

**Monoterpenhydroperoxide durch Dioxygenase-Katalyse:  
Identifizierung primärer und sekundärer Reaktionsprodukte**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**Doktorin der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

**Nicole Lehnert**

Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin

geboren am 05.05.1983 in Stendal

Hannover 2012

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. T. Scheper

Tag der Promotion: 20.12.2011

## **Erklärung zur Dissertation**

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Monoterpenhydroperoxide durch Dioxygenase-Katalyse: Identifizierung primärer und  
sekundärer Reaktionsprodukte

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls  
die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere  
Prüfungsarbeit verwendet.

---

Nicole Lehnert

# Danksagung

---

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die konstruktive Kritik während meiner Arbeit. Außerdem bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Arbeitsthemas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Weiter möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die Betreuung bedanken und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für Diskussionen hatte. Die daraus gewonnen Erkenntnisse und Anregungen haben entscheidend zu der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Diana Linke, die mir mit ihrem fachlichen Rat aber auch mit aufmunternden Worten stets zur Seite stand.

Herrn Dr. Jörg Fohrer und Herrn Dr. Edgar Hofer (Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und die Unterstützung bei der Interpretation.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Lebensmittelchemie, die maßgeblich zum angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Eltern, Andrea und Joachim Lehnert, bedanken, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre und deren moralische Unterstützung mich immer begleitet hat. Ein großer Dank gilt ebenso meiner Schwester Janet Lehnert, die mir des Öfteren Mut zugesprochen hat, und meinen Großeltern, Rosemarie und Wilfried Reek, die mir immer den Rücken gestärkt haben.

# Vorbemerkungen

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Juni 2008 bis Oktober 2011 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens „Enzymatische Oxidationssysteme für Nahrungsmittel und für den technischen Einsatz“, Bundesministerium für Bildung und Forschung, Cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172F) durchgeführt.

Teile dieser Dissertation wurden in international anerkannten Zeitschriften publiziert, sowie in Form von Postern veröffentlicht.

## Veröffentlichungen

1. Krings, U., **Lehnert, N.**, Fraatz, M. A., Hardebusch, B., Zorn, H., Berger, R. G. (2009) „Autoxidation versus biotransformation of  $\alpha$ -pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of  $\alpha$ -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol“, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57:9944
2. **Lehnert, N.**; Sydes, D.; Wittig, M.; Krings, U.; Berger, R. G. „Biotransformation of car-3-ene - Performance of a novel dioxygenase of *Pleurotus sapidus*“; doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.007
3. **Lehnert, N.**; Krings, U.; Berger, R. G. (2011) „Analysis of car-3-en-5-hydroperoxide“, Natural Product Communications, 6 (9): 1217 - 1220
4. Krings, U.; **Lehnert, N.**, Rheinheimer, M.; Berger, R. G. (2010) „Mikroorganismen erzeugen hochwertige Aromen“, HighChem hautnah - Aktuelles aus der Lebensmittelchemie, Hrsg. Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCH, Frankfurt am Main, ISBN 978-3-936028-64-5

## Poster

5. Zelena, K.; **Lehnert, N.**; Karrasch, S.; Krings, U.; Horváth, G.; Molnár, P.; Turcsi, E.; Deli, J.; Berger, R. G. (2011) „Degrading of carotenoids by the DyP peroxidase MsP2 from *Marasmius scorodonius*“, Acta Biologica Cracoviensia 2011, 53, 60

Des Weiteren wurde in Zusammenarbeit mit Industriepartnern an Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten geforscht. Die Patentanmeldung für eine Alkoholoxidase aus einem xerophilen Basidiomyceten ist in Vorbereitung.

---

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VII</b>
<b>Summary</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Terpene</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Enzyme als Biokatalysatoren</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Oxidierende Enzyme</b>	<b>9</b>
1.3.1 Monooxygenasen	10
1.3.1.1 Mechanismus der Monooxygenasen	11
1.3.1.2 Reaktionen katalysiert durch Monooxygenasen	13
1.3.1.3 Bedeutung von Monooxygenasen bei Terpenttransformationen	18
1.3.2 Dioxygenasen	20
1.3.2.1 Mechanismus der Dioxygenasen	21
1.3.2.2 Reaktionen katalysiert durch Dioxygenasen	25
1.3.2.3 Bedeutung von Dioxygenasen bei Terpenttransformationen	26
1.3.3 Haloperoxidasen	28
<b>1.4 Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>2 Autoxidation versus biotransformation of <math>\alpha</math>-pinene to flavours with <i>Pleurotus sapidus</i> – regioselective hydroperoxidation of <math>\alpha</math>-pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Abstract</b>	<b>33</b>
<b>2.2 Introduction</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Materials and Methods</b>	<b>35</b>
2.3.1 Fungi	35
2.3.2 Fungal growth	35
2.3.2.1 Submerged cultivation (SB)	35
2.3.2.2 Mycelium-concentrates (MC), lyophilisates (Lyo), and microsomal fraction (MF)	36
2.3.3 Chemicals	36
2.3.4 Synthesis of ( <i>E</i> )- and ( <i>Z</i> )- $\alpha$ -pinene hydroperoxide	37
2.3.5 ( <i>E</i> )-Verbenyl hydroperoxide	37
2.3.6 ( <i>Z</i> )-Verbenyl hydroperoxide	37

---

2.3.7	Synthesis of ( <i>E</i> )-verbenol	37
2.3.8	$\alpha$ -Pinene bioconversion	38
2.3.9	Product isolation and identification	38
<b>2.4</b>	<b>Results and Discussion</b>	<b>39</b>
2.4.1	Biotransformation	39
2.4.2	Autoxidation	42
2.4.3	Enzyme catalyzed formation of ( <i>E</i> )-verbenol and verbenone	46
<b>2.5</b>	<b>Acknowledgements</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>Bioconversion of car-3-ene by a dioxygenase of <i>Pleurotus</i></b>	<b>52</b>
	<b><i>sapidus</i></b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Abstract</b>	<b>52</b>
<b>3.2</b>	<b>Introduction</b>	<b>52</b>
<b>3.3</b>	<b>Materials and methods</b>	<b>53</b>
3.3.1	Chemicals	53
3.3.2	Fungi	54
3.3.3	Fungal growth	54
3.3.4	Mycelium homogenates (MH)	54
3.3.5	Bioconversion	54
3.3.6	High resolution gas chromatography (HRGC) / high resolution gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS)	55
3.3.7	Thin layer chromatography (TLC)	55
3.3.8	NMR	55
3.3.9	Synthesis of carenones and carenols	56
3.3.10	Preparative gas chromatography	56
3.3.11	Reduction of bioconversion products/synthetics	57
<b>3.4</b>	<b>Results</b>	<b>57</b>
<b>3.5</b>	<b>Discussion</b>	<b>61</b>
3.5.1	Autoxidation	62
3.5.2	Enzyme catalysis	64
<b>3.6</b>	<b>Acknowledgements</b>	<b>65</b>
<b>4</b>	<b>Analysis of car-3-en-5-hydroperoxide</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Abstract</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Introduction</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Results and discussion</b>	<b>69</b>



---

<b>4.4</b>	<b>Experimental</b>	<b>73</b>
4.4.1	Chemicals	73
4.4.2	Preparation of car-3-en-5-hydroperoxide	73
4.4.3	HRGC/HRGC-MS	73
4.4.4	Thin layer chromatography	73
4.4.5	HPLC	74
4.4.6	Chemical oxidation of hydroperoxides	74
<b>4.5</b>	<b>Acknowledgement</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>96</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

A	Ampere
APCI	<i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i>
amu	atomare Masseneinheit
BHT	Butylhydroxytoluol
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CW	Carbowax
DAD	Diodenarraydetektor
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC	<i>Enzyme Commission</i>
ee	<i>enantiomeric excess</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI	Elektronenstoß-Ionisation ( <i>Electron Impact</i> )
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt
FAD/FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
<i>g</i>	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s <sup>2</sup>
g	Gramm
GC	Gaschromatograph
GC-FID	Gaschromatograph gekoppelt mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
GC-O	Gaschromatographie mit olfaktometrischer Detektion
GPP	Geranylpyrophosphat
h	Stunde(n)

---

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
Hz	Hertz
IPP	Isopentenylpyrophosphat
J	Joule
k	Kilo
LOX	Lipoxygenase
Lyo	<i>Lyophilisate</i>
L	Liter
M	Mega
m	Milli
M	molar
μ	Mikro
min	Minute
mol	Mol
MC	<i>Mycelium concentrates</i>
MF	<i>Microsomal fraction</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Anzahl der Messwerte
N	normal
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
n. d.	nicht detektiert
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
o	<i>ortho</i>
OBAS	4-Octylbenzylamidossulfobetain

<i>p</i>	<i>para</i>
Pa	Pascal
ppm	Teile pro Million ( <i>parts per million</i> )
<i>P. sapidus/ Psa</i>	<i>Pleurotus sapidus</i>
R•	Alkylradikal
RI	Linearer Retentionsindex
RO•	Alkoxyradikal
ROO•	Peroxyradikal
ROOH	Hydroperoxid
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
s	Sekunde
SNL	Standardnährlösung
T	Temperatur
TLC	Dünnschichtchromatographie ( <i>thin layer chromatography</i> )
V	Volt
% (w/w)	Massenprozent

---

## Zusammenfassung

---

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung einer Dioxygenase aus *Pleurotus sapidus* hinsichtlich ihrer Substratspezifität und mit Methoden zur analytischen Erfassung intermediärer Terpenhydroperoxide.

Lypophilisate und Homogenate des Myzels von *Pleurotus sapidus* wurden unter vergleichbaren Bedingungen mit  $\alpha$ -Pinen und (+)-Car-3-en als Substrate inkubiert. Neben dem Positivansatz wurden sowohl eine biologische mit inaktiviertem Myzel als auch eine chemische Kontrolle ohne Myzel mitgeführt. Nach Extraktion der Reaktionsansätze wurde auf Dünnschichtchromatographie mit anschließender Hydroperoxid sensitiver Färbung, hochauflösende Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie, NMR und Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie zurückgegriffen. Es wurden Autoxidation und enzymatische Konversion gegenübergestellt, um die enzymatisch katalysierte Oxidation zu quantifizieren.

Sowohl  $\alpha$ -Pinen als auch (+)-Car-3-en wurden durch die Inkubation mit dem Pilzmyzel oxidiert. In beiden Fällen wurden Produkte nachgewiesen, die eine allylische Oxidation des Substrats belegen. Im Fall von  $\alpha$ -Pinen wurden als Hauptprodukte Verbenon und die korrespondierenden Alkohole (*E*)- und (*Z*)-Verbenol detektiert. Im Vergleich zur Autoxidation, die ein ähnliches Produktspektrum zeigte, wurde durch den Einsatz von aktivem Pilzmyzel eine deutliche Erhöhung der Produktbildung erzielt. Untersuchungen mit (+)-Car-3-en untermauerten diese Ergebnisse, indem auch hier als Hauptprodukte Car-3-en-5-on sowie die analogen *cis*-/*trans*-Carenole gebildet wurden, deren Konzentration im Vergleich zu den Kontrollwerten deutlich erhöht waren. Sowohl Car-3-en-5-on als auch die Alkohole zeigten unter Versuchsbedingungen keine deutliche Aromaaktivität. Da keine massenspektrometrischen Daten in der Literatur verfügbar waren, wurden Car-3-en-5-on, Car-3-en-2-on und Car-2-en-4-on synthetisiert und mittels NMR in ihrer Struktur bestätigt.

