

Biotechnologische Erzeugung von hochwertigen Aromastoffen aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle I:	Universität Hannover Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Dr. R. G. Berger/PD Dr. U. Krings
Forschungsstelle II:	Universität Gießen Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie Prof. Dr. H. Zorn/Dr. M. A. Fraatz
Industriegruppe:	Deutscher Verband der Aromenindustrie e.V. (DVAI), Berlin
	Projektkoordinator: Dr. D. A. Müller, Takasago Europe GmbH, Zülpich
Laufzeit:	2008 – 2011
Zuwendungssumme:	€ 513.450,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Der industrielle Bedarf an natürlichen Aromastoffen wächst kontinuierlich; gleichzeitig nimmt das Volumen an Nebenströmen der Lebensmittelindustrie durch die zunehmende Verarbeitung und Konfektionierung der Rohstoffe ebenso stetig zu. Diese Nebenströme werden überwiegend als Futter- und Düngemittel oder thermisch entsorgt.

Viele Nebenströme der Lebensmittelindustrie zeichnen sich durch hohe Gehalte an Lignin und Polysacchariden (Hemi-/Cellulosen) aus. Diese können als biogenetische Precursoren für Aromastoffe dienen. Deren Biokonversion mit den gut bekannten Starterkulturen erscheint wenig aussichtsreich: Typische prokaryotische Vertreter, wie *Lactobacillus* und *Streptococcus* oder Stämme der eukaryotischen *Saccharomyces*-Hefen, bilden zwar zahlreiche Aromastoffe, doch handelt es sich um strukturell einfache Komponenten mit wenig potenten sensorischen Eigenschaften ("Fermentationsaromen"). Darüber hinaus stellen diese Mikroorganismen oftmals spezifische Nischenansprüche an die Nährstoff- und Kulturbedingungen und gedeihen daher nicht auf typischen Nebenströmen der Industrie.

Die Projektidee bestand in der Übertragung der fermentativen Stoffbildung der klassischen Lebensmittelbiotechnologie auf submers kultivierte, biochemisch komplexe Speisepilze (*Basidiomyceten*, Ständerpilze; dazu zählen fast alle der etwa 960 bekannten Speisepilze). Als Saprophyten sind *Basidiomyceten* zur Verwertung solcher Nebenströme prädestiniert. Speisepilze als Biokatalysatoren genießen beim Verbraucher eine höhere Akzeptanz als Bakterien oder Schimmelpilze. Diese Variante der Weißen Biotechnologie verspricht Zugang zu neuartigen natürlichen Aromastoffgemischen und gleichzeitig eine Minderung des Problems der Nebenströme, indem diese als biotechnologisch nützliche Substrate von den Pilzen verbraucht werden.

Forschungsergebnis:

Die Kultivierung von über 50 Basidiomyceten mit rund 20 verschiedenen industriellen Nebenströmen als Substraten führte zur Bildung einer Vielzahl interessanter Aromakomplexe. Daraus stachen diese Substrat/Stamm-Kombinationen hervor:

- *Tyromyces chioneus* mit Apfeltrester: Kompott, süßlich, Pflaumenmus,

- *Wolfiporia cocos* mit Karottenschalen: blumig, cremig, Zitrone, frisch,
- *Polyporus betulinus* mit Kohlschnitt: typisch Ananas,
- *Fomitopsis rosea* mit Rapspresskuchen: breites Aromaspektrum,
- *Paecilomyces farinosus* mit Rapspresskuchen: geräucherter Schinken, Nelkenblüte,
- *Laetiporus sulphureus* auf Gluten: würzig, Fleischbrühe,
- *Gloeophyllum odoratum* mit Rapspresskuchen: Melone, Litschi.

In den Kulturen wurden durch GC, GC-O, GC-Präp. und GC-MS zahlreiche Aromastoffe charakterisiert, zum Teil auch potente Schlüsselkomponenten, wie Lactone, Furaneol oder 4-Vinylguajacol. Die anfangs lyophilisiert eingesetzten Substrate konnten unter Erhalt der typischen Geruchseindrücke der jeweiligen Biotransformation durch unbehandelte Biofeuchtmasse ersetzt werden.

