

**Zellkultur von Shiitake -
Schwefelmetabolismus und Lentinsäurebildung im
Speisepilz *Lentinus edodes***

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

Sabine Spaether

geboren am 18. Juni 1968 in Herford

Hannover 2000

Zusammenfassung

Die Nährstoffansprüche eines Stammes des Speisepilzes *Lentinus edodes* (Shiitake) wurden in Submerskultur durch empirische Vorgehensweise ermittelt und die Produktion von Biomasse mit Hilfe statistischer Versuchspläne (PLACKETT-BURMAN-Design) weiter optimiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß verschiedene Zuckersäuren auch in polymerer Form sowie Calcium und Mangan das Wachstum positiv beeinflussten. Die Kultivierung im Bioreaktor stellte eine erste „upscaling“-Stufe dar, mit der eine vergleichbar gute Ausbeute an Biomasse erzielt werden konnte. Dies ist besonders im Hinblick auf die industrielle Kultivierung des untersuchten Stammes von Interesse, da das Pilzmycel als Inoculum für eine schnelle Besiedlung des entsprechenden Substrats in ausreichender Menge zur Verfügung stehen muß. Das optimierte Nährmedium war darüber hinaus für den Einsatz zur Fruchtkörpererzeugung geeignet, wie Versuche im Labormaßstab bestätigen konnten.

Aus dem Aromaprecursor Lentinsäure entstehen durch enzymatischen Abbau cyclische und nicht-cyclische Polysulfide, die dem Shiitake sein charakteristisches Aroma nach Knoblauch und Rettich verleihen. Die nach einer literaturbeschriebenen Methode isolierte Lentinsäure, deren Identität durch Elementaranalyse, IR und NMR abgesichert wurde, wurde als Standardsubstanz zur Entwicklung einer quantitativen Analysenmethode verwendet. Die Bestimmung aller Aminosäuren einschließlich der Lentinsäure aus den Submerskulturen verschiedener Stämme von *Lentinus edodes* gelang durch Vorsäulenderivatisierung mit FMOC/ADAM mit anschließender Analyse per RP-HPLC und Fluoreszenzdetektion.

Eine Steigerung des Lentinsäuregehaltes konnte bei fast allen untersuchten Stämmen durch Zusatz von schwefelhaltigen Precursoren erzielt werden. Dabei erwiesen sich die Aminosäure L-Methionin als effektiver organischer und Natriumsulfid bzw. -thiosulfat als effektive anorganische Precursoren. Trotz der im Standardnährmedium im Überschuss vorhandenen Schwefelquelle in Form von Sulfat (ca. 12 mmol L^{-1}), konnte durch den Zusatz geringer Mengen des Precursors zum Nährmedium (1 mmol L^{-1}) der Lentinsäuregehalt im Falle des Methionins um mehr als 30% und im Falle von Natriumsulfid bzw. -thiosulfat um mehr als 70% bzw. 50% gesteigert werden. Ein Vergleich der Kultivierung in schwefelfreiem mit einem Nährmedium unter Zusatz anorganischer Schwefelquellen zeigte, daß *Lentinus edodes* die Biosynthese der Lentinsäure mit Hilfe von Sulfat realisieren kann.

Ein Vergleich zwischen Fruchtkörpern und Submerskultur konnte bei der Analyse des endogenen Metabolits Lentinsäure vor allem quantitative Unterschiede aufdecken, die sich auch bei der Gewinnung der Aromastoffe fortsetzte. In den gewonnenen Aromaextrakten aus frischen Shiitake und den Submerskulturen wurden als Hauptkomponenten die drei cyclischen Polysulfide 1,2,4-Trithiolan, 1,2,4,5-Tetrathian und 1,2,3,5,6-Pentathiepan (Lenthionin) identifiziert. Bei der olfaktorischen Untersuchung ergaben sich für diese drei Verbindungen charakteristische Gerüche nach Knoblauch und Rettich, die für das Shiitake-Aroma typisch sind.

Schlagworte: *Lentinus edodes*, Nährmedienoptimierung, Lentinsäure, schwefelhaltige Precursoren, schwefelhaltige Aromastoffe

Summary

The demand in terms of nutritions of the edible mushroom *Lentinus edodes* had been determined empirically from submerged cultivation, and the production of biomass could be optimized with help of statistical experimental setups (PLACKETT-BURMAN-design).