Bei den Untersuchungen zu  $\alpha$ -Pinen und zu (+)-Car-3-en war die sichere Detektion von Terpenhydroperoxiden mit gaschromatographischen Methoden nicht möglich, da deren Degradation auf der Säule stark tailende Peaks verursachte. Der positive Nachweis gelang mittels Flüssigchromatographie und gekoppelter Massenspektrometrie. Die Analyten wurden im APCI<sup>+</sup>-Modus ionisiert und eindeutig

identifiziert. Der postulierte radikalische Mechanismus, bei dem die Ketone und Alkohole über primäre Terpenhydroperoxide mit anschließender Schenck-Umlagerung entstehen, wurde damit belegt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Dioxygenase aus *Pleurotus sapidus* die Monoterpene  $\alpha$ -Pinen und (+)-Car-3-en regiospezifisch über einen radikalischen Mechanismus oxidiert. Die Identifizierung der intermediären Hydroperoxide erfolgte mittels LC-MS.

**Schlagwörter:**

*Pleurotus sapidus*,  $\alpha$ -Pinen, (+)-Car-3-en, Dioxygenase, Hydroperoxide, Monoterpen

---

## Summary

---

The present work dealt with the characterization of a dioxygenase from *Pleurotus sapidus* with respect to its substrate specificity, and with analytical methods for the detection of intermediate terpene hydroperoxides.

Lypophilisates and homogenates of the mycelium of *Pleurotus sapidus* were incubated under similar conditions with  $\alpha$ -pinene and (+)-car-3-ene as substrates. In addition to the sample both a biological blank with inactivated mycelia and a chemical blank were prepared. After extraction of the reaction products analytical methods, such as thin layer chromatography with subsequent hydroperoxide sensitive staining, high-resolution gas chromatography coupled with mass spectrometry, NMR and liquid chromatography coupled with mass spectrometry were applied. Autoxidation and enzymatic conversion were compared to quantify the enzymatically catalyzed oxidation.

Both  $\alpha$ -pinene and (+)-car-3-ene were oxidized by incubation with the fungal mycelium. In both cases, products were detected, which showed an allylic oxidation of the substrate. In the case of  $\alpha$ -pinene verbenone and the corresponding alcohols (*E*)- and (*Z*)-verbenol were detected as the major products. Compared to autoxidation, which showed a similar product range, an increase of products was obtained by use of the mycelium. Studies with (+)-car-3-ene confirmed these results by formation of car-3-en-5-one and the analogous *cis*-/*trans*-carenols as major products, whose concentration increased strikingly compared to the blank. Both car-3-en-5-one and the alcohols showed no distinct aroma activity under conditions. Since no unambiguous mass spectrometric data were available in literature, car-3-en-5-one, car-3-en-2-one and car-2-en-4-one were synthesized and characterized by NMR.

Investigating bioconversion products of  $\alpha$ -pinene and (+)-car-3-ene the detection of terpene hydroperoxides by gas chromatography was not feasible, as degradation on the column caused strongly tailing peaks. The confirmation of the formation of hydroperoxides was eventually accomplished by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The analytes were ionized in APCI<sup>+</sup>- mode and clearly identified. The proposed radical mechanism, by which the ketones and alcohols are formed via primary terpene hydroperoxides and a subsequent Schenck rearrangement were proven.

In summary, it was shown that the dioxygenase of *Pleurotus sapidus* oxidized  $\alpha$ -pinene and (+)-car-3-ene regiospecifically by a radical mechanism. The identification of the intermediate hydroperoxides was successful by using LC-MS.

**Keywords:**

*Pleurotus sapidus*,  $\alpha$ -pinene, (+)-car-3-ene, dioxygenase, hydroperoxides, monoterpene



---

# 1 Einleitung

---

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Oxyfunktionalisierung von Monoterpenen, welche durch eine Dioxygenase katalysiert wird. Im Hinblick darauf sollen in der folgenden Einleitung sowohl die Klasse der Terpene als auch oxygenierende Enzyme beleuchtet werden.

## 1.1 Terpene

Terpenoide Verbindungen stellen mit über 40000 Substanzen die größte Klasse an Naturstoffen dar (Krings et al., 2009) und kommen in der Umwelt ubiquitär vor. Sie umfassen Verbindungen, die sich formal aus Isopreneinheiten aufbauen und hauptsächlich pflanzlichen Ursprungs sind (Breitmaier, 2006). Jedoch konnten auch im Insektenreich Terpene nachgewiesen werden, die als Sekundärmetabolite des pflanzlichen Stoffwechsels unterschiedliche Funktionen übernehmen. Wichtigste Funktionen sind dabei das Anlocken von Insekten zur Fortpflanzung, aber auch aufgrund ihrer mitunter sehr geringen Geruchsschwelle der Schutz vor natürlichen Feinden (Breitmaier, 2006). So wirken die von Koniferen gebildeten Terpene  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen, Myrcen und Limonen als Fraßschutz vor dem Borkenkäfer (Gershenzon & Croteau, 1991). Des Weiteren übernehmen Terpene Pheromonfunktionen, indem sie zur Abschreckung, Markierung oder als Sexuallockstoff eingesetzt werden (Sejbold et al., 2000). Neben dem intensiven Geruch z. B. nach Citrus, Eukalyptus, Lavendel, Pinie, Rose, Pfefferminz, Thymian oder Lilie weisen Terpene auch pharmakologische Eigenschaften auf (Breitmaier, 2006). So konnte gezeigt werden, dass Terpene Einfluss auf die Zellteilung, Detoxifizierung, Entzündungs- und Immunprozesse haben (Kaefer & Milner, 2008).

Allen Terpenen ist der grundlegende Aufbau aus Isopreneinheiten (2-Methyl-1,3-butadien-Einheiten) gemein. Je nachdem wie viele Isopreneinheiten miteinander verknüpft sind, lassen sich Terpene in unterschiedliche Gruppen einteilen. Die Verknüpfung erfolgt entweder *head-to-tail* oder *tail-to-tail*. Die einfachste Gruppe ist die der Hemiterpene, die nur aus einer Isopren-Einheit aufgebaut sind. Monoterpene bestehen aus zwei, Sesquiterpene aus drei und Diterpene aus vier Untereinheiten. Tetraterpene sind aus acht Einheiten aufgebaut und umfassen unter anderem die Klasse der Carotinoide. Bei mehr als acht Einheiten spricht man von Polyterpenen (Breitmaier, 2006).

Es sind heute zwei unterschiedliche Biosynthesewege bekannt, die die Bildung der Isopren-Einheiten gewährleisten (Breitmaier, 2006). Noch bis 1993 war ausschließlich der Acetat-Mevalonat-Weg bekannt, welcher im Cytosol stattfindet. Der Bildungsweg beginnt formal mit der Kondensation von zwei Molekülen Acetyl-CoA, bevor ein weiteres Molekül Acetyl-CoA über eine Aldol-Reaktion angefügt wird. Die auf diesem Weg gebildete (*R*)-Mevalonsäure wird phosphoryliert, decarboxyliert und dehydriert, so dass Isopentenylpyrophosphat entsteht, welches Grundbaustein der Terpene ist (Abbildung 1).

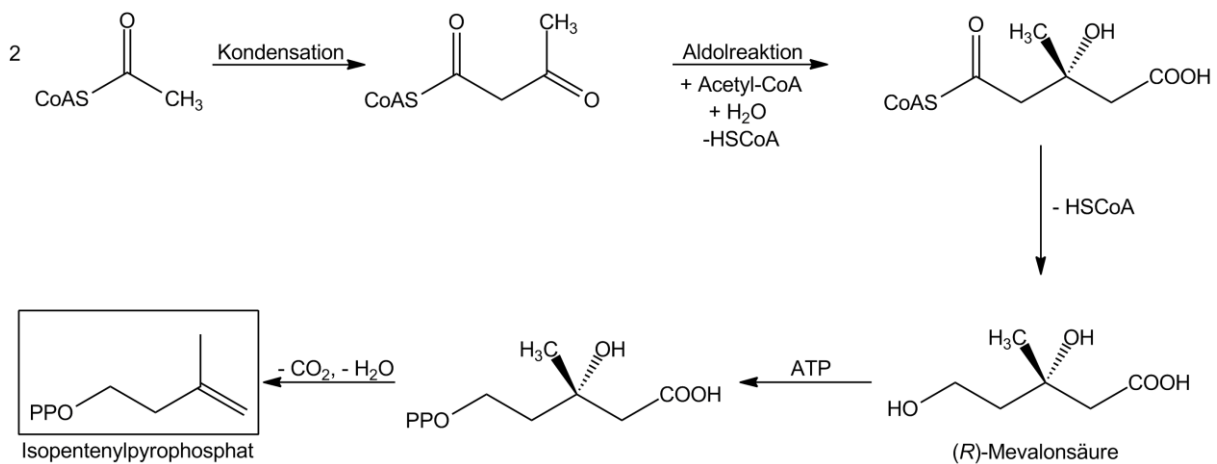


Abbildung 1 Bildung von Isopentenylpyrophosphat über den Acetat-Mevalonat-Weg (Breitmaier, 2006)

Der zweite Bildungsweg ist der Triose-Pyruvat-Weg oder auch Rohrer-Weg, der erst 1993 entdeckt wurde und vor allem in den Chloroplasten und Plastiden stattfindet.

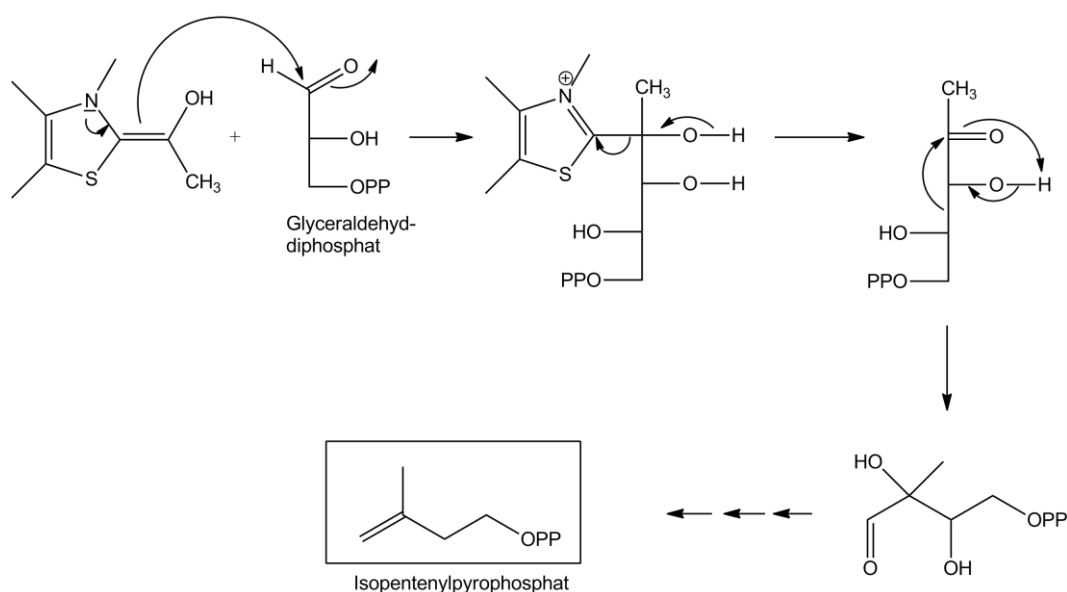


Abbildung 2 Bildung von Isopentenylpyrophosphat über den Triosediphosphat-Weg (Breitmaier, 2006)