Für die Biotransformation von *Wolfiporia cocos* wurde ein optimiertes Medium etabliert. Der Einsatz von Hefe-Extrakt als komplexe Stickstoffquelle zeigte Potenzial zur Optimierung der Biotransformation von Apfeltrester durch *Tyromyces chioneus*. Einige Medien wurden gezielt mit Aromaprekursoren versetzt, um deren Einfluss auf die Produktkonzentration zu untersuchen. Wie erwartet, steigerte eine erhöhte Substratkonzentration den Konversionsdruck und führte zu deutlich erhöhten Ausbeuten.

Durch proteinanalytische Verfahren ist es gelungen, das für die Umsetzung von Ferulasäure zu 4-Vinylguajacol verantwortliche Enzym zu reinigen. Die neue Decarboxylase aus *Paecilomyces* zeigte eine Präferenz für bestimmte Substitutionsmuster am Benzenring und setzte besonders schnell Ferulasäure um, die auch als Startmaterial für die Vanillinbiotechnologie genutzt wird.

Maßstabsvergrößerungen der Biotransformation von Karottenschalen durch *Wolfiporia cocos*, Apfeltrester durch *Tyromyces chioneus*, Weintrester durch *Pleurotus sapidus*, Raps-Presskuchen durch *Fomitopsis rosea* und Weißkohlschnitt durch *Piptoporus betulinus* wurden erfolgreich durchgeführt. Sowohl in Rührkessel- als auch in Festbettreaktoren blieben die charakteristischen Geruchseindrücke der Kulturen erhalten. Da Basidiomyceten als obligate Aerobier ständig belüftet werden müssen, trägt die Abluft einen Teil der gebildeten Aromen aus. Dieser Produktstrom wurde analytisch durch Verwen-

dung einer Adsorbens-Wechselschaltung erfasst; ähnlich könnte im technischen Maßstab vorgegangen werden. Wegen der Restgehalte von Lipiden in Nebenströmen, wie Rapspresskuchen, war eine direkte Extraktion der im Kulturmedium gelöst vorliegenden Aromafraktion nicht möglich. Mit einer modifizierten *Tegosoft*-Methode war es jedoch möglich, die Kinetik der im Bioreaktor gebildeten Aromastoffe *on-line* zu analysieren. Für die technische Umsetzung bieten sich destillative oder ebenfalls adsorptive Techniken an.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Der statistische Durchschnittskonsument verzehrt etwa 100 g bis 200 g konfektioniertes Aroma p. a. und damit rund 15 g Aromastoffe aus einer Palette von über 200 Stoffen. Mehr als 70 % dieser Aromen entsprechen den gesetzlichen Vorgaben an die Bezeichnung "natürlich". Aromastoffe erfüllen als teilweise chirale, hochpreisige und unverzichtbare Wirkstoffe der Lebensmittelindustrie in paradigmatischer Weise die Anforderungen an Zielsubstanzen der Weißen Biotechnologie. Biotech-Vanillin wird für ca. 600 € kg⁻¹ gehandelt; für das (aus Himbeeren nicht wirtschaftlich gewinnbare) Biotech-Himbeerketon sind 9.000 € kg⁻¹ gefordert worden. Sowohl die Aromenindustrie als auch die Biotechnologie-Branche sind überwiegend mittelständisch strukturiert und zu breiter Forschung im interdisziplinären Feld der Aromabiotechnologie nicht in der Lage.