It was found that different uronic and aldonic acids even with polymeric structure, calcium and manganese have a positive influence on the growth behaviour. Cultivation in a 5 L-fermentor as a first scale up step showed comparable yields of biomass. This is of special interest for the industrial cultivation of the Shiitake since the mycelium as inoculum has to be provided in sufficient amounts in order to achieve a fast growth on special substrates. The optimized nutrition medium can be used for the formation of mushroom fruiting bodies as experiments on lab scale could show.

The flavour precursor Lentinic acid is converted into cyclic and non-cyclic polysulfides via enzymatic processes and give the Shiitake its typical flavour of garlic and radish. Lentinic acid could be isolated according to literature known methods and was used as a standard substance for the development of a quantitative analytical method. The determination of the whole set of amino acids, including lentinic acid, according to this method could be achieved by precolumn derivatization with FMOC/ADAM with subsequent analysis via RP-HPLC and fluorescence detection.

Increase of the amount of lentinic acid could be achieved at almost all examined Shiitake strains with addition of sulfur containing precursors. Despite of the abundance of sulfates (about 12 mmole L⁻¹) in the standard nutrition medium, the amount of lentinic acid could be increased with addition of methionine by 30%, in the case of sodium sulfide and sodium thiosulfate by 70 % resp. by 50 %. Comparison of the cultivation in sulfur free and inorganic sulfur containing nutrition media showed that the biosynthesis of lentinic acid can be achieved with sulfate.

Comparison between fruiting bodies and the submerged cultures showed only quantitative differences with respect to the endogenous metabolite lentinic acid and showed the same trend at the isolation of the aroma compounds. The aroma extracts out of fresh Shiitake and submerged cultures showed that the three cyclic polysulfides 1,2,4-trithiolane, 1,2,4,5-tetrathiane and 1,2,3,5,6-pentathiepane (lenthionine) are major components. The GC-Olfactometry of the three compounds showed the characteristic flavour of garlic and radish - typical for the Shiitake aroma.

Key words: *Lentinus edodes*, optimization of nutrition medium, lentinic acid, sulfur containing flavour compounds

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung	3
2 Ergebnisse	5
2.1 Untersuchungen zu den Kultivierungsbedingungen	5
2.1.1 Vorbemerkung	5
2.1.2 Variation physikalischer Kulturparameter	6
2.1.2.1 Temperatur	6
2.1.2.2 Sauerstoffversorgung	6
2.1.3 Variation des Nährmediums SNL-H	7
2.1.3.1 Hefeextrakt	7
2.1.3.2 Glutamin	8
2.1.3.3 Sterilfiltriertes SNL-H-Medium	9
2.1.3.4 Holzmehl-Medium	10
2.1.4 Variation des Nährmediums SNL-B ₁	12
2.1.4.1 Kulturverlauf in SNL-B ₁ und SNL-B ₁ -Gln	12
2.1.4.2 Variation der Stickstoffquelle in SNL-B ₁	13
2.1.4.3 Variation der Kohlenstoffquelle in SNL-B ₁	14
2.1.4.4 Ethanol als C-Quelle in SNL-B ₁	14
2.1.5 Komplexe Nährmedien	15
2.1.5.1 Shiitake-Medium	15
2.1.5.2 Malzextrakt-Sojapepton-Medium	16
2.1.6 Definierte Nährmedien	17
2.1.6.1 Synthetisches Medium nach LEATHAM	17
2.1.6.2 Variation der Inoculummenge	19
2.1.7 Kultivierung von <i>Lentinus edodes</i> im Laborbioreaktor	21