Ausgangsverbindung ist hier aktiviertes Acetaldehyd (abgeleitet aus dem Pyruvat aus der Glykolyse), welches mit Glyceraldehyddiphosphat (Trisoediphosphat) zu 1-Desoxyxypentulose-5-phosphat und weiter zu IPP reagiert (Abbildung 2). IPP stellt die Schlüsselverbindung für die Terpenbiosynthese dar, welche durch weitere Reaktionen wie Kondensation, Cyclisierung oder auch Oxidation des IPP gewährleistet wird. Ein Molekül IPP reagiert mit einem Molekül  $\gamma,\gamma$ -Dimethylallylpyrophosphat (Isomer des IPP) zu Geranylpyrophosphat (GPP), welches Grundbaustein von Monoterpenen ist. So verläuft die Biosynthese von  $\alpha$ -Pinen ausgehend von GPP über mehrere Schritte (Abbildung 3). Nach einer allylischen Umlagerung zu (S)-Linalylpyrophosphat und Bindungsrotation von GPP erfolgt der erste Ringschluss zu einem Carbokation, bei dem ein Sechsring mit einer Doppelbindung gebildet wird. Durch eine  $\pi$ -Cyclisierung wird die Doppelbindung aufgehoben und der zweite Ring ausgebildet. Das so entstandene Pinylium reagiert weiter zu  $\alpha$ -Pinen bzw.  $\beta$ -Pinen, indem ein Proton eliminiert wird (Faraldos et al., 2011).

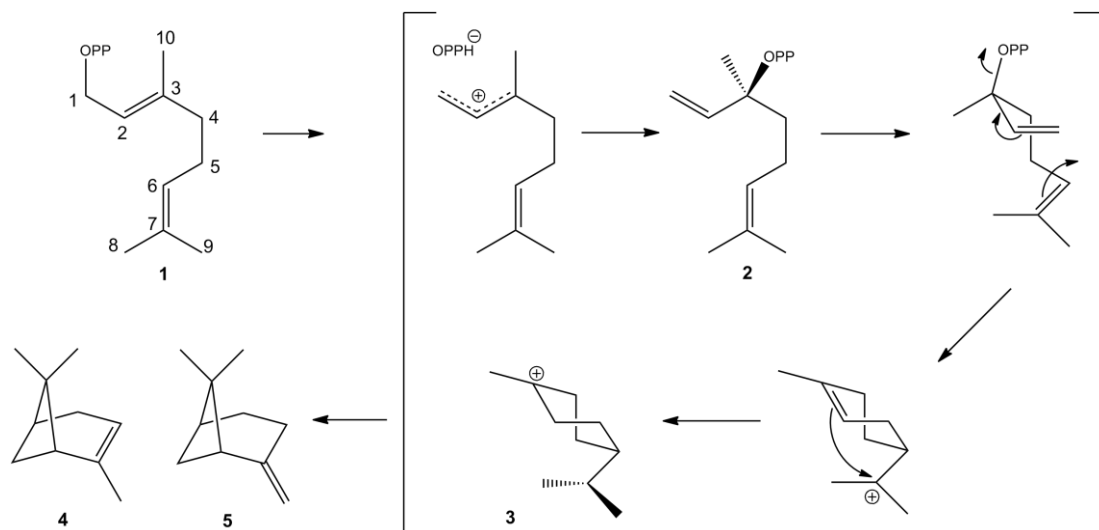


Abbildung 3 Biosynthese von Pinen (1: GPP, 2: (S)-Linalylpyrophosphat, 3: Pinylium-Ion, 4:  $\alpha$ -Pinen, 5:  $\beta$ -Pinen) (Faraldos et al., 2011)

Analog verläuft die Biosynthese von (+)-Car-3-en (Abbildung 4): GPP isomerisiert zu (S)-Linalylpyrophosphat, woraufhin es nach einer Bindungsrotation zum ersten Ringschluss und zur Ausbildung eines Carbokations kommt. Nach einem weiteren Ringschluss und Protoneliminierung entsteht das Monoterpen (+)-Car-3-en (Savage & Croteau, 1993).

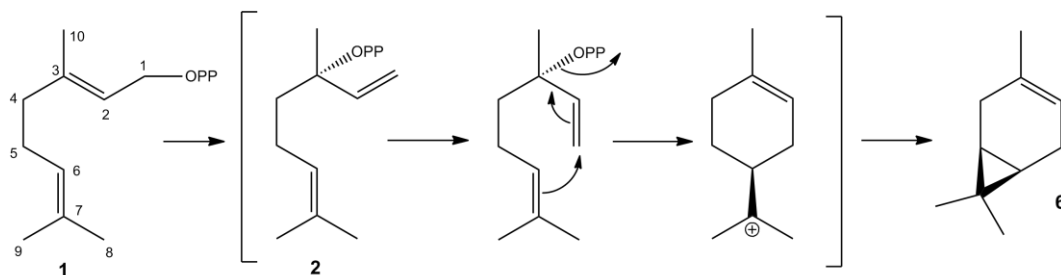


Abbildung 4 Biosynthese von (+)-Car-3-en (1: GPP, 2: (S)-Linalylpyrophosphat, 6: (+)-Car-3-en) (Savage & Croteau, 1993)

Besonders die Kosmetik-, Lebensmittel- und Pharmaindustrie zeigen großes Interesse an Aroma- und Duftstoffen. Terpenoide Verbindungen finden Anwendung als Parfüminhaltsstoffe oder auch als Duftstoffe für Haushaltsartikel (Breitmaier, 2006). Der Einsatz in Lebensmitteln zur Aromatisierung ist ein weiteres großes Feld, das für Aroma- und Duftstoffe offen steht. Der Anteil an Lebensmitteln, die aromatisiert sind, nimmt gegenüber nichtaromatisierten Lebensmitteln immer weiter zu, was den Bedarf an Aromastoffen begründet. Des Weiteren ist die Bedeutung der Carotinoide nicht zu vernachlässigen, die als farbgebende Komponente in Lebensmitteln, aber auch in Kosmetika und Pharmaka verwendet werden (Belitz et al., 2008). Die Anwendung in Medikamenten beschränkt sich dabei nicht nur auf die Farbgebung. Da Carotinoide Vorläuferverbindungen des Vitamin A sind, werden sie unter anderem in der Krebstherapie eingesetzt (Okito et al., 2002). Neben farbgebenden Eigenschaften verfügen Carotinoide über antioxidative Eigenschaften, die den Wert der Carotinoide als natürlichen Zusatzstoff heben. Nicht zu vergessen ist die Verwendung von Terpenen in pflanzlichen Arzneimitteln, bei denen sowohl aromatisierende als auch pharmakologische Eigenschaften Anwendung finden (Breitmaier, 2006). Wie bereits erwähnt, besteht der natürliche Zweck von Terpenen unter anderem in der Abschreckung von Fraßfeinden. Dies macht sich die Agrarindustrie zu Nutze, indem Terpene als Insektizide auf den Markt erhältlich sind (Zhu et al., 2003).

Traditionell werden Terpene aus den Pflanzen direkt gewonnen, indem sie mittels Dampfdestillation oder Extraktion isoliert werden. Als Rohmaterialien kommen unter anderem Pinienhölzer, Gewürzpflanzen wie Rosmarin und Koreander, aber auch Rosen und Lavendel in Frage. Kiefernrohharz, welches reich an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen ist, fällt unter anderem als Abfallprodukt bei der Verarbeitung von Kiefern an. Auf diesem

Wege kann aus Restströmen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen gewonnen werden, das jährlich in Summe über 180 Kilotonnen ausmacht (Ohloff, 1994).

Die traditionelle Methode der Terpenisolierung ist aufwendig und geht mit hohen Preisen für ätherische Öle einher. Aufgrund der hohen Preise und der Tatsache, dass der Bedarf an ätherischen Ölen nicht mehr mit traditionellen natürlichen Rohstoffen gedeckt werden kann, wurde dazu übergangen, die Zielsubstanzen synthetisch herzustellen. Das führte bis heute dazu, dass über drei viertel der Aromastoffe synthetisch hergestellt werden (Luckner, 1990). Die Akzeptanz des Verbrauchers gegenüber synthetischen Zusatzstoffen in Lebensmitteln, Pharmaka und Haushaltsartikeln ist jedoch im Vergleich zu ätherischen Ölen aus natürlichen Quellen deutlich geringer. Ein Aromastoff darf jedoch nur dann als „natürlich“ gekennzeichnet werden, wenn die aromatisierenden Bestandteile des Aromas ausschließlich aus natürlichen Aromastoffen oder Aromaextrakten bestehen<sup>1</sup>. Problematisch ist ebenso die Neuzulassung von Aromastoffen, die synthetisch hergestellt sind. Die Reglementierungen der EU sind heute im Vergleich zum Zulassungsverfahren neuer Zusatzstoffe vor 50 Jahren deutlich straffer. Aus diesen Gründen ist der Bedarf an neuen Methoden zur Erschließung von Aroma, Duft- und Farbstoffen groß. Eine Möglichkeit sind dabei biokatalytische Verfahren. Vor allem die Regio-, Chemo- und Enantioselektivität von Enzymen sind enorme Vorteile, die in folgenden Abschnitten näher diskutiert werden. Vor allem der wirtschaftliche Aspekt der Kostenminimierung (Einsparen von Produktaufreinigungsschritten und Energie) und der ökologische Aspekt spielen eine große Rolle.

## 1.2 Enzyme als Biokatalysatoren

Der Bedarf an industriellen Anwendungen von Enzymen nimmt einen hohen wirtschaftlichen Stellenwert ein. Besonders in den Sektoren der Synthesechemie, der Pharmazie, der Lebensmittel- und der Waschmittelindustrie haben Enzyme eine große Bedeutung, so dass der Bedarf an Enzympräparaten hoch ist. Von den derzeit bekannten Enzymen werden zirka 100 in etwa 130 industriellen Prozessen eingesetzt (Straathof et al., 2002), was einem Wert von etwa vier bis fünf Milliarden Euro des Enzymweltmarktes entspricht. Prognosen zufolge liegt die jährliche

---

<sup>1</sup> Aromenverordnung vom 22.12.1982, zuletzt geändert am 30.09.2008

Steigerungsrate des Enzymweltmarktes bei etwa 10 % und Produkte im Wert von 150 Milliarden Euro werden mit Hilfe von Enzymen jährlich hergestellt<sup>2</sup>.

Vor allem in der organischen Synthese sind Biokatalysatoren begehrt, wofür es unterschiedliche Gründe gibt. Enzyme arbeiten auch in komplexen Matrices und unter milden Reaktionsbedingungen hoch selektiv und katalysieren die Produktbildung regio-, chemo- und enantioselektiv, was in der Synthesechemie eine große Herausforderung darstellt (Faber, 2011). Nebenreaktionen werden unter Enzymkatalyse vermieden, was zu einer hohen Ausbeute der Zielsubstanz führt und die Produktisolierung aus dem System erheblich erleichtert. Nebenprodukte, die auf synthetischem Weg entstehen würden, müssen somit nicht kostenaufwendig abgetrennt und entsorgt werden. Sowohl der Aspekt der Energieersparnis als auch der des Umweltschutzes werden dabei berücksichtigt (Silverman, 2000).