Ziel des Forschungsprojektes war der Nachweis, dass höhere Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten über ein den Samenpflanzen vergleichbares Potential zur Bildung komplexer Aromastoffgemische verfügen. Man kann solche Aromastoffgemische als "mikrobielle etherische Öle" bezeichnen. Die Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit der Aromenindustrie ergibt sich aus dem Zugang zu diesen neuen Quellen für natürliche Aromen. Die alternative Verwendung von Nebenströmen zur Wertschöpfung in Form vermarktbarer Produkte bietet Kostenvorteile auf der Entsorgungsseite und schärft zugleich das Außenbild der Aromen- und Lebensmittelindustrie als Protagonisten einer nachhaltigen, zukunftsorientierten Wirtschaftsweise. Die biotechnologische Bildung der Aromastoffgemische erfolgt unter milden physikalischen und chemischen Bedingungen, Energie und Ressourcen schonend und fern agrikulturner und wirtschaftspolitischer Imponderabilien. Die Basidio-

myceten-Mycele selbst besitzen nach der Abtrennung der Aromafractionen weiterhin Lebensmittelcharakter; sie könnten als Impfgut oder, analog zum *Fusarien*-Protein *Quorn*, als Proteinquelle weiterverwendet werden.

Der erstmalig verfolgte Ansatz, nicht die hochreine, teure Aromasubstanz herzustellen, sondern Extrakte nach Abtrennung des organischen Materials direkt oder nach kostengünstiger Konzentrierung (z.B. Vakuumverdampfung) einzusetzen, ist besonders wirtschaftlich. Die gebildeten Aromastoffgemische ergeben ohne weitere Zudosierung oder Fraktionierung ein „ready to use“-Aroma. Zum Beispiel wurde das von *Paecilomyces* produzierte Raucharoma von allen Prüfern mit dem Geruch von frisch geräuchertem Schwarzwälder Schinken assoziiert. Ein auf diese Weise kalt erzeugtes Raucharoma ist grundsätzlich unbelastet durch cancerogene polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, deren Spurenvorkommen in Pyrolyseprodukten kaum vermeidbar ist. Hier wird die Überlegenheit biotechnologischer Verfahren zur Produktion qualitativ besserer Lebensmittel besonders augenfällig.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2011.
2. Berger, R.G., Schrader, J., Schwab, W., Wüst, M. und Zorn, H.: Trendbericht Lebensmittelchemie, Nachr. a.d. Chemie 61, 345-352 (2013).
3. Bosse, K., Fraatz M.A. und Zorn, H.: Formation of complex natural flavors by biotransformation of apple pomace with basidiomycetes. Food Chem. 141, 2952-2959 (2013).
4. Schimanski, S., Krings, U. und Berger, R.G.: Rapid analysis of volatiles in fat-containing matrices for monitoring bioprocesses. Eur. Food Res. Technol. DOI 10.1007/s00217-013-2047-1 (2013).
5. Kunkel, K., Bosse K., Fraatz, M.A. und Zorn, H.: Produktion natürlicher Aromen mit Basidiomyceten. Runds. Fleischhyg. Lebensmittelüberwach. 63, 383-384 (2011).
6. Rheinheimer, M., Schimanski, S., Krings, U., Zorn, H. und Berger, R.G.: Biotransformation von Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu natürlichen Aromastoffen mittels Basidiomyceten. 40. Dt. Lebensmittelchemikertag, ISBN 978-3-936028-68-3, 127 (2011).
7. Zelena, K., Krings, U., Rheinheimer, M., Linke, D. und Berger, R.G.: Systems biotechnology for enhanced flavour yields. 9th Wartburg Symp. Flavor Chem. Biol. 2010, Eisenach, Germany (eds. Hofmann, T. et al.) 217-224 (2011).
8. Grimrath, A., Krings, U., Linke, D., Schindler, S. und Berger, R.G.: Formation of sotolon – Enzyme catalysis or chemical reaction? 9th Wartburg Symp. Flavor Chem. Biol. 2010, Eisenach, Germany (eds. Hofmann, T. et al.) 443-446 (2011).
9. Berger, R.G.: Essential oils from fungi? 42th ISEO, Antalya. J. Ess. Oil Res., Spec. Iss. 2 (2011).
10. Kunkel, K., Fraatz, M.A., Berger, R.G. und Zorn, H.: Biotransformation carotinoidhaltiger Substrate zu natürlichen Aromastoffen mit Hilfe von Basidiomyceten. Lebensmittelchem. 65, 32 (2011).
11. Bosse, K., Fraatz, M.A., Berger, R.G. und Zorn, H.: Biotransformation lignocellulosehaltiger Substrate zu natürlichen Aromastoffen durch Basidiomyceten. Lebensmittelchem. 65, 32-33 (2011).
12. Krings, U., Grimrath, A., Linke, D., Schindler, S. und Berger, R.G.: Volatiles Responsible for the Seasoning-like Flavour of Cell Cultures of *Laetiporus sulphureus*. Flav. Fragr. J. 26 (3), 174-179 (2011).
13. Zorn, H., Berger, R. G., Kunkel, K., Bosse, A. und Fraatz, M.A.: Biotechnologische Nutzung von Produktionsnebenströmen: Basidiomyceten als Aromaproduzenten. Tagungsband FEI-Jahrestagung 2011, 75-84 (2011).
14. Kunkel, K., Fraatz M.A., Berger, R.G. und Zorn, H.: Produktion natürlicher Aromen durch Biotransformation von Apfeltrester mit *Tyromyces chioneus*. (Posterabstract) Tagungsband FEI-Jahrestagung 2011, 131-132 (2011).
15. Berger, R.G.: White Biotechnology: Sustainable Options for the Generation of Natural Volatile Flavours (eds. Blank, M. et al.). Expression of Multidisciplinary Flavour Sci., ZHAW, Zürich, 319-327 (2010).
16. Berger, R.G., Krings, U. und Zorn, H.: Biotechnological Flavour Generation. In: Food Flavour Technology (eds. Taylor, A.J., Linfoth, R.S.). Wiley, Chichester, UK, 89-126 (2010).
17. Fraatz, M.A. und Zorn, H.: Fungal flavors (eds. Esser, K. und Hofrichter, M.). The Mycota X: Industrial applications. Springer, Heidelberg, 249-268 (2010).
18. Berger, R.G.: Basidiomyceten - Biokatalysatoren für eine nachhaltigere Lebensmittelproduktion. Tagungsband 67. FEI-Jahrestagung 2009, 15-29 (2010).