2.2 Einsatz faktorieller Versuchspläne zur Optimierung von LEATHAM-Medium	22
2.2.1 Plackett-Burman-Design	22
2.2.1.1 Vorbemerkung	22
2.2.1.2 Aufstellung des Versuchsplans	23
2.2.1.3 Wachstumskurve und Effekte des PLACKETT-BURMAN-Designs 1	25
2.2.1.4 Versuchsplan für PLACKETT-BURMAN-Design 2	28
2.2.1.5 Wachstumskurve und Effekte des PLACKETT-BURMAN-Designs 2	30
2.2.2 Optimierung des LEATHAM-Mediums	33
2.2.2.1 Glucuronsäure	33
2.2.2.2 Mangan	36
2.2.2.3 Fruchtkörpererzeugung mit optimiertem Kulturmedium	37
2.3 Isolierung, Charakterisierung und Analytik des Aromaprecursors	
Lentinsäure	38
2.3.1 Vorbemerkungen	38
2.3.2 Isolierung aus Fruchtkörpern	39
2.3.3 Charakterisierung der Lentinsäure	41
2.3.3.1 Elementaranalyse	41
2.3.3.2 IR-Spektrum	41
2.3.3.3 NMR-Spektren	43
2.3.3.4 Massenspektrum	45
2.3.4 Analytik der Lentinsäure	46
2.3.4.1 Vorbemerkung	46
2.3.4.2 Aufarbeitung der Submerskulturen zur Lentinsäure-Bestimmung	46
2.3.4.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	48
2.4 Zusatz von Precursoren zur Steigerung des Lentinsäuregehaltes	50
2.4.1 Vorbemerkung	50
2.4.2 Aminosäuregehalte in Submerskulturen von <i>Lentinus edodes</i>	51
2.4.3 Lentinsäuregehalte aus Submerskulturen ohne Zusatz von Precursoren	53
2.4.4 Zusatz von L-Cystein	54
2.4.4.1 Bestimmung der Lentinsäuregehalte	54
2.4.4.2 Bestimmung der Cysteingehalte	59
2.4.5 Zusatz von L-Methionin	61
2.4.5.1 Einfluß der Konzentration von L-Methionin	66
2.4.6 Lentinsäuregehalte in schwefelfreiem LEATHAM-Medium	68
2.4.7 Zusatz von anorganischen Precursoren	74
2.4.7.1 Natriumsulfid	75
2.4.7.2 Natriumthiosulfat	76

2.5 Untersuchungen des Aromaprofils von <i>Lentinus edodes</i>	77
2.5.1 Gewinnung des Aromaextraktes aus frischen Shiitake	77
2.5.2 Untersuchung des Aromaextrakte aus frischen Shiitake	79
2.5.2.1 GC-AED und GC-MS	79
2.5.3 Gewinnung des Aromaextraktes aus Submerskulturen	87
2.5.4 Untersuchung des Aromaextrakte aus Submerskulturen	88
2.5.4.1 GC-AED und GC-MS	88
2.5.4.2 Olfaktorische Eigenschaften des Aromaextraktes aus frischen Shiitake-Fruchtkörpern	89
3 Diskussion	91
3.1 Biotechnologischer Einsatz von Basidiomyceten	91
3.2 Optimierung physikalischer Parameter und der Nährmedienzusammensetzung	92
3.2.1 Temperatur	93
3.2.2 Sauerstoffversorgung	94
3.2.3 Medienzubereitung	94
3.2.4 C-Quelle	95
3.2.4.1 Heterotrophe Ernährung bei Pilzen	95
3.2.4.2 Variation der C-Quelle	96
3.2.5 N-Quelle	97
3.2.6 Definiertes Nährmedium nach LEATHAM	99
3.2.6.1 Glucuronsäure, Gluconsäure, Galakturonsäure, Pektin	99
3.2.7 Anorganische Substanzen mit Ausnahme von Schwefel	101
3.2.7.1 Mangan	102
3.2.7.2 Calcium	103
3.2.7.3 Vitamine und Wachstumsfaktoren	104
3.2.7.4 Bioreaktorversuche zur Prozeßvergrößerung	105
3.2.7.5 Fruchtkörpererzeugung mit optimiertem LEATHAM-Medium	107
3.3 Der Aromaprecursor Lentinsäure	109
3.3.1 Vorkommen, Struktur und Isolierung	109
3.3.2 Isolierung der Lentinsäure	111
3.3.3 Biosynthese von γ -Glytamylopeptiden	113
3.3.4 Schwefelmetabolismus	114
3.3.4.1 Schwefelassimilation	115
3.3.4.2 Biosynthese schwefelhaltiger Aminosäuren und Peptide	116
3.3.4.3 Möglicher Bildungsweg für Cysteinsulfoxidderivate	117