Neben den herausragenden Vorteilen gibt es jedoch einige Herausforderungen, die bei der enzymatischen Katalyse berücksichtigt werden müssen. Enzyme kommen meist in wässriger Umgebung vor und zeigen hier ihre maximalen katalytischen Eigenschaften. Für die Umsetzung von schlecht wasserlöslichen Substraten, aber auch für die Entstehung von hydrophoben Produkten konnte zwar gezeigt werden, dass Enzyme auch in organischen Phasen arbeiten (Klibanov, 1990), die Wirksamkeit jedoch hinter der in wässrigen Systemen zurücksteht. Die Stabilität von Enzymen nimmt generell eine zentrale Rolle ein, da vor allem membranständige Enzyme labil sind und empfindlich auf Systemänderungen wie z. B. pH-Wert, Temperatur und Zusammensetzung des Mediums reagieren (Bühler, 2003). In diesem Zusammenhang ist auch zu beachten, dass das Enzym durch eine zu hohe Konzentration von Substrat bzw. Produkt inhibiert werden kann. Mitunter ist es möglich, dass einige Enzyme für bestimmte Anwendungsprozesse wenig spezifisch sind und unerwünschte Nebenreaktionen bzw. das Weiterreagieren oder sogar den Abbau der eigentlichen Zielverbindung katalysieren, was eine aufwendige und teure Reinigung bzw. Produktisolierung mit sich bringt (Faber, 2011). Weiter sind Enzyme in vielen Fällen Cofaktor-abhängig, was eine Regenerierung oder Nachdosage dieser oft sehr teuren Substanzen wie zum Beispiel NADH bzw. NADPH oder auch ATP notwendig macht.

---

<sup>2</sup> [http://www.schaumann-stiftung.de/deutsch/download/2\\_4\\_antranikian\\_pp.pdf](http://www.schaumann-stiftung.de/deutsch/download/2_4_antranikian_pp.pdf), Abruf der Seite 10.09.2011

Seit geraumer Zeit gibt es unterschiedliche Ansätze, um sich dieser Schwierigkeiten anzunehmen. An erster Stelle steht die Wahl des richtigen Enzyms bzw. Organismus, der für den biokatalytischen Prozess geeignet ist (Faber, 2011). Dabei spielt die zur Verfügung stehende Enzymmenge eine entscheidende Rolle. Tendenziell werden vor allem pflanzliche Enzyme und Enzyme aus Pilzen bevorzugt in *E. coli* und *Bacillus*-Arten heterolog exprimiert, um eine hohe Ausbeute und hohe Aktivität des Zielenzyms zu gewährleisten. Enormer Vorteil ist dabei das schnelle Wachstum von *E. coli* in kostengünstigen Zellmedien und die einfache Handhabung. Im Gegensatz zum Ursprungswirt des Enzyms nimmt *E. coli* keine posttranslationalen Modifizierungen vor, so dass sich die Eigenschaften des heterolog exprimierten Enzyms in einigen Fällen von denen des Wildtyps unterscheiden können. So konnte gezeigt werden, dass eine heterolog exprimierte Styren-Monooxygenase aus *Pseudomonas sp.* VLB120 eine sehr viel geringere spezifische Aktivität hinsichtlich der Styrenepoxidierung zeigte als eine Styren-Monooxygenase aus dem Wildtyp *Pseudomonas putida* S12, die der Styren-Monooxygenase aus VLB120 sehr ähnlich ist (Nöthe & Hartmans, 1994, Panke et al., 1999, Panke et al., 1998, Panke et al., 2000).

Ein weiterer Faktor ist die Inhibierung des Enzyms während des biokatalytischen Prozesses durch zu hohe Substrat- oder Produktkonzentrationen. Die Konzentrationen an Substrat können auf einen optimalen Wert eingestellt werden, indem die Verbindung kontinuierlich je nach Bedarf dem System zudosiert wird. Einerseits darf dabei die vom Enzym tolerierte Konzentration nicht überschritten werden, andererseits sollte sie nicht zu weit unter dieser Konzentration liegen, um die Wirtschaftlichkeit des Prozesses zu gewährleisten (Faber, 2011). Die Notwendigkeit der kontinuierlichen Produktentfernung *in situ* stellt dabei eine größere Herausforderung dar. In den letzten Jahren wurden einige Techniken entwickelt, die sich damit beschäftigen. Eine der gängigsten Methoden ist die Festphasenextraktion, bei der das Produkt an ein Polymer z. B. einen Ionenaustauscher adsorbiert und somit immobilisiert wird (Freeman et al., 1993, Lye & Woodley, 1999, Voser, 1982). Diese Methode wurde auf die biokatalytische Herstellung von 3-Methylcatechol angewendet, das aus Toluol unter Einfluss einer Catechol-2,3-dioxygenase aus *P. putida* 2313 gewonnen wird. Das Produkt wird dabei an Aktivkohle adsorbiert und aus dem System entfernt (Robinson et al., 1992). Eine weitere Methode zur Produktentfernung ist das Arbeiten mit zwei Flüssigphasen, z. B. einer wässrigen

Phase und einer organischen Phase, die nicht miteinander mischbar sind. Die eigentliche Katalyse findet in der wässrigen Phase statt, in der das Enzym löslich ist. Die meist hydrophoben Produkte reichern sich in der organischen Phase an (Faber, 2011). Vorteil der Produktentfernung ist außerdem die Verschiebung des chemischen Gleichgewichtes auf die Seite der Produkte, wodurch die Ausbeute deutlich erhöht werden kann.

Da eine Vielzahl von Enzymen wie z. B. Dehydrogenasen, Oxygenasen oder Oxidasen Cofaktor-abhängig ist, ist eine Regenerierung dieser Verbindungen wie z. B. NAD(P)H notwendig. Das Zudosieren dieser meist sehr teuren Verbindungen bedeutet, dass die Wirtschaftlichkeit des Prozesses darunter leidet und die Vorteile der enzymatischen Katalyse gegenüber der chemischen Synthese an Bedeutung verlieren. Daher wird auf das Arbeiten in Ganzzellsystemen zurückgegriffen, wobei die Cofaktorregenerierung von der lebenden Zelle gewährleistet wird (Leak et al., 2009). Dabei muss beachtet werden, dass das empfindliche Gleichgewicht zwischen Zellwachstum, Enzymexpression, Katalyse und Cofaktorregenerierung stabilisiert wird (Bühler, 2003).

Besonders die enzymkatalysierte Oxyfunktionalisierung nimmt einen immer größeren Stellenwert in der organischen Synthese ein, da eine hohe Ausbeute an optisch reinen Produkten mit der Enzymkatalyse unter sehr milden Bedingungen bewerkstelligt werden kann und da durch den Einsatz von Enzymen die Verwendung von ökologisch bedenklichen Katalysatoren überflüssig wird. Produkte, die auf diesem Weg hergestellt werden, sind vor allem hochrein, was der Enantio- und Regioselektivität der Enzyme zuzuschreiben ist. Auf synthetischem Weg wäre die Herstellung oft nur mit gefährlichen und teuren Chemikalien möglich, die bei weitem nicht die Reinheit und die Ausbeuten gewährleisten können wie die biokatalytische Synthese. Besonders im Hinblick auf die Anwendung in Lebensmitteln z. B. als Zusatzstoffe ist dies von zentraler Bedeutung, da der Einsatz von Zusatzstoffen einem strengen Zulassungsverfahren unterliegt<sup>3</sup>. In den folgenden Abschnitten soll daher auf oxidierende und insbesondere auf oxyfunktionalisierende Enzyme eingegangen werden.

---

<sup>3</sup> Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung – ZzulV), zuletzt geändert am 28.03.2011



### 1.3 Oxidierende Enzyme

Alle oxidierenden Enzyme lassen sich nach EC-Klassifizierung in die Gruppe der Oxidoreduktasen, also der ersten Enzymklasse, einordnen<sup>4</sup>. Im Allgemeinen gehören alle Enzyme dieser Klasse an, die Redoxreaktionen katalysieren wie Dehydrogenasen, Oxidasen, Reduktasen und Oxygenasen. Die Einteilung der Enzyme in die einzelnen Gruppen erfolgt über den entsprechenden Elektronen-Donor (Burton, 2003). So wird unter anderem unterschieden zwischen Oxidoreduktasen, bei denen eine CH-OH-Gruppe Elektronen-Donor ist (EC 1.1) oder auch Aldehyde/Ketone (EC 1.2). Eine klare Einteilung der Enzyme in besagte Klassen ist nicht immer möglich, da manche Enzyme Reaktionen mit mehreren Substraten bzw. Elektronen-Donoren katalysieren. Eine Einteilung der Enzyme kann jedoch auch über das erforderliche Coenzym erfolgen (Silverman, 2000).

Im Gegensatz zu Dehydrogenasen, bei denen kein Sauerstoff in den Reaktionsmechanismus involviert ist, dient bei Oxygenasen, Peroxidasen und Oxidasen Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor. Unter diesem Gesichtspunkt wurde eine Klassifizierung oxidierender Enzyme vorgenommen (Abbildung 5).

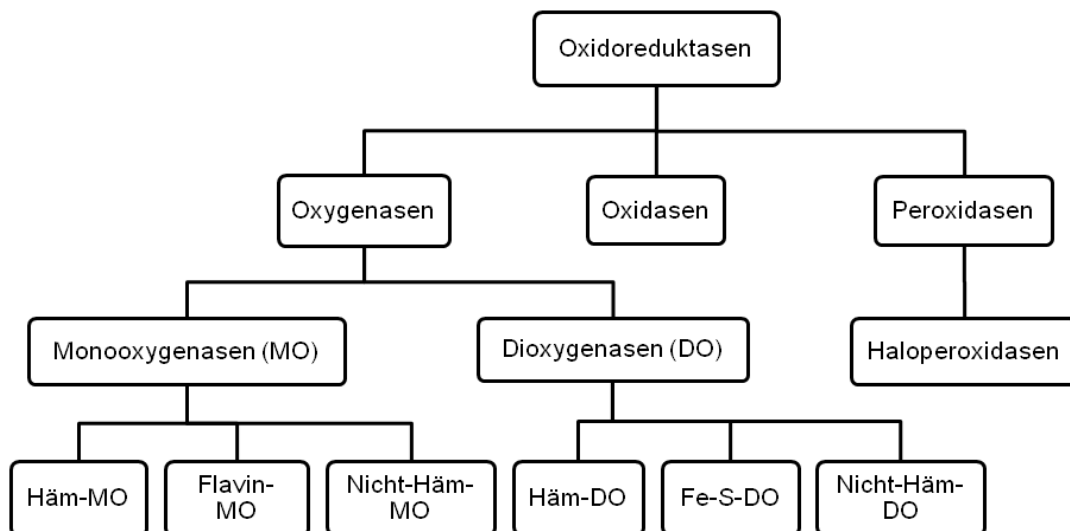


Abbildung 5 Klassifizierung oxidierender Enzyme (nach Burton, 2003)

Im Allgemeinen wird in drei Hauptklassen unterteilt, zu denen die Oxygenasen, Oxidasen und Peroxidasen gehören (Bühler, 2003, Burton, 2003). Im Gegensatz zu den Oxidasen, welche Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwenden und Wasser oder Wasserstoffperoxid produzieren, verwenden Peroxidasen Wasserstoffperoxid

<sup>4</sup> [www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org); Abruf der Seite: 16.08.2011

und bilden Wasser. In der Gruppe der Oxygenasen wird eine weitere Unterteilung vorgenommen. Man unterscheidet Mono- und Dioxygenasen, welche ein bzw. zwei Sauerstoffatome auf das Substrat übertragen. Dioxygenasen werden unterteilt in Häm-, Nicht-Häm und Eisen-Schwefel-Dioxygenasen. Zu den Monooxygenasen werden Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen, flavin-abhängige und weitere Monooxygenasen wie Phenoloxidasen gezählt (Burton, 2003).