19. Hill, S., Rheinheimer, M., Krings, U., Zorn, H. und Berger, R.G.: Biotechnologische Erzeugung von hochwertigen Aromastoffen aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie. Tagungsband 67. FEI-Jahrestagung 2009, 96-98 (2010).
20. Zelena, K., Hardebusch, B., Hülsdau, B., Berger, R.G. und Zorn, H.: Generation of norisoprenoid flavours from carotenoids by fungal peroxidases. J. Agric. Food Chem. 57, 9951-9955 (2009).
21. Karrasch, S., Krings, U. und Berger, R.G.: Carotinoid abbauende Enzyme aus Basidiomyceten für Lebensmittel und den technischen Einsatz. Lebensmittelchem. 63, 156 (2009).
22. Berger R.G.: Biotechnology of flavours – the next generation. Biotech. Lett. 31, 1651-1659 (2009).
23. Kaspera, R., Krings, U. und Berger, R.G.: Biotechnology of Flavours - Recent progress. In: Current topics on Bioprocesses in Food Industry II. Proc. 2nd ICBF, Patras (eds. Koutinas A.A. et al.) Asiatech. Publishers, New Dehli, 30-42 (2008).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hannover
Institut für Lebensmittelchemie
Wunstorfer Str. 14, 30453 Hannover
Tel.: +49 511 762-4582
Fax: +49 511 762-4547
E-Mail: rg.berger@lci.uni-hannover.de

Universität Gießen
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittel-
biotechnologie
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen
Tel.: +49 641 9934-900
Fax: +49 641 9934-909
E-Mail: holger.zorn@lcb.chemie.uni-giessen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