3.3.5	Precursorstudien bei <i>Lentinus edodes</i>	117
3.3.5.1	Lentinsäuregehalte in Nährmedium mit sulfathaltiger S-Quelle	117
3.3.5.2	Lentinsäuregehalte in Nährmedium ohne Schwefel-Quelle	118
3.3.5.3	Organische Precursoren	120
3.3.5.4	Anorganische Precursoren	122
3.3.5.5	Schwefelbilanz	123
3.3.5.6	Kritische Betrachtung von Precursorexperimenten	123
3.3.6	Die Aromastoffe in Shiitake	124
3.3.6.1	C ₈ -Verbindungen	124
3.3.6.2	Schwefelhaltige Aromastoffe	126
3.3.6.3	Physiologische Bedeutung der Aromastoffe	129
3.3.6.4	Aromaextrakte aus Submerskulturen	129
3.4	Ausblick	130
4	Material und Methoden	132
4.1	Untersuchungsmaterial	132
4.2	Pilzkulturen	132
4.3	Kultivierung	133
4.3.1	Stammhaltung	133
4.3.2	Standardbedingungen für Submerskulturen	133
4.3.3	Vorkulturen	133
4.3.3.1	Vorkulturen 1	133
4.3.3.2	Vorkulturen 2	133
4.3.3.3	Vorkulturen 3	134
4.3.4	Experimentelle Kulturen	134
4.3.5	Inoculumbereitung	134
4.3.6	Zusatz von Precursoren	134
4.3.7	Kultivierung im Bioreaktor	135
4.3.8	Kultivierung zur Fruchtkörpererzeugung	135
4.3.9	Kulturparameter	136
4.3.9.1	pH-Wert	136
4.3.9.2	Glucosegehalt	136
4.3.9.3	Biotrockenmasse	136
4.4	Kulturmedien	136
4.4.1	Herstellung steriler Kulturmedien	136

4.4.2	Standardkulturmedien	137
4.4.2.1	Standardnährlösung-B ₁	137
4.4.2.2	Standardnährmedium-Hefe	137
4.4.2.3	SNL-H-Agar	137
4.4.2.4	LEATHAM-Medium	138
4.4.3	Nährmedien	139
4.4.3.1	SNL-H-doppelt	139
4.4.3.2	Holzmehl-Medium	139
4.4.3.3	SNL-H-Gln	139
4.4.3.4	SNL-B ₁ -N	139
4.4.3.5	SNL-B ₁ -C	139
4.4.3.6	Shiitake-Medium	139
4.4.3.7	Malzextrakt-Sojapepton-Medium	140
4.4.3.8	LEATHAM-Medium-schwefelfrei	140
4.4.3.9	LEATHAM-Medium mit variierter C-Quelle	140
4.4.3.10	LEATHAM-Medium mit variierten Mangan-Konzentrationen	140
4.4.3.11	Optimiertes LEATHAM-Medium	141
4.4.3.12	Faktorieller Versuchplan (PLACKETT-BURMAN-Design)	141
4.4.4	Nährmedienbestandteile	141
4.5	Geräte in der Mikrobiologie	144
4.5.1	Steriles Arbeiten	144
4.5.2	Kultivierung	144
4.5.3	Aufarbeitung	144
4.5.4	Bioreaktor	145
4.6	Chemikalien, Lösungsmittel, Gase und sonstige Geräte	145
4.6.1	Chemikalien	145
4.6.2	Lösungsmittel	146
4.6.3	Gase	147
4.6.4	Sonstige Laborgeräte	147
4.7	Probenvorbereitung	147
4.7.1	Aufarbeitung von Pilzen für die Isolierung von Lentinsäure	147
4.7.1.1	Rohextrakt aus getrockneten Fruchtkörpern	147
4.7.1.2	Rohextrakt aus frischen Fruchtkörpern	148
4.7.1.3	IR 120-Extrakt	148
4.7.1.4	Sephadex [®] DEAE A-25-Extrakt	148

4.7.2	Aufarbeitung von Pilzen zur Gewinnung der Aromastoffe	149
4.7.2.1	Rohextrakt	149
4.7.2.2	Kontinuierliche Flüssig/Flüssig-Extraktion	149
4.7.2.3	Soxhlet-Extraktion	149
4.7.3	Aufarbeitung von Pilzmycel aus Submerskulturen für die HPLC	150
4.7.4	Aufarbeitung von Pilzmycel aus dem Bioreaktor	150
4.8	Analytik	151
4.8.1	Ionenaustauschchromatographie	151
4.8.1.1	Stark saurer Kationenaustauscher Amberlite IR 120	151
4.8.1.2	Schwach basischer Anionenaustauscher Sephadex® DEAE A-25	151
4.8.2	Dünnschichtchromatographie	152
4.8.3	Hochleistungsflüssigchromatographie	152
4.8.3.1	HPLC mit Fluoreszenzdetektor	152
4.8.3.2	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	153
4.8.4	Kapillargaschromatographie	154
4.8.4.1	HRGC mit On-Column-Injektion und olfaktorischer Detektion	154
4.8.4.2	HRGC mit On-Column-Injektion und massenselektivem Detektor	154
4.8.4.3	HRGC mit Atom-Emission-Detektor	155
4.8.4.4	Berechnung von Kovats-Indices	155
4.8.5	Elementaranalyse	156
4.8.6	Spektroskopische Methoden	156
4.8.6.1	Infrarot-Spektroskopie	156
4.8.6.2	Kernresonanzspektroskopie	156
4.9	Entsorgungshinweise	157
4.9.1	Biologisches Material	157
4.9.2	Lösungsmittel und Chemikalien	157
5	Literatur	158
6	Anhang	167

1 Einleitung

Im allgemeinen Sprachgebrauch versteht man unter Pilzen die Klasse der hochentwickelten Ständerpilze (Basidiomyceten), die in Form von differenzierten Fruchtkörpern in Erscheinung treten. Die Bedeutung der Fruchtkörper von Pilzen in der menschlichen Ernährung geht in prähistorische Zeiten zurück, als die Menschen noch als Sammler ihren Nahrungsbedarf deckten. Die Pharaonen schätzten Pilze als Delikatesse, die Griechen glaubten, daß sie Kriegern Stärke verleihen würden. Bei den Römern betrachtete man sie sogar als „Speise der Götter“ und verzehrte sie daher nur zu besonderen Festen [1].

Zu dem Organismenreich der Mycobionta (Pilze) zählen mehr als 250 000 Spezies, von denen rund 10 000 Fruchtkörper ausbilden. Diese Gruppe umfaßt ca. 2000 prinzipiell eßbare Arten, von denen allerdings nur 80 versuchsweise kultiviert wurden. 40 Arten werden wirtschaftlich genutzt und nur die Hälfte dieser Pilze agroindustriell angebaut. Die Kultivierung von einigen Speisepilzen wie dem Steinpilz oder verschiedenen Trüffelarten, die wirtschaftlich von Bedeutung sind, ist bis heute nicht gelungen, da sie zu den obligaten Mykorrhiza-pilzen gehören. Nur etwa 5 bis 6 Arten werden in großindustriellen Produktionen angebaut, die globale Bedeutung haben [2].

Der zunehmende Stellenwert der Kultur von Speisepilzen spiegelt sich in den steigenden Zahlen der Weltproduktion wider. Die Ursache für die große Nachfrage nach Kulturspeisepilzen hat verschiedene Gründe. Pilze werden hauptsächlich wegen ihres charakteristischen Geschmacks und Aromas verzehrt, wobei die Zuchtpilze bei denen die Unsicherheiten bzgl. der genießbarkeit bzw. die Risiken der Belastung mit Schwermetallen ausgeschlossen sind, einen großen Vorteil gegenüber den gesammelten wildwachsenen Pilzen haben. Darüber hinaus sind sie aufgrund ihrer Kultivierungsbedingungen nahezu das ganze Jahr verfügbar, während die wildwachsenen Pilze nur saisonale Bedeutung haben [3].

Neben ihren geschmacklichen Vorzügen spielt heutzutage die ernährungsphysiologische Bedeutung eines Lebensmittels eine immer größere Rolle. In Untersuchungen Ende des 19. Jahrhunderts schätzte man den Proteingehalt des Speisepilzes so hoch ein, daß Pilze sogar als „Fleisch des Waldes“ bezeichnet wurden. Obwohl das Pilzprotein durchaus wertvoll für die menschliche Ernährung ist, da alle neun essentiellen Aminosäuren enthalten sind, liegt der Gehalt wegen des hohen Wasseranteils lediglich im Bereich typischer Frischgemüsesorten.

Aus heutiger Sicht sind Pilze aufgrund ihres hohen Mineralstoff- und B-Vitamingehaltes sowie eines geringen Fett- und Kohlenhydratanteils ernährungsphysiologisch interessant, da sie ein kalorienarmes und ballaststoffreiches Lebensmittel darstellen [2, 4, 5].

Der Shiitake (*Lentinus edodes*) ist der populärste Speisepilz Asiens und wird nach dem Champignon (*Agaricus bisporus*) und dem Austernseitling (*Pleurotus sapidus*) weltweit am häufigsten angebaut. Seine Bezeichnung entstammt der japanischen Sprache. Der Baum auf dem dieser Pilz wächst ist der Shii-Baum (*Pasania cuspita*), „Take“ ist die japanische Bezeichnung für Pilz.

Während die Produktionszahlen beim Champignon in den letzten Jahren stagnierten bzw. leicht rückläufig waren, wurde für den Shiitake ein deutlicher Anstieg verzeichnet, der nicht nur auf den asiatischen Raum beschränkt war, sondern vor allem in den westlichen Ländern zu beobachten war [6].

Für den verstärkten Anbau des Shiitake in den westlichen Ländern sprechen mehrere Gründe, deren Ursache unter anderem in den veränderten Ernährungsgewohnheiten liegen, die aufgrund zunehmender Globalisierung durch den Wunsch nach exotischen Lebensmitteln hervorgerufen wurden. Der Shiitake zeichnet sich durch einen sehr würzigen Geschmack und ein charakteristisches Aroma nach Knoblauch und Rettich aus, der ihn somit von dem „typischen“ Speisepilz dem Champignon stark unterscheidet. Darüber hinaus ist er für seine gesundheitsfördernden Wirkungen bekannt, über die in China schon in der Ming-Dynastie (1368 - 1644) berichtet wurde.

Dem Shiitake werden folgende gesundheitliche Wirkungen zugesprochen [7, 8, 9]:

1. Eine cholesterolsenkende Wirkung, für dessen Effekt, der sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen festgestellt wurde, die aus den Fruchtkörpern isolierte Verbindung Eritadenin - ein Derivat des Adenins - verantwortlich gemacht wird.
2. Eine antivirale Wirkung, dessen aktives Prinzip auf einer doppelsträngigen RNA beruht, die aus Sporen und Fruchtkörperextrakten gewonnen wurde und auf im Pilz vorhandene Viruspartikeln zurückgeführt wird. Diese RNA wurde als hochgradig interferon- und abwehrkraftstimulierend gegenüber Virusinfektionen erkannt.
3. Eine Antitumorwirkung, die besonders in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde. Als aktive Substanz konnte das Polysaccharid Lentinan isoliert werden, bei dem es sich um ein β -Glucan handelt. Über die genauen molekularen Wirkungen gibt es jedoch noch keine einheitlichen Vorstellungen.

Der Shiitake (*Lentinus edodes*) ist einer der ältesten kultivierten Speisepilze - in Japan und China kennt man den Pilz seit etwa 2000 Jahren. Die Anbautechnologie des Shiitake wurde in China zur Zeit der Sung-Dynastie (960-1127) entwickelt und ist schriftlich festgehalten.

Im 16. Jahrhundert führten chinesische Bauern den Shiitake-Anbau in Japan ein, wo er weiterentwickelt wurde. Aus botanischer Sicht gehört der Shiitake zu der Familie der Weißfäulepilze und ist damit in der Lage, sowohl das Lignin als auch - allerdings zu einem geringeren Anteil - Cellulosen und Hemicellulosen als Substrat aufzuschließen und zu verwerten. Aufgrund der Fähigkeit des Pilzes auf abgestorbenem Holz zu wachsen, wird der Shiitake in China und Japan seit mehr als 300 Jahren auf Baumstämmen kultiviert. Diese Anbaumethode wird auch heute noch vor allem von Kleinbauern praktiziert. Hierbei wird das Pilzmycel zunächst auf kleinen Eichenholzpflocken vorgezchtet, mit denen dann entsprechend präparierte Baumstämme beimpft werden. Nach einer vollständigen Besiedlung des Holzes mit Pilzmycel wird die Fruchtkörperbildung induziert. Bis zur Ernte können 15 Monate bis 2 Jahre vergehen [10, 11].

Erst in den letzten Jahrzehnten hat sich der Anbau von Shiitake auch in den westlichen Ländern entwickelt. Aufgrund klimatischer Unterschiede und dem mit vielen Risiken verbundenen traditionellen Anbau auf Holz, hat sich hier eine alternative Kultivierung auf Schüttsubstraten durchgesetzt, deren Hauptbestandteil Sägemehl von Laubbäumen ist, die auch im traditionellen Anbau verwendet werden. Dem Substrat werden weitere Nährstoffe zugesetzt, bei denen es sich hauptsächlich um leicht verfügbare Stickstoff- und Kohlenhydratquellen handelt, die die Besiedlungsphase beschleunigen sollen.

Obwohl diese Anbaumethode hinsichtlich der Umweltfaktoren und Nährstoffansprüche der auf Naturholz ähnelt, bestehen bei der Dauer des Anbauzyklus gravierende Unterschiede. Auf Schüttsubstraten können die Fruchtkörper nach sechs bis acht Monaten geerntet und durch den Zusatz von weiteren Nährstoffen zum Substrat eine Ertragssteigerung erzielt werden [12, 13, 14].

1.1 Problemstellung

Die Produktion von Speisepilzen im großindustriellen Maßstab stellt einen erheblichen wirtschaftlichen Faktor dar, der aufgrund steigender Nachfrage weiter an Bedeutung gewinnen wird. In Deutschland entfällt der überwiegende Anteil der Kultivierung auf den Champignon (*Agaricus bisporus*), der Shiitake (*Lentinus edodes*) wird jedoch mittlerweile auch in agro-industrieller Produktion auf oben genannten Schüttsubstraten angebaut. Für ein gegenüber dem asiatischen Markt konkurrenzfähiges Produkt muß das Aromaprofil noch verbessert werden. Darüber hinaus ist eine Reduzierung der Kultivierungsdauer von wirtschaftlichem Interesse.

Die durch den Anbau auf Schüttsubstraten produzierten Shiitake wurden als weniger aromaintensiv eingestuft, als die des traditionellen Anbaus auf Holz. Gerade dieser Faktor ist beim Shiitake besonders erwünscht, da er als Würzpilz verwendet wird [9].

Für das charakteristische Aromaprofil des Shiitake werden schwefelhaltige Substanzen, v.a. das Lenthionin verantwortlich gemacht. Für die schwefelhaltigen Aromastoffe wird dabei eine gemeinsame Vorstufe, das schwefelhaltige γ -Glutamylpeptid Lentinsäure angenommen.

In dieser Arbeit sollte der Pilz *Lentinus edodes* hinsichtlich einer Steigerung des Gehaltes an Lentinsäure vor dem Hintergrund einer Aromaintensivierung untersucht werden. Dazu mußte eine Methode zur schnellen und quantitativen Bestimmung des Lentinsäuregehaltes entwickelt werden. Aufgrund des mehrmonatigen Anbauzyklus bei der konventionellen Anzucht, sollten die Arbeiten an Submerskulturen durchgeführt werden, wodurch eine deutliche Reduzierung des Kultivierungszeitraums möglich ist und damit auch eine Standardisierung der durchzuführenden Experimente erreicht werden kann.

Für die Ziele dieser Arbeit wurden folgende Schwerpunkte formuliert:

- ⇒ die Optimierung der Nährmedien- und Kulturparameter und die Überprüfung der Übertragbarkeit in eine „upscaling“-Stufe im Bioreaktor
- ⇒ die Isolierung und Charakterisierung des Aromaprecursors Lentinsäure
- ⇒ die Entwicklung einer geeigneten Analytik zur quantitativen Bestimmung der Lentinsäure aus Submerskulturen
- ⇒ die Suche nach geeigneten Precursoren zur Steigerung des Lentinsäuregehaltes
- ⇒ die Untersuchung der Stammspezifität
- ⇒ Vergleich der Aromaprofile von frischen Fruchtkörpern und Biomasse aus Submerskultivierung