In der Natur übernehmen Oxygenasen unter anderem eine wichtige Rolle im Abbau von Kohlenwasserstoffverbindungen, vor allem von aromatischen Verbindungen. Der Abbau wird dabei meist durch eine Oxygenase-katalysierte Hydroxylierung initiiert (Faber, 2011, Harayama et al., 1992) und verläuft weiter über enzymkatalysierte Reaktionen, bei denen z. B. durch weitere Oxygenierungsreaktionen und Ringspaltung zentrale Stoffwechselprodukte des Metabolismus entstehen, die ihrerseits in den Stoffwechsel geleitet werden können und der Energiebereitstellung für den Organismus dienen. So werden phenolische Verbindungen durch Dioxygenasen dihydroxyliert und durch die Beteiligung einer zweiten Dioxygenase, z. B. der Catechol-1,2-Dioxygenase, gespalten (Faber, 2011).

Im Folgenden soll vor allem auf Monooxygenasen, Dioxygenasen und Haloperoxidasen eingegangen werden, die für die Sauerstoffinsertion verantwortlich sind.

### **1.3.1 Monooxygenasen**

Monooxygenasen katalysieren die Übertragung von einem Sauerstoff-Atom auf das Substrat. Ein zweites Sauerstoff-Atom wird parallel zu Wasser reduziert, indem ein Cofaktor als Elektronen-Donor fungiert. Als Cofaktor kommen meist NADH oder NADPH vor. Als weitere Elektronen-Donoren kommen Metall, Häm oder auch Flavin-haltige Systeme in Frage (Burton, 2003).

Die Einteilung der Monooxygenasen kann entsprechend dem oxidierten Substrat vorgenommen werden. Es werden zwei Unterklassen unterschieden; bei der ersten handelt es sich um Monooxygenasen, die die Hydroxylierung von Aromaten (Hydroxylasen) katalysieren, während bei der zweiten Klasse die Peroxidbildung betrachtet wird, zu welcher die Baeyer-Villiger-Monooxygenasen zählen (Roberts & Wan, 1998). Klassisch unterscheidet man jedoch anhand der prosthetischen Gruppe

des Enzyms. Die Unterteilung erfolgt in Häm-, Nicht-Häm- und Flavin-Monooxygenasen, je nachdem welche prosthetische Gruppe im aktiven Zentrum vorhanden ist (Burton, 2003).

### 1.3.1.1 Mechanismus der Monooxygenasen

Die größte Gruppe der Monooxygenasen sind die Häm-Monooxygenasen, zu der die P450 Monooxygenasen zählen. Sie kommen ubiquitär vor und erfüllen wichtige Funktionen im Stoffwechsel wie zum Beispiel bei Entgiftungsmechanismen. Dabei wird das Ausschleusen von lipophilen Verbindungen gewährleistet, indem der hydrophile Charakter erhöht wird (Omura, 1999). Weiter sind sie an der Synthese von Steroidhormonen, Sterolen und Lipidbiofaktoren wie der Eicosanoide, Vitamin D<sub>3</sub> und der Retinoide beteiligt (Omura, 1999). Es handelt sich bei dieser Enzymklasse um Hämproteine, die in Eukaryoten im endoplasmatischen Retikulum membranständig vorkommen, in bakteriellen Organismen jedoch im Cytosol lokalisiert sind (Omura, 1999). Hämproteine enthalten als prosthetische Gruppe einen oktaedrischen Eisen-Porphyrin-Komplex, bei dem Eisen das Zentralatom ist und das Porphyrin als tetradentater Ligand äquatorial gebunden ist. Axial besetzt ein Schwefel-Atom eines proteinogenen Cystein-Restes die fünfte Koordinationsstelle, während im substratfreien Zustand Wasser an die noch verbleibende axiale Position gebunden ist (Faber, 2011).

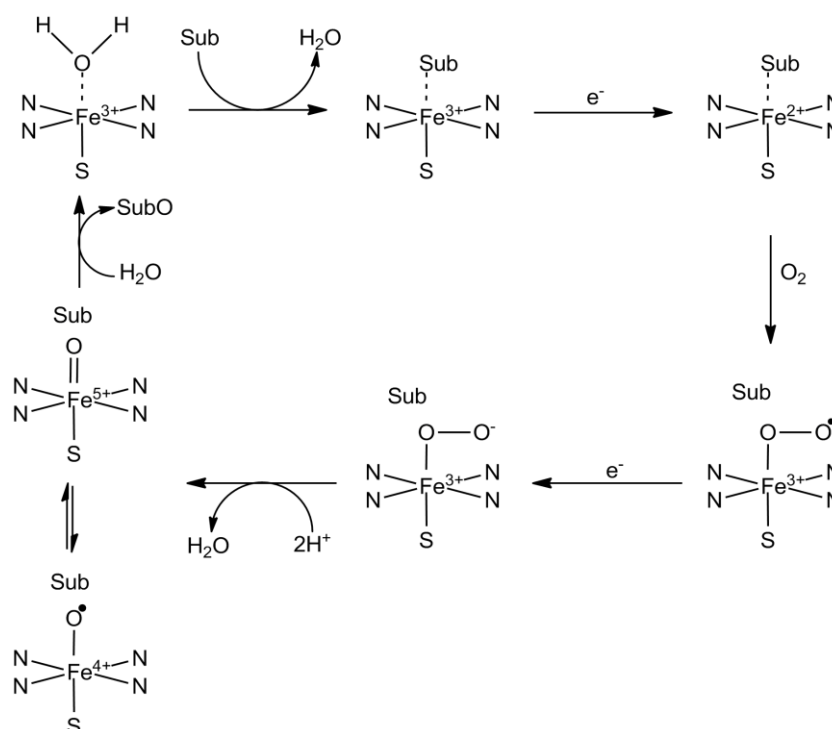


Abbildung 6 Katalytischer Zyklus von Cytochrom P450 Monooxygenasen (Faber, 2011)

Im Zuge des katalytischen Zyklus (Abbildung 6) bindet das Substrat in die hydrophobe Tasche des Enzyms. Der Cofaktor NADH bzw. NADPH liefert für die Reduktion ein Elektron, welches über einen anderen Cofaktor wie Flavinnucleotide, Ferredoxin oder Cytochrom  $b_5$  bereit gestellt wird, so dass der Oxidationsstatus des Zentralatoms von +3 auf +2 reduziert wird. Molekularer Sauerstoff bindet an den Eisenkomplex, so dass Eisen(II) zu Eisen(III) oxidiert wird. Der radikalisch vorliegende Sauerstoff wird durch ein weiteres Elektron aus NADH negativ geladen. Da die Bindung zwischen beiden Sauerstoff-Atomen aktiviert und somit gelockert ist, kann ein Sauerstoff-Ion ( $O^{2-}$ ) abstrahiert werden, das mit zwei Protonen zu Wasser reagiert. Im Eisen-Komplex liegt das übrige Sauerstoff-Teilchen radikalisch vor und das Zentralatom hat eine Oxidationszahl von +4. Diese Verbindung reagiert im folgenden Schritt mit dem Substrat, auf welches das Sauerstoff-Teilchen übertragen wird. Nach Verlassen des oxidierten Substrats liegt das Zentralatom wieder im Ausgangszustand vor (Faber, 2011). P450 Monooxygenasen katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen wie Hydroxylierungen, Epoxidierungen und Oxidationen von Heteroatomen. Sie weisen ein breites Substratspektrum auf und arbeiten trotzdem hoch regio- und enantioselektiv (Zehentgruber, 2009).

Flavin-abhängige Monooxygenasen katalysieren im Gegensatz zu den P450 Monooxygenasen nicht über einen Eisenkomplex; vielmehr liegt ein Flavinkomplex vor, über welchen der katalytische Zyklus erfolgt (Abbildung 7).

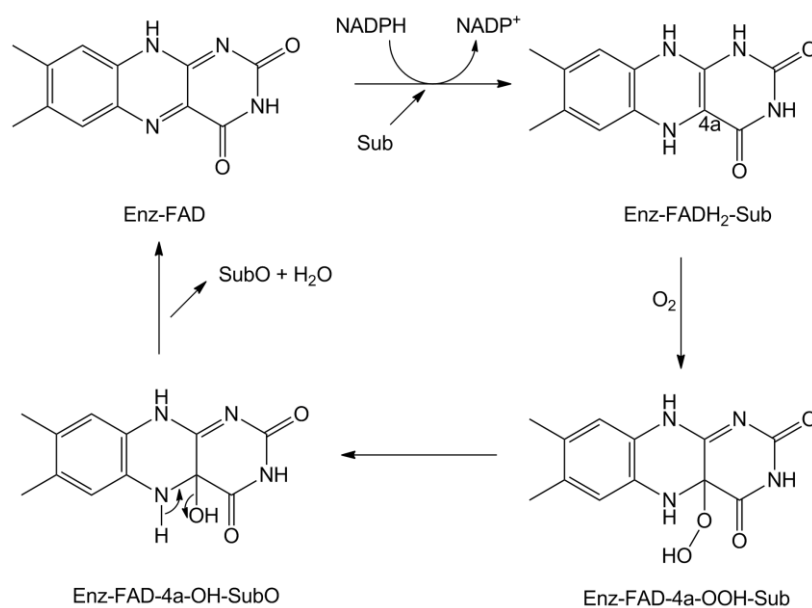


Abbildung 7 Katalytischer Zyklus von Flavin-Monooxygenasen (Faber, 2011)

In Gegenwart des Substrats reduziert NADPH den Enzym-FAD-Komplex zu einem Enzym-FADH<sub>2</sub>-Substrat-Komplex. Molekularer Sauerstoff wird an den Cofaktor addiert, so dass ein Flavin-Hydroperoxid gebildet wird, welches nach Deprotonierung als starkes Nucleophil mit einer Carbonylgruppe des Substrats reagiert. Nach Umlagerung des so entstandenen Produktes zu einem Lacton/Ester und anschließender Wassereliminierung liegt der Enzym-FAD-Komplex in seinem Ausgangszustand vor und es wurde ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen (Faber, 2011).

Typische Reaktionen für Flavin-Monooxygenasen sind Hydroxylierungsreaktionen aromatischer aktivierter Verbindungen, aber auch Baeyer-Villiger-Oxidationen und die Oxidation von Heteroverbindungen (Zehentgruber, 2009).

### **1.3.1.2 Reaktionen katalysiert durch Monooxygenasen**

#### Hydroxylierung

Monooxygenasen katalysieren eine Vielzahl von Reaktionen, bei der die Hydroxylierung am häufigsten abläuft. Bei der Insertion von Hydroxylgruppen am nicht aktivierten Kohlenstoff-Atom wird für die Monooxygenase der Begriff der Hydroxylase verwendet (Suske et al., 1997). So übernehmen Hydroxylasen unter anderem wichtige Funktionen bei Abbaureaktionen und dem Metabolismus von xenobiotischen Verbindungen (Holland, 1999). P450 Monooxygenasen katalysieren vor allem die Hydroxylierung von aromatischen, aliphatischen, gesättigten und ungesättigten Verbindungen. Herausragend ist jedoch, dass die Hydroxylierung am nicht aktivierten Kohlenstoff-Atom katalysiert wird, wofür es in der organischen Synthese kein Pendant gibt (Faber, 2011).

Bei Hydroxylierungsreaktionen von Alkanen können sowohl stereo- als auch regioselektiv Hydroxylgruppen in Moleküle eingeführt werden, deren Produkte von hohem Interesse sind. Als Beispiel sind hier die Steroide zu nennen, die in der Pharmaindustrie Anwendung finden. Hydroxylierungen von Terpenen resultieren nicht selten in der Bildung von aromaaktiven Verbindungen wie zum Beispiel die Bildung von Muskon ausgehend von  $\beta$ -Hydroxyisobutansäure (Abbildung 8) (Branca & Fischli, 1977).

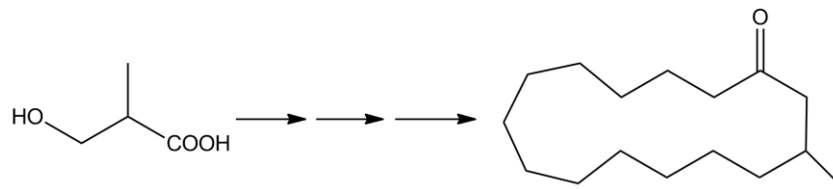


Abbildung 8 Bildung von Muskon aus  $\beta$ -Hydroxyisobutansäure

Je nachdem welcher Mikroorganismus verwendet wird, ist eine regioselektive Hydroxylierung möglich. So kann durch den Einsatz von *Fusarium equiseti* aus Lithocholsäure Ursodeoxycholsäure gewonnen werden, wobei das Substrat selektiv an der  $7\beta$ -Position hydroxyliert wird. Das Produkt findet in der Medizin Anwendung zur Gallensteintherapie (Sawada et al., 1982). Ein anderes Beispiel ist das Alkaloid Marcfortine A, das je nachdem, welches Enzym verwendet wird, an Position 5, 10, 12, 14, 15, 16 oder 27 hydroxyliert werden kann. Die daraus resultierenden Produkte weisen andere biologische Aktivitäten auf und finden daher unterschiedlichen Einsatz (Lee et al., 1997).

Unter dem Gesichtspunkt der Selektivität ist auch die Enantioselektivität von großer Bedeutung. Auch hier kann die Wahl der Enzymquelle darüber bestimmen, welches Produkt bevorzugt entsteht. So ist bekannt, dass bei der  $\beta$ -Oxidation von Isobutansäure bei der Verwendung von *Candida rugosa* IFO 750 ein Enantiomerenverhältnis von 99% des (*S*)-konfigurierten Produktes ausgeprägt ist, während bei Verwendung von *Candida rugosa* IFO 1542 97 % des (*R*)-konfigurierten Produktes gebildet werden (Ohashi & Hasegawa, 1992).

Nicht nur Alkane, sondern auch aromatische Ringsysteme dienen als Substrat für Hydroxylasen. Hydroxylierungen sind am aromatischen Ring vor allem in *o*- und *p*-Stellung begünstigt, in *m*-Position jedoch seltener (Harayama & Reikik, 1989). Als Substrate werden vor allem kleinere Phenole angegriffen, komplexe und raumfordernde jedoch nicht (Faber, 2011). Eine Enzymklasse, die unter anderem auch in Lebensmitteln eine hohe Relevanz hat, ist die Klasse der Polyphenoloxidasen, welche die Bildung von *o*-hydroxylierten Zwischenverbindungen, den so genannten Catecholen, katalysieren. Das Weiterreagieren zu Chinonen und die sich anschließende Polymerisation sind verantwortlich für die Braunfärbung von phenolreichen Lebensmitteln bei Kontakt mit der Luft (Belitz et al., 2008) (Abbildung 9).

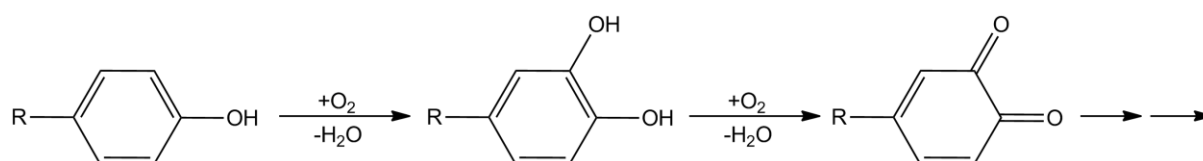


Abbildung 9 Enzymatische Oxidation von phenolischen Verbindungen

Nach dem gleichen Mechanismus reagieren aromatische Aminosäuren zu Verbindungen, die von großem Interesse sind. 3,4-Dihydroxyphenylalanin, das von Tyrosin abgeleitet ist, wird unter anderem bei Parkinson eingesetzt und L-Epinephrin als synthetisches Adrenalin (Faber, 2011).

### Epoxidierung von Alkenen

In der organischen Synthese sind einige Methoden bekannt, die zur Epoxidierung von Olefinen herangezogen werden. Mit der Katsuki-Sharpless-Methode können allylische Alkohole epoxidiert werden (Johnson & Sharpless, 1986), während andere Arbeitsgruppen die asymmetrische Epoxidierung von aryl-substituierten Alkenen untersuchen (Jacobsen, 1993). Beide Methoden verwenden hochreaktive Katalysatoren wie z. B. BuOOH oder NaOCl. Auf enzymatischem Weg ist die Epoxidierung von Alkenen (Abbildung 10) mit Monooxygenasen und Chlorperoxidasen bekannt (Fang *et al.*, 1995).

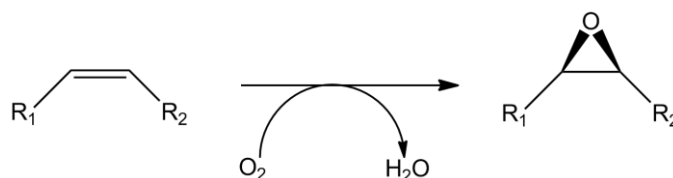


Abbildung 10 Epoxidierung von Alkenen

Die Produktion von Epoxiden auf enzymatisch katalysierten Weg unterliegt einigen Limitierungen, die es schwierig machen, im präparativen Maßstab zu arbeiten. Vor allem die entstehenden Epoxide selbst, die bei steigender Konzentration zur Enzyminhibierung führen, stellen eine Herausforderung im technologischen Prozess dar. Epoxide sind relativ instabile Verbindungen, die weiter reagieren und das Produktspektrum erweitern.

Die am besten erforschte Monooxygenase, welche in der Lage ist Epoxidierungsreaktionen an aliphatischen Systemen durchzuführen, stammt aus dem Organismus *Pseudomonas oleovorans* (Fu *et al.*, 1991). Aliphatische Alkene mit

endständiger Doppelbindung werden von diesem Nicht-Häm-Enzym zum entsprechenden (*R*)-1,2-Epoxid in hohen Ausbeuten umgesetzt (Fang *et al.*, 1995).

Auch Bakterien sind in der Lage, Alkene zu epoxidieren. Dabei sind je nach Substrat unterschiedliche Konfigurationen und Ausbeuten möglich. So setzt *Corynebacterium equi* 1-Buten zum (*R*)-konfigurierten Epoxid (70% ee) um, während 1-Hexadecen zu 100% zum (*R*)-konfigurierten Epoxid reagiert (Faber, 2011).

Während Monooxygenasen über molekularen Sauerstoff und NAD(P)H Epoxidierungsreaktionen katalysieren, ist bekannt, dass auch Chloroperoxidasen selbige Reaktion jedoch mit Wasserstoffperoxid als Oxidans katalysieren. Einfache *cis*-Alkene werden z. B. durch eine Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* epoxidert (Fang *et al.*, 1995).

### Baeyer-Villiger Reaktionen

Bei der Baeyer-Villiger Reaktion werden acyclische Ketone zu ihren entsprechenden Estern bzw. cyclische Ketone zu Lactonen umgesetzt, wobei eine Peroxosäure als Oxidans dient. Diese Reaktion wurde 1899 von Baeyer und Villiger entdeckt und verläuft über zwei Schritte: die Carbonylgruppe wird von der Säure angegriffen, wodurch sich das so genannte „Criegee“-Intermediat bildet (Criegee, 1948). Durch Umlagerungsreaktionen wird abschließend der entsprechende Ester bzw. das Lacton freigesetzt (Abbildung 11). Die Stereochemie des zentralen Kohlenstoffatoms bleibt dabei erhalten.

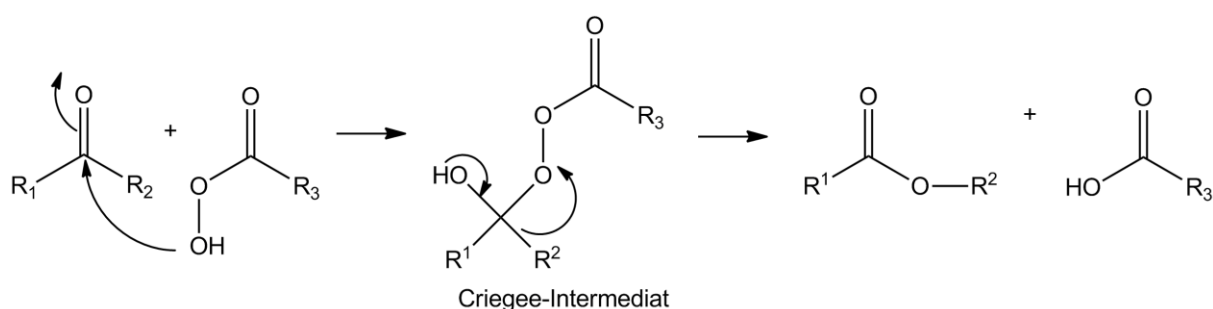


Abbildung 11 Mechanismus der Baeyer-Villiger-Oxidation (Faber, 2011)

Bei der asymmetrischen Reaktion entstehen hochreine Produkte, die wiederum als Ausgangsverbindungen für andere Synthesen verwendet werden (Leak *et al.*, 2009). Enzyme, die die Baeyer-Villiger Oxidation katalysieren, werden als Baeyer-Villiger Monooxygenasen bezeichnet. Es handelt sich dabei in den meisten Fällen um Flavin-abhängige Monooxygenasen, die hoch stereoselektiv sind (Leak *et al.*, 2009). Das



NADPH-reduzierte Flavin reagiert zum Flavinperoxid, welches den Carbonyl-Kohlenstoff angreift und das „Criegee“-Intermediat bildet (Leak et al., 2009). Im Fall der enzymatisch katalysierten Baeyer-Villiger Oxidation ersetzt der oxidierte Flavin-Cofaktor (Flavin-Hydroperoxid) die Säure.

Die ersten Beobachtungen bezüglich einer enzymatischen Baeyer-Villiger Oxidation wurden in den 50er Jahren gemacht, wobei Progesterone in Anwesenheit von *Aspergillus flavus* und *Penicillium* species zu Testolacton umgesetzt wurden (Fried, 1953, Peterson et al., 1953). Später konnte beobachtet werden, dass *Corynebacterium* species D-Fenchon zu 1,2-Fencholid und 2,3-Fencholid in einem Verhältnis von 9:1 umsetzten, was auf chemischen Weg nicht erreicht werden konnte (Chapman et al., 1965). Erstmals konnte eine enzymatische asymmetrische Baeyer-Villiger Oxidation 1966 festgestellt werden, bei der durch *Pseudomonas oleovorans* ( $\pm$ )-2-Heptylcyclopentanon zu  $\delta$ -Heptylvalerolacton oxidierte (Shaw, 1966).

Die am besten beforschte Baeyer-Villiger Monooxygenase ist die Cyclohexanon-Monooxygenase, welche mit über 100 Verbindungen ein breites Substratspektrum aufweist. Das Enzym katalysiert die Entstehung von optisch hochreinen Substanzen mit Ausbeuten, die zum Teil bei 100 % liegen (Leak et al., 2009). Bei der asymmetrischen Oxidation von prochiralen Verbindungen entstehen unter katalytischen Einfluss der Cyclohexanon-Monooxygenase bevorzugt die (S)-konfigurierten Verbindungen (Faber, 2011). Die Überexpression des Enzyms ist bereits in *E. coli* und in *S. cerevisiae* gelungen, wobei sowohl mit isolierten Enzymen als auch mit Ganzzellsystemen gearbeitet wurde (Doig et al., 2001, Stewart et al., 1996, Stewart et al., 1998, Walton & Stewart, 2002, Walton & Stewart, 2004). Nachteil bei der Arbeit mit isolierten Enzymen ist die Notwendigkeit der Cofaktorregenerierung (NADPH), der bei der Reaktion verbraucht, in Ganzzellsystemen über andere Enzyme wie Dehydrogenasen jedoch in nachgeschalteten Reaktionen regeneriert wird.

### Sulfoxidierung

Monooxygenasen werden des Weiteren zur Sulfoxidierung eingesetzt, bei der an das Schwefelatom eines Thioethers über zwei Schritte jeweils ein Sauerstoffatom eingeführt wird (Abbildung 12). Als Zwischenprodukt wird ein chirales Sulfoxid gebildet. (Faber, 2011).

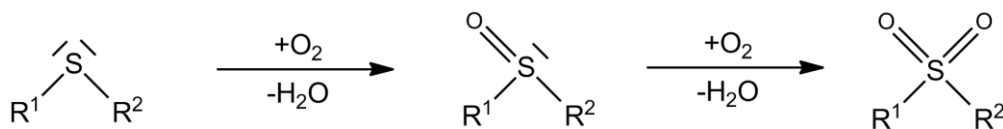


Abbildung 12 Sulfoxidierung von Thioethern (Faber, 2011)

Mit Hilfe von enzymatischer Sulfoxidierung konnten mehrfach chirale Sulfoxide in hoher Reinheit gewonnen werden. Es wurden dafür Mikroorganismen wie *Corynebacterium equi* (Ohta et al., 1985) eingesetzt, aber auch Pilze wie *Mortierella isabellina* (Holland & Carter, 1983), die bevorzugt das (*R*)-Sulfoxid bildeten.

### 1.3.1.3 Bedeutung von Monooxygenasen bei Terpentransformationen

Zahlreiche Monooxygenasen akzeptieren neben den im vorherigen Abschnitt erläuterten Substraten auch Terpene, welche in monooxygenierte Verbindungen überführt werden. Norisoprenoide wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon reagieren unter Einfluss von Cytochrom P450 Monooxygenasen zu den entsprechenden hydroxylierten Verbindungen. So konnte z. B. die Biotransformation zu 3-Hydroxy- $\alpha$ -ionon und 4-Hydroxy- $\beta$ -ionon durch Monooxygenasen aus Actinomyceten (Celik et al., 2005) oder durch eine Monooxygenase (CYP109D1) aus *Sorangium cellulosum* beobachtet werden (Khatri et al., 2010).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon sind selbst Aromastoffe, die nach Veilchen duften und unter anderem in Parfums und Seifen verarbeitet werden (Breitmaier, 2006). Die Umwandlung in die hydroxylierten Verbindungen ist von großem Interesse, da z. B. 4-Hydroxy- $\beta$ -ionon eine zentrale Verbindung der Carotinoidsynthese ist (Brenna et al., 2002, Eschenmoser et al., 1981) und bei der Retinolsynthese für Kosmetika eingesetzt wird (Khatri et al., 2010). Daher wurde eine P450 Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* durch Mutation derart modifiziert, dass im Vergleich zum Wildtyp eine 80fache Aktivität hinsichtlich der Bildung von 4-Hydroxy- $\beta$ -ionon erzielt wurde (Urlacher et al., 2006).

Neben höhermolekularen Terpenen werden auch Monoterpene von Monooxygenasen zu Hydroxyverbindungen umgesetzt. So konnte die Umsetzung von (*S*)-Limonen zu (-)-*trans*-Isopiperitenol, (-)-*cis*-Limonenepoxid, (-)-*trans*-Carveol (Bell et al., 2001), aber auch zu  $\alpha$ -Terpineol (Tan & Day, 1998) und zu Carvon beobachtet werden (Acosta et al., 1996). Ausgehend von der nach Citrus riechenden Ausgangsverbindung konnten wertschöpfend weitere Aromastoffe erschlossen

werden. Eine Hydroxylierung von Monoterpenen fand des Weiteren bei der Inkubation von 1,4-Cineol, einem Bestandteil des Eukalyptusöls, mit *Streptomyces griseus* statt. Als Hauptprodukt wurde 8-Hydroxycineol gebildet (Rosazza et al., 1987). Ähnliches konnte bei der Verwendung von *Bacillus cereus* beobachtet werden (Liu et al., 1988).

Die Oxyfunktionalisierung von Limonen ist ein anschauliches Beispiel für die stereoselektive Insertion von Sauerstoff. Während (*R*)-(-)-Carvon ein Minzaroma aufweist, ist das Aroma von (*S*)-(+)-Carvon durch einen Kümmelgeruch geprägt (Kaspera et al., 2005). Neben der Bildung von Carvon wird auch die Biotransformation von Carvon durch Monooxygenasen zu oxyfunktionalisierten Verbindungen katalysiert. Es wurden Produkte wie (1*S*,2*R*,4*R*)-Neoisodihydrocarveol, 2,3-Epoxy-(5*R*)-isopropenyl-2-methylcyclohexenol und (6*R*)-Isoprenyl-(3*R*)-methyl-2-oxo-oxepanon nachgewiesen, deren Bildung durch Monooxygenasen aus *Trichosporum cutaneum* katalysiert worden sind. Bei letzterer Verbindung handelt es sich um ein Lacton, dessen Bildung auf eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase zurückzuführen ist (Pinheiro & Marsaioli, 2007). Baeyer-Villiger-Monooxygenasen konnten in diesem Zusammenhang auch mit der Bildung von  $\alpha$ -Homocyclogeraniol aus  $\alpha$ -Ionon in Verbindung gebracht werden (Pinheiro & Marsaioli, 2007). Darüber hinaus konnten Hydroxylierungsreaktionen durch Monooxygenasen bei den Monoterpenen Campher, 2-Adamantanon und Linalool beobachtet werden. Als Reaktionsprodukte konnten 5-exo-Hydroxycampher, 5-Hydroxy-2-adamantanon und 8-Hydroxylinalool detektiert werden (Bell et al., 2010).

Ein weiteres terpenoides Substrat für Monooxygenasen ist das Sesquiterpen Valencen. Durch Mutation modifizierte P450 Monooxygenasen aus *Pseudomonas putida* waren in der Lage, Valencen zu (+)-Nootkaton und  $\beta$ -Nootkatol umzusetzen. Mit rekombinanten P450 Monooxygenasen aus *Bacillus megaterium* konnten  $\alpha$ -,  $\beta$ -Nootkatol, (+)-Nootkaton, *cis*-(+)-Valencen-1,10-epoxid, *trans*-(+)-Nootkaton-9-ol und (+)-Nootkaton-13*S*,14-epoxid nachgewiesen werden. (Sowden et al., 2005). Nootkaton ist ein Aromastoff, der intensiv nach Grapefruit riecht und eine sehr geringe Geruchsschwelle aufweist. Die Umsetzung von Valencen zu oxyfunktionalisierten Verbindungen konnte auch bei der Inkubation von Valencen mit

einer mikrosomalen Hydroxylase aus Chicoréewurzeln beobachtet werden (de Kraker et al., 2003).

Durch die in 1.3.1.2 beschriebenen Reaktionen von Monooxygenasen steht neben der Herstellung von Synthesechemikalien auch die Biokonversion von Terpenen zu oxyfunktionalisierten terpenoiden Verbindungen im Fokus. Vor allem die Aromenindustrie mit einem jährlichen Umsatz von 20 Milliarden US Dollar hat an diesen Produkten ein großes Interesse, da sie in vielen Fällen aromaaktiv sind und somit in Kosmetika, Parfums, Waschmitteln oder Lebensmitteln eingesetzt werden können. Die Gewinnung auf biotechnologischem Weg ist darüber hinaus in manchen Fällen ökonomischer als die Gewinnung aus Pflanzen oder die Herstellung auf chemosynthetischem Weg (Krings & Berger, 2010) und eröffnet neue Möglichkeiten für die Bereitstellung von Aromastoffen.

### 1.3.2 Dioxygenasen

Im Gegensatz zu den Monooxygenasen bauen Dioxygenasen zwei Sauerstoffatome in das Substrat ein (Burton, 2003) (Abbildung 13). Intermediär werden Hydro- oder Endoperoxide gebildet, die aufgrund ihrer Reaktivität weiter reagieren.

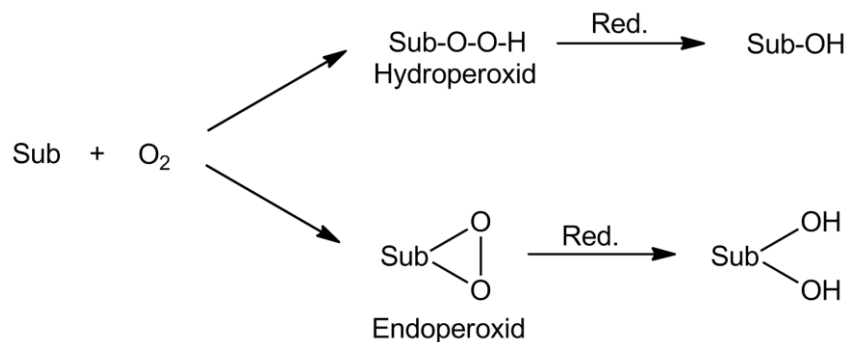


Abbildung 13 Von Dioxygenasen katalysierte Reaktionen (Faber, 2011)

Analog zu den Monooxygenasen werden auch bei den Dioxygenasen Unterteilungen anhand der prosthetischen Gruppe im Enzym vorgenommen. Je nach Koordinationszentrum werden Häm-, Nicht-Häm und Eisen-Schwefel-Dioxygenasen unterschieden, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

### 1.3.2.1 Mechanismus der Dioxygenasen

Bei bakteriellen Eisen-Schwefel-Dioxygenasen befindet sich im aktiven Zentrum ein Eisen-Schwefel-Cluster (Rieske-Cluster), bei dem zwei Eisen-Atome über je zwei Histidin- und zwei Cysteinreste koordiniert sind (Wackett, 2002).

Reduzierte Pyridinnucleotide liefern für die Aktivierung des Sauerstoffs zwei Elektronen, die zu einem Protein-Komplex mit Flavin-Cofaktor weitergeleitet werden. Die einzelnen Elektronen wandern zu einem [2Fe-2S]-Rieske-Cluster mit einem weiteren Eisen-Zentrum. Folgender Mechanismus (Abbildung 14) wird bei der Dihydroxylierung durch Rieske-Dioxygenasen postuliert (Wackett, 2002).

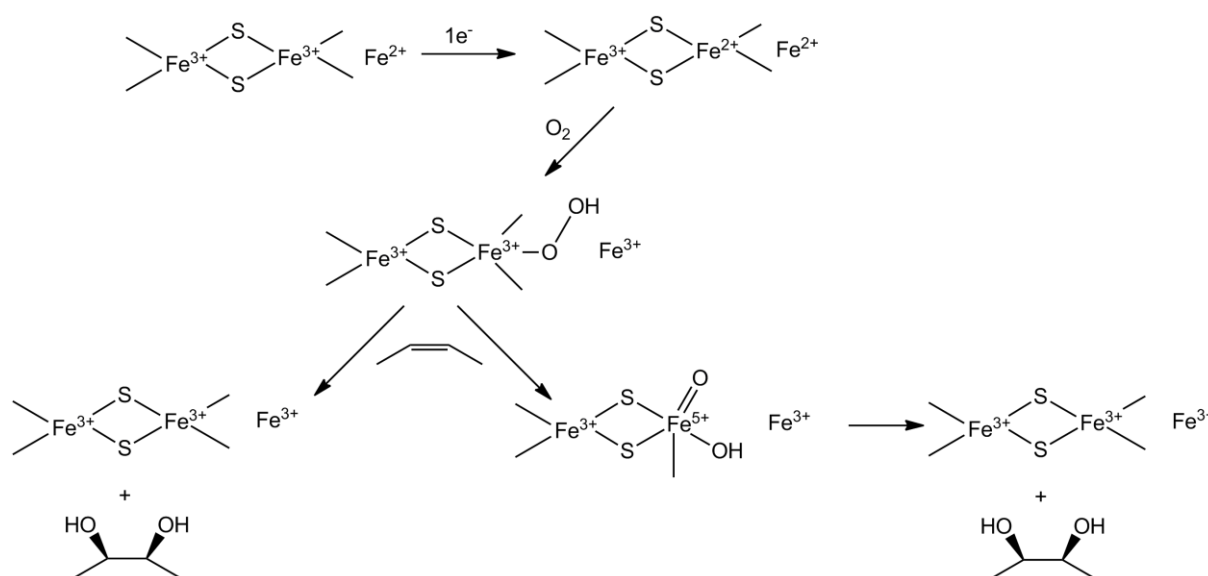


Abbildung 14 Postulierter Mechanismus bei Rieske-Dioxygenasen (Wackett, 2002)

Nicht-Häm-Dioxygenasen sind meist NADH-abhängig und verfügen über ein höheres Redoxpotenzial (Burton, 2003). Sie katalysieren vor allem Reaktionen wie die *cis*-Dihydroxylierung, Ringspaltung, Hydroperoxidbildung und Oxidation von Fettsäuren (Faber, 2011). Als Cosubstrat wird unter anderem  $\alpha$ -Ketoglutarat verwendet, welches als Succinat aus dem katalytischen Zyklus herausgeschleust wird (Abbildung 15).

Charakteristische Vertreter dieser Gruppe sind Carotinoid-spaltende Dioxygenasen, die für die Biosynthese des Retinals der Retina verantwortlich sind und sowohl in Pflanzen, Mikroorganismen und Säugetieren vorhanden sind (Aulridge et al., 2006, Faber, 2011). Weiter sind Catechol-Dioxygenasen zu nennen, welche die Spaltung von Catecholen katalysieren. Abhängig von der Spaltstelle wird unterschieden zwischen Intradiol- und Extradiol-Catechol-Dioxygenasen (Bugg & Ramaswamy,

2008). Im aktiven Zentrum haben Intradiol-Catechol-Dioxygenasen ein Eisen(III)-Zentralatom, welches über zwei Tyrosin- und zwei Histidinreste komplexiert ist. Bei Extradiol-Catechol-Dioxygenasen ist Eisen(II) über zwei Histidin- und einen Glutaminsäurerest gebunden (Bugg & Ramaswamy, 2008).

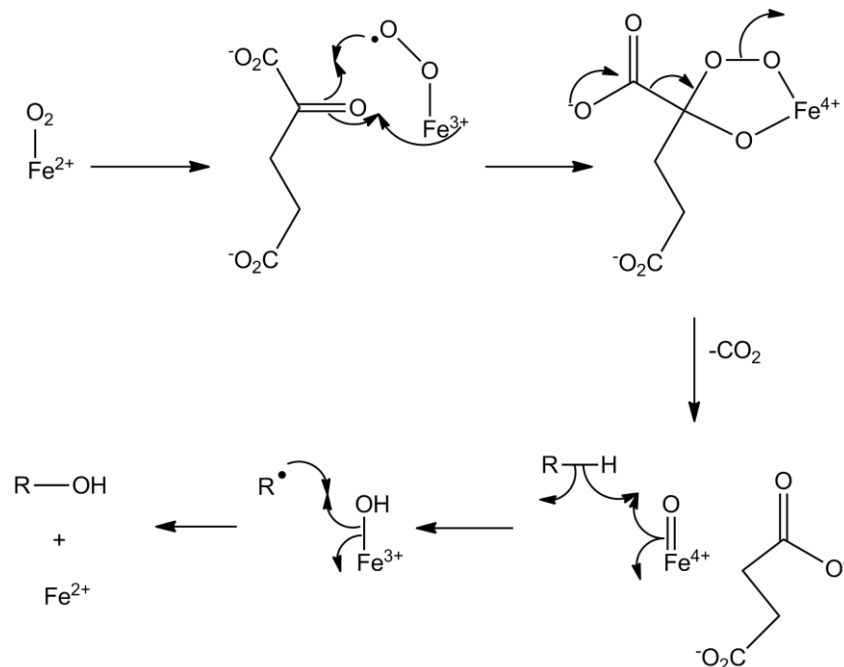


Abbildung 15 Postulierter Dioxygenase-Mechanismus mit  $\alpha$ -Ketoglutarat als Kosubstrat

Bei Häm-Dioxygenasen ist analog zu den P450 Monooxygenasen das Eisen über das Porphyrin an vier Positionen komplexiert, während bei Nicht-Häm-Dioxygenasen nur maximal drei der vier Positionen koordiniert sind, worin sich die große Vielfalt an katalysierten Reaktionen begründet. Einerseits ist die Übertragung von je einem Sauerstoffatom auf zwei Substratmoleküle möglich, wobei es sich um intermolekulare Dioxygenasen handelt. Der häufigere Fall ist jedoch die Übertragung von beiden Sauerstoffatomen auf ein Substratmolekül; man spricht dann von einer intramolekularen Dioxygenase (Westendorf, 2005).

Gemeinsamkeit aller Dioxygenasen ist die Bildung von Peroxiden, wobei sowohl Hydroperoxide als auch Endoperoxide als Intermediate vorliegen, die nicht stabil sind und schnell weiterreagieren. Durch Reduktion wird der entsprechende Alkohol gebildet: bei Hydroperoxiden als Intermediat der Monoalkohol, bei Endoperoxiden ein Diol.

Eine besondere Stellung unter den Dioxygenasen nehmen Lipoxygenasen ein, die in die Gruppe der Nicht-Häm-Eisen-haltigen Dioxygenasen eingeordnet werden.

Lipoxygenasen konnten auch in Bakterien (Porta & Rocha-Sosa, 2001) und Pilzen (Bisakowski et al., 1997, Su & Oliw, 1998) nachgewiesen werden. Sie katalysieren den Einbau von Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Systeme mit 1-*cis* und 4-*cis* Pentadienstrukturen zu *cis-trans*-konjugierten Dienen. Pflanzliche Lipoxygenasen setzen demnach bevorzugt Linol- und Linolensäure um, während Lipoxygenasen tierischer Herkunft Arachidonsäure bevorzugen (Belitz et al., 2008). Der Bildung der Hydroperoxide wird ein dreistufiger Mechanismus zugrunde gelegt, bei dem erst ein Wasserstoff-Teilchen aus der Methylengruppe abstrahiert und nach Umlagerung in ein konjugiertes Dien-System Sauerstoff in das System eingebracht wird. Nach enzymatischer Reduktion des Peroxyradikals lagert sich ein Proton an, so dass das Hydroperoxid entsteht (Abbildung 16) (Kühn et al., 1986).

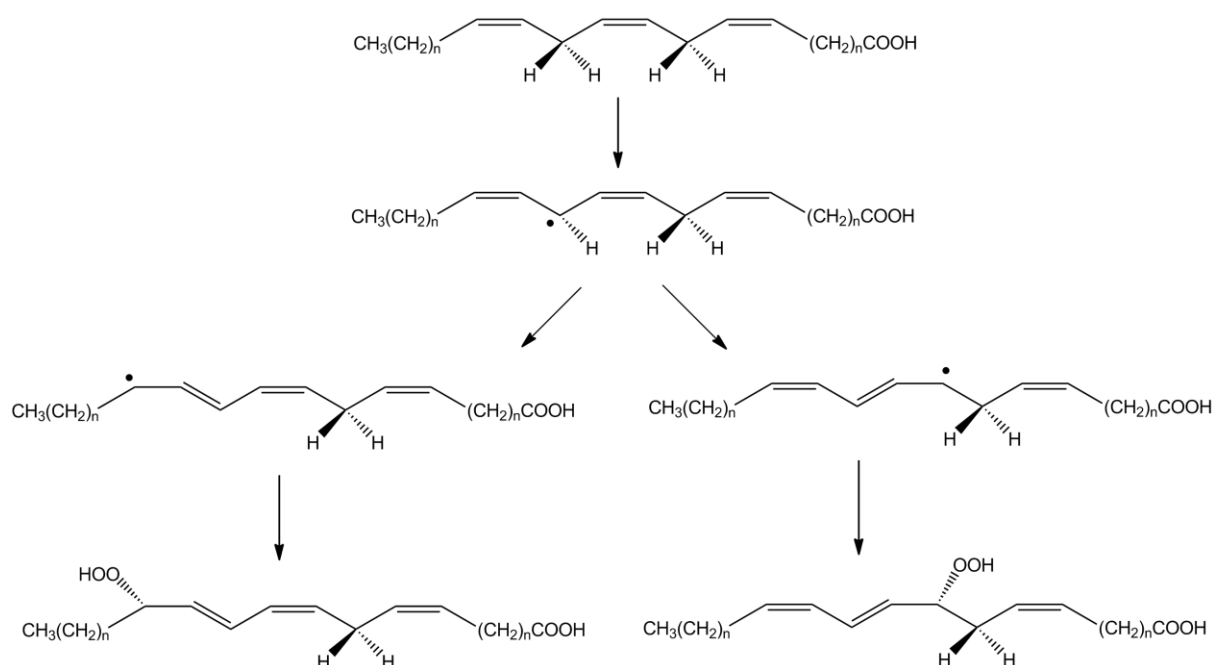


Abbildung 16 Mechanismus der Lipoxygenase-Reaktion (Pattabhiraