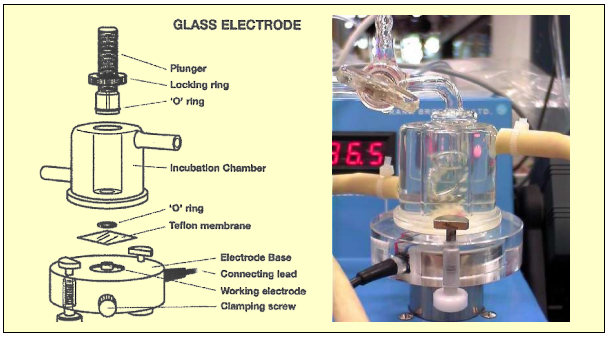


Abb. 2: Zweikanalsauerstoffmessgerät.

- **Proportionalitätsmessungen**

Durch Verdünnungsversuche an Zellkulturen von *Chaetomium globosum* und *Pleurotus sapidus* konnte eine direkte Proportionalität von Respirationsaktivität und Zellmasse festgestellt werden.

- **Monitoring der Zellaktivität**

Eine Limonenzugabe (6 mM) zu einer Zellkultur von *P. sapidus* führte zu einer sofortigen und vollständigen Hemmung der Sauerstoffzehrung, während die Sauerstoffzehrung von *C. globosum* bei einer täglichen Zugabe von 0,8 mM Valencen 48 h nach Dosierung lediglich auf 50 % Sauerstoffzehrung ohne Terpenzugabe sank (45,3 *vs.* 22,9 µg $L^{-1}s^{-1}$).
Abb. 3 zeigt anhand der Zehrung, dass die Stoffwechselaktivität trotz Valencenzugabe über den Kulturverlauf wieder anstieg.

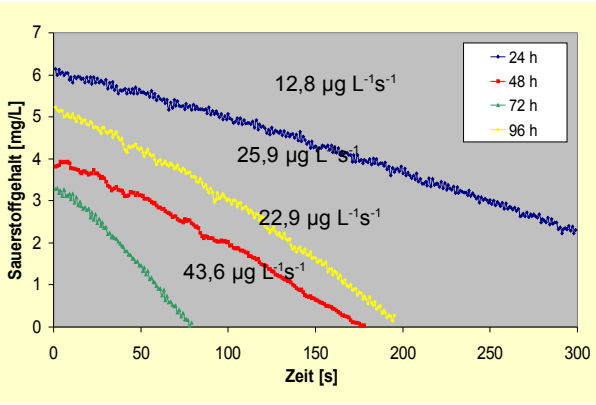


Abb. 3: Anstieg der Sauerstoffzehrung von *C. globosum* bei täglicher (+)-Valencenzugabe (0,8 mM).

- **Vitalitätsmessung**

Bei *C. globosum* war nach vollständigem Glucoseverbrauch eine Restaktivität noch bis zu einem Monat messbar.
Der Sauerstoffverbrauch von *C. globosum* nach fünftägiger, glucosefreier Kultivierung kann durch Glucose- und auch (+)-Valencensupplementierung (167 mM bzw. 0,8 mM, 5-minütige Einwirkzeit) wieder gesteigert werden (Abb.4). Eine Zugabe von m-Kresol (161 mM) erwies sich, erkennbar an der Minderung der Sauerstoffzehrung, als letal.

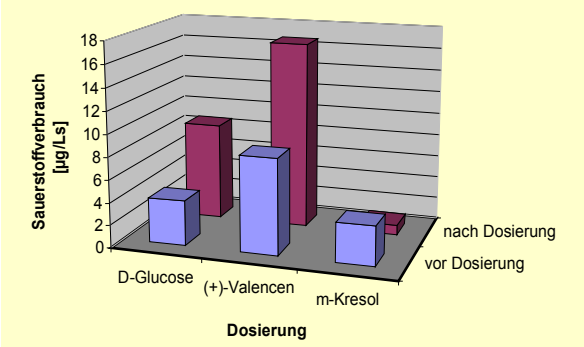


Abb. 4: Sauerstoffzehrung von *C. globosum* in Phosphat-Puffer (pH 7) nach 5 Tagen glucosefreier Kultivierung.

Ausblick

Durch das sensorische Off-line-Monitoring der Sauerstoffzehrung von mycelbildenden Aromastoffproduzenten können letale Substratkonzentrationen im Bioprozess verhindert und maximale Substratkonzentrationen unter Kontrolle der Zellaktivität eingestellt werden.

Literatur

[1] Schrader, J., Berger, R. G. (2001) Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Biotechnology Vol. 10: Special Processes, Rehm, H.J. (ed.), Wiley-VCH, Weinheim, Chapter 13, 374-422.