

Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen - Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen

Volatile fungal metabolites - A possible potential for the industrial production of aroma and fragrance compounds

Key words:

Fungal metabolites, odorous constituents, volatile metabolites, fungal bioconversion, aroma compounds.

Der Bedarf an Riechstoffen und Aromen, ursprünglich fast ausschließlich aus dem Pflanzenreich gedeckt, ist sehr groß und hat steigende Tendenz (SCHINDLER, 1982). Zwar werden die meisten Geruchsstoffe heute von der chemischen Industrie auf der Basis bestimmter Erdölfraktionen hergestellt, doch ist der Anteil der aus höheren Pflanzen gewonnenen ätherischen Öle noch immer bedeutend.

Nachdem pflanzliche Rohstoffquellen aus klimatischen, saisonalen, marktpolitischen u.a. Gründen die steigende Nachfrage nicht immer - und vor allem nicht immer preiswert - decken können, werden heute verschiedentlich Überlegungen angestellt, Mikroorganismen zur Produktion derartiger Stoffe einzusetzen. Gedanken dieser Art liegen nahe, wenn man einerseits an die Fortschritte auf dem Gebiet industrieller Stoffproduktion durch Mikroorganismen denkt und andererseits die zunehmend bekannt werdende Fähigkeit von Mikroorganismen in Erwägung zieht, flüchtige Stoffe zu produzieren, die mindestens zum Teil mit Komponenten des ätherischen Öls höherer Pflanzen identisch sind (SPRECHER, 1979; SCHINDLER u. SCHMID, 1982).

Dies trifft in ganz besonderem Maße für Pilze zu, die schon lange biotechnologisch als Quelle von Nahrungs- bzw. Nahrungszusatzstoffen eingesetzt werden (KURTZMANN, 1983), und die bei der Herstellung von Chemikalien unter Einschluß einiger Arzneistoffe eine bedeutende Rolle spielen (SPRECHER, 1983). Sieht man in bezug auf das vorliegende Thema von einigen speziell pilztypischen Aromen (HANSSEN, 1982), sowie von einigen ubiquitären niederen Alkoholen und Estern ab, so interessieren in dieser Hinsicht vor allem Verbindungen wie niedere Terpene oder Phenylpropanabkömmlinge. Aus diesen und einigen anderen Stoffgruppen wurden - in den letzten Jahren bei Pilzen mit zunehmender Tendenz - neue Verbindungen und zusätzliche

Produktionsorganismen gefunden (Abb. 1).

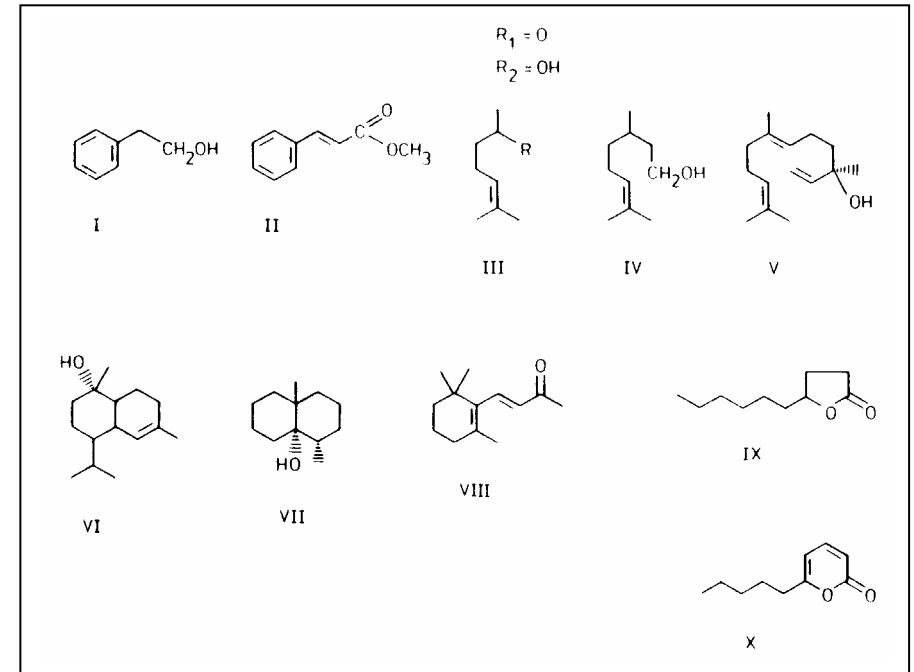


Abb 1 Riechstoffe aus Pilzen. Aromaten: I 2-Phenylethanol (ubiquitär). II Zimtsäuremethylester (*Inocybe odorata*, *Lentinus lepideus*). Terpene und Terpenoide: III 6-Methyl-5-hepten-2-on bzw. ol (*Ceratocystis coerulescens*); IV Citronellol (*Ceratomyces spp.*); V Nerolidol (*Cer. coerulescens*, *Lentinellus cochleatus*). VI alpha-Cadinol (*Clitocybe illudens*, *Lentinus lepideus*), VII Geosmin (*Chaetomium globosum*), VIII beta-Ionon (verschiedene Basidiomyceten), IX 4-Decalacton (*Sporobolomyces roseus*)-, X 6-Pentyl-2-pyrone (*Trichoderma viride*)

Für die industrielle Produktion bestimmter flüchtiger Verbindungen mit Hilfe von Pilzen sind generell folgende Möglichkeiten denkbar: (1) Eine de novo-Synthese durch speziell für diesen Zweck selektierte Pilze unter geeigneten Kulturbedingungen, -(2) die Biotransformation bestimmter Ausgangsstoffe zu den gewünschten Produkten mit Hilfe von Pilzen oder Pilzenzymen. Im folgenden soll über diese beiden Vorgehensweisen berichtet werden.

Die de novo-Synthese von flüchtigen Stoffwechselprodukten durch Pilze

Die Synthese bestimmter Verbindungen des Sekundärstoffwechsels kann eine Eigenschaft der Species oder auch nur bestimmter Stämme einer Art sein (SPRECHER, 1983). Z.B. sind verschiedene Stämme der Ophiostomales-Gattung Ceratocystis in der Lage, flüchtige Terpene und verwandte Verbindungen zu produzieren, wobei jedoch das jeweils ausgebildete Spektrum sehr unterschiedlich sein kann. Sie bilden alle 15 von uns untersuchten Ceratocystis coerulescens-Stämme in allerdings sehr unterschiedlicher Menge 6-Methyl-5-hepten-2-on (Abb. 1, III) und das entsprechende Carbinol, das von den meisten der Stämme darüber hinaus noch mehr oder weniger acetyliert wird. Einige dieser Stämme akkumulieren zusätzlich noch unterschiedliche Mengen ubiquitärer Mono- und Sesquiterpene, während nur wenige 2-Phenylethanol (Abb. 1. I) hervorbringen.

Entsprechende Untersuchungen wurden auch an anderen Pilzen gemacht. So zeigt z.B. Abb. 2, daß der Ceratocystis fimbriata-Stamm RWD 835 C ein interessantes Spektrum von Monoterpenen akkumuliert (vor allem Linalool, Citronellol und Geraniol; Strukturformeln s. Abb. 3), während ein zweiter Stamm dieser Art unter denselben Bedingungen keine Spur von Verbindungen dieser Stoffklasse hervorbringt (HANSSEN u. SPRECHER, 1981). interessanter-weise konnten NABETA u.a. (1980) auch bei + und - Stämmen von Blakesia trispora bemerkenswerte Unterschiede hinsichtlich der Produktion von Monoterpenen entdecken. - Aus derartigen Befunden wird deutlich, daß die Produktion bestimmter Verbindungen gelegentlich species-, in der Regel aber stamm-spezifisch erfolgt. Dies trifft ganz besonders dann zu, wenn auch der quantitative Aspekt der Akkumulation eines Stoffes berücksichtigt wird.

Diese Beobachtungen zeigen, daß für eine industrielle Herstellung - wie bei jeder mikrobiellen Stoffproduktion - zunächst einmal Produktionsstämme selektiert werden müssen. Dabei können unter den Produzenten einer bestimmten Verbindung bereits bei einem Screening aus natürlichem Vorkommen quantitative Unterschiede im Verhältnis 1 zu mehreren Tausend auftreten (Tab. 1 und 2). In jedem Fall wird von dem jeweiligen Pilz eine ganze Palette von 20 - 70, ja über 100 verschiedener flüchtiger Metabolite gebildet. Doch kann u.U. auch eine

Hauptkomponente bis zu 80 oder 90 % des produzierten Stoffgemisches ausmachen. - Der Einfluß des Kulturalters und damit der Pilzentwicklung auf die qualitative und quantitative Ausbildung des Spektrums flüchtiger Stoffwechselprodukte wird in Abb. 3 deutlich.

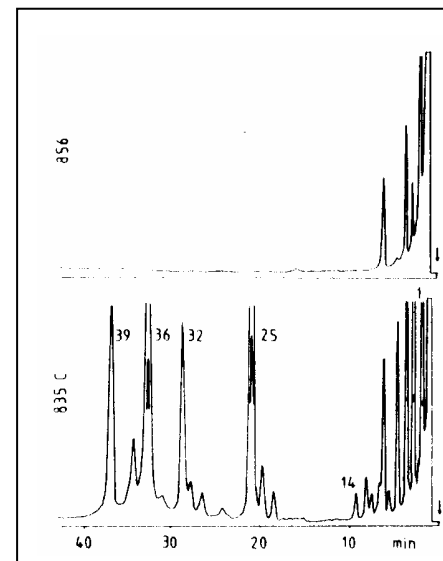


Abb. 2 Gaschromatographischer Nachweis der Stämme spezifischen Monoterpenproduktion bei Ceratocystis fimbriata Stamm RWD 835 und Stamm RWD 856 (Aus HANSSEN u. SPRECHER, 1981) 1 - 14 niedere Alkohole u Ester sowie Monoterpenkohlenwasserstoffe: 25 Linalool: 32 alpha-Terpineol: 36 Citronellol: 39 Geraniol

Die Bedeutung der Kulturbedingungen für die Akkumulation bestimmter Metabolite kann - wie generell beim Sekundärstoffwechsel - auch bei der Produktion flüchtiger Verbindungen kaum überschätzt werden. Als Beispiel dafür mögen einige Versuche dienen, bei denen lediglich die N-Quelle des Nährsubstrates variiert wurde. So zeigt z.B. Tab. 2 die unterschiedliche Stoffproduktion von 2 Stämmen eines Basidiomyceten auf zwei Nährstofflösungen, die nur hinsichtlich der N-Quelle differieren. Darüber hinaus können selbst biogenetisch nahe miteinander verwandte Aminosäuren wie Asparagin- und Glutaminsäure als einzige N-Quelle die Produktion flüchtiger Metabolite quantitativ sehr unterschiedlich (im Verhältnis 1:10) beeinflussen (SPRECHER, 1980).

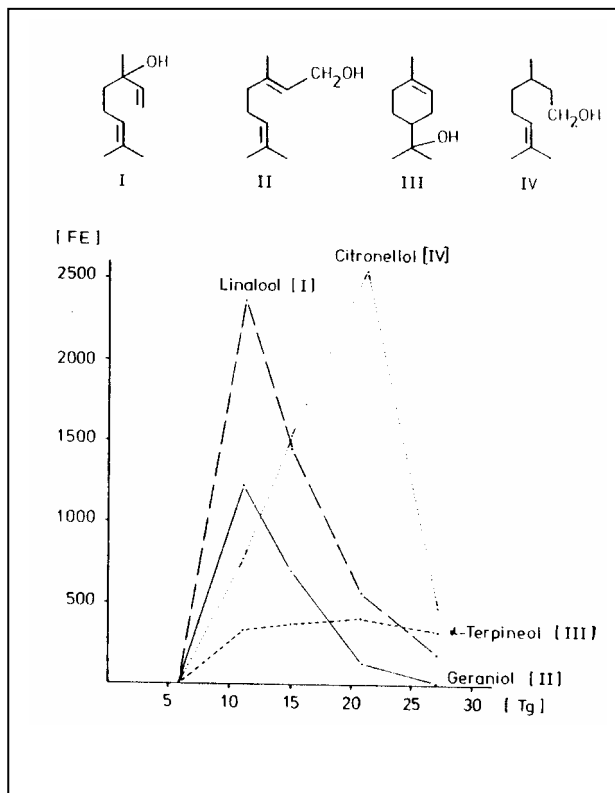


Abb. 3. Terpenproduktion In Abhängigkeit von der Kulturdauer durch *Ceratocystis fimbriata* Stamm RWD 835c unter Standardbedingungen

Tab. 3 zeigt schließlich auch die beträchtlichen qualitativen Differenzen in der Akkumulation flüchtiger Metabolite unter Kulturbedingungen, die sich lediglich hinsichtlich der N-Quelle unterscheiden: während die Asparaginkultur 26% Methylheptenylkörper und 43% Sesquiterpene enthält, sind bei demselben Pilz in der Nitratkultur nur geringe Mengen oder überhaupt keine Komponenten dieser Stoffklasse zu verzeichnen; im letzteren Falle machen die beiden Mono-terpenaldehyde Neral und Geranial nahezu 60% des Gesamtöls aus. -Auch Variationen im Hinblick auf die C-Quelle oder das Ionenmil-lieu können - wie aus jedem Lehrbuch der Biotechnologie bekannt -beträchtliche qualitative und quantitative Verschiebungen in der Stoffwechselproduktion bewirken.

Tab 1: Mono- und Sesquiterpenakkumulation bei Stämmen von *Ceratocystis coerulescens* auf Standard-Nährmedium (nach HANSSEN und SPRECHER. 1981)

Stamm	Monoterpene	Sesquiterpene
RWD 774	Spur	Spur
RWD 705	2340	3680
RWD 50	4410	170

•) Peak-Flächeneinheiten des Gaschromatogramms

Tab 2: Akkumulation flüchtiger Metabolite bei zwei Stämmen von *Lentinus lepideus* auf Standard-Nährmedium mit verschiedenen N-Quellen

N Quelle	Stamm	Sesquiterpene	Zimtsäurederivate
0,1% Asparagin	FPRL 7b	5*)	780
	IFB 27b	3	1260
0,15% iso-Leucin	FPRL 7b	600	50
	IFB 27b	40	4

•) Peak-Flächeneinheiten des Gaschromatogramms

Tab 3: Prozentuale Zusammensetzung des Wasserdampfdestillates von *Ceratocystis coerulescens* RWD 705 auf definierten „Standard“-Nährmedien mit unterschiedlicher N-Quelle

N-Quelle	0.1% Asparagin	0.1% KNO ₃
6-Methyl-5-hepten-2-on	25	2
bz.-ol		
Monoterpene (insgesamt)	33	98
davon; Aldehyde		
Neral	-	18
Geranial	1	41
Alkohole		
Linalool	-	4
Geraniol	1	10
Citronellol	17	25
Ester		
Citronellyl-acetat	14	-
Sesquiterpene (v. a. Dihydrofarnesol)	42	-

Die Beobachtungen über den Einfluß der Belüftung auf die Produktion flüchtiger Substanzen sind etwas widersprüchlich; Nachdem die vermehrte O₂-Zufuhr in Schüttelkulturen bei verschiedenen Stämmen von *Ceratocystis coerulescens* eine geringere Produktion flüchtiger Stoffwechselprodukte ergeben

hatte, wurden diese Versuche zunächst abgebrochen, inzwischen konnten SCHINDLER u. BRUNS (1980), und in der Folge davon auch HANSSEN (1982) unter den Bedingungen der Schüttelkultur bei *Ceratocystis variopora*-Stämmen eine Steigerung dieser Produktion erreichen.

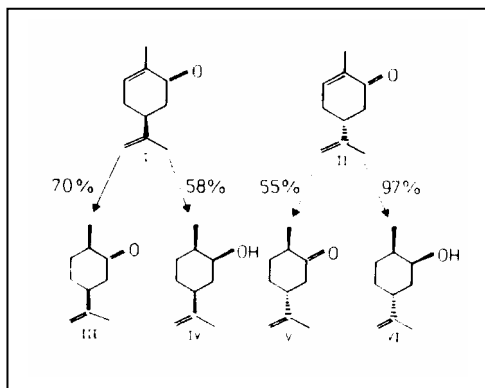


Abb. 4. Umwandlung von (+) und (-)-Carvon durch *Cera-tocystis* spp. (Maximalausbeuten); I: (+)-Carvon; II (-)-Carvon; III: (-)-iso-Dihydrocarvon (*C. coerulescens* RWD 700); IV: (-)-neo-iso-Dihydrocarveol (*C. coerulescens* RWD 765 M); V: (+)-Dihydrocarvon (*C. fimbriata* RWD 835 C); VI (+)-neo-Dihydrocarveol (*C. coerulescens* RWD 700)

Durch Zusätze der vom Pilz gebildeten lipophilen flüchtigen Meta-bolite zu Pilzkulturen läßt sich sehr rasch zeigen, daß bereits relativ niedere Konzentrationen derartiger Verbindungen toxisch auf den Produzenten wirken. Da hierfür vor allem eine Wirkung auf die Pilzmembranen in Frage kommt, kann diese Toxizität im Grunde nur durch eine Verringerung der wirksamen Konzentrationen dieser lipophilen Agenzien vermieden werden. Verschiedene Versuche in dieser Richtung (SCHINDLER und E-BRUNS, 1980; SCHINDLER, 1982; BECKER und HEROLD, 1983) brachten bereits Erfolge, bei denen in einem Fall die Terpenausbeute (im wesentlichen Geraniol) in Fermenterkulturen (20 l) eines Stammes von *Ceratocystis variopora* auf 1,9 g/l gesteigert werden konnte (SCHINDLER, 1982a). Dabei wurden den Kulturen direkt oder in einem Nebenschluß lipo-phile Adsorbentien wie z.B. Amberlite XAD zugesetzt. Da SCHINDLER (1982) bei seinen Versuchen mit dieser relativ hohen Ausbeute für den Fermentationsprozeß durchaus industrieübliche Nährmedien verwendete, dürfte - zumindest von

der Rohstoffseite her - auch nach unseren Erfahrungen, einer industriellen Produktion nichts im Wege stehen.

Allerdings wird - unter der Voraussetzung einer auch weiterhin preiswerten Produktion flüchtiger Riechstoffe auf Erdölbasis - die Herstellung derartiger Stoffe auf mikrobiellem Wege wohl nur für wenige kompliziert aufgebaute Verbindungen interessant sein. Eher könnte ihre Herstellung als Nebenprodukt des Aufschlusses gewisser billiger Biomaterialien eine Rolle spielen. Hierbei ist z.B. an industrielle Abfälle zu denken, aus denen sowohl eine Neusynthese von Aroma- und Riechstoffen wie auch eine gezielte Biotransformation von im Substrat vorhandenen Precursoren denkbar ist. Als Beispiel sei die Verwertung von Citrus-Rückständen genannt, die bei der Herstellung von Fruchtsäften anfallen. Die Verwendung von Blättern oder Destillaten aus *Euphorbia*- oder *Eu-calyptus*-Arten wurde von NISHIMURA u.a. (1982) in Erwägung gezogen.

Die Biotransformation geeigneter Precursoren zu flüchtigen Stoffwechselprodukten

Im Gegensatz zur de novo-Synthese durch Mikroorganismen könnte sich für die Industrie in absehbarer Zeit die Biokonversion von natürlichen oder synthetischen Rohstoffen zu bestimmten, relativ kompliziert aufgebauten Riechstoffen durchaus auch auf breiterer Basis lohnen. Entsprechende Patente existieren bereits seit den siebziger Jahren (SCHINDLER und SCHMID, 1982).

Als ein Beispiel für die Kapazität von Pilzen zur regio- und stereoselektiven Biokonversion sei auf einige Ergebnisse der Carvon-Transformation durch einige Stämme von *Ceratocystis coerulescens*, *C. Fimbriata* bzw. *C. cana* hingewiesen (MARCUS, 1978; VELLNAGEL, 1983): Abb. 4. Während durch Zusatz von (+)- bzw. (-)-Carvon zu den betreffenden Pilzkulturen die entsprechenden (+)-bzw. (-)-cis- oder trans-Carveole nur durch einzelne der geprüften Stämme in geringer Ausbeute erhalten werden, entstehen je nach verwendetem Stamm Dihydrocarvon und Dihydrocarveolverbindungen -allerdings mit umgekehrten Vorzeichen. Weitere Beispiele sind in den beiden vorgenannten Arbeiten aufgeführt, sowie bei KIESLICH (1976).

Für Biokonversionen eignen sich neben bestimmten Pilzen und anderen Mikroorganismen auch Zellkulturen höherer Pflanzen (GALUN u. a., 1983) sowie einige Enzyme aus diesen Organismen,

In Einzelfällen wurden dabei bereits Immobilisierungstechniken hinsichtlich Organismen und Enzymen angewandt (GALUN u.a., 1983). Ebenso liegen in der Fermentationsindustrie bereits Erfahrungen mit fixierten Hefen vor (ROSINI u.a., 1982). Allerdings bestehen bei den für eine industrielle Produktion notwendigen Konzentrationen der als Ausgangsmaterial dienenden und der neugebildeten lipophilen Verbindungen hinsichtlich ihrer Löslichkeit bzw. Toxizität ernsthafte Schwierigkeiten. In welchem Umfange diese mit Hilfe wäßriger Zweiphasensysteme behebbar sind, wird die Zukunft zeigen (SCHINDLER und BRUNS, 1980; MATTIASSON, 1983; BECKER und HEROLD, 1983).

Der DFG danken wir für eine Sachbeihilfe, Herrn R. W. DAVIDSON (Colorado State University, Fort Collins, CO 80521) für die zur Verfügung gestellten Stämme von Ceratocystis.

Prof. Dr. Ewald Sprecher und Dr. Hans-Peter Hanssen, Lehrstuhl für Pharmakognosie der Universität Hamburg, Bundesstraße 43, D-2000 Hamburg 13

Literatur

- BECKER, H., HEROLD, S. 1983: RP-8 als Hilfsphase zur Akkumulation von Valepotriaten auf Zeilsuspensionskulturen von *Valeriana wallich*, *Im Druck*
- GALUN, E., AVIV, D., DANTES A., FREEMAN, A. 1983: Bio-transformation by Plant Cells immobilized in Cross-Linked Polyacrylamide-hydrazide. *Planta medica* **49**, 9-13
- HANSSSEN, H-P. 1982: Pilzaromen - Aromen aus Pilzen *Deutsche Lebensmittel Rundschau* **78**, 435-440
- HANSSSEN, H.-P., SPRECHER, E. 1981: Aroma-Producing Fungi: Influence of strain specificity and culture conditions on aroma production. (P Schreier ed.), Walter de Gruyter, Berlin, New York 458 - 556
- KIESLICH, K. 1976: Microbial transformations of non-steroid cyclic compounds Thieme, Stuttgart
- KURTZMANN, C. P 1983: Fungi-Sources of food, fuel, and biochemicals. *Mycologia* **75**, 374-382
- MARCUS, F. K. 1978: Über die Wirkung des Zusatzes von Monoterpenen auf Pilzwachstum und Sekundärstoffproduktion von *Ceratocystis coerulescens* BAKSHI (MÜNCH) sowie über die Transformation der zugesetzten Verbindungen. Diss Univ. Hamburg
- MATTIASSON, B. 1983: Applications of aqueous two-phase Systems in biotechnology. *Trends in Biotechnology* **1**, 16-20
- NABETA, K. NISHIMORI, I., SATO, S., SUGISAWA, H. 1980: Volatile constituents of plus and minus strains of *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry* **19**, 1133- 1135
- NISHIMURA, H., NOMA, Y., MIZUTANI, J. 1982: Eucalyptus as Biomass. Novel Compounds from Microbial

- Conversion of 1,8-Cineole. *Agric. Biol. Chemis.* **46**, 2601 - 2604
- ROSINI, G. FEDERICI, F. VAUGHAN, A. E., MARTINI, A. 1982: Systematics of the species of the yeast *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. *European J Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 188 - 193
- SCHINDLER, J. 1982: Mikrobielle Gewinnung von Terpenen Henkel Referate **18**, 24-27
- SCHINDLER, J. 1982a Terpenoids by Microbial Fermentation. I & EC Product & Development **21**, 537-539
- SCHINDLER, J. BRUNS, K. 1982: Verfahren zur fermentativen Gewinnung monoterpenhaltiger Riechstoffe. *Patentschrift* 2840143
- SCHINDLER, J., SCHMID, R. D. 1982: Fragrance or Aroma Chemicals - Microbial Synthesis and Enzymatic Transformation - A Review. *Process Biochemistry* **17**, 2-8
- SPRECHER, E. 1979: Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Mikroorganismen. In: Vorkommen und Analytik äther. Öle. Ed. K. H. Kubeczka. Thieme, Stuttgart
- SPRECHER, E. 1983: Arzneistoffproduktion durch Mikroorganismen. *Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart*
- VELLNAGEL, Ch. 1983: Untersuchungen über die Bio-transformation von Zusätzen (Alkoholen, Aldehyden und Ketonen) durch Pilze der Gattung *Ceratocystis* Ellis & Halst, sowie die Wirkung dieser Zusätze auf das Pilzwachstum und die Sekundärstoffproduktion. Diss. Univ. Hamburg

Vorstehender Beitrag "Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen - Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen" wurde dem FORUM MIKROBIOLOGIE, aktuelles Nachrichtenmagazin für Mikrobiologie und Hygiene, Heft 1/85: 17 - 21, GIT-Verlag Ernst Giebel, entnommen. Der Nachdruck erfolgte mit freundlicher Genehmigung der Wiss. Schriftleitung, Prof. Dr. H. J. Kutzner, Darmstadt.

Ewald Kajan

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [APN - Mitteilungsblatt der Arbeitsgemeinschaft Pilzkunde Niederrhein](#)

Jahr/Year: 1985

Band/Volume: [3_1985](#)

Autor(en)/Author(s): Kajan Ewald

Artikel/Article: [Flüchtige Stoffwechselprodukte aus Pilzen - Ein mögliches Potential für die industrielle Gewinnung von Aromen und Riechstoffen 160-169](#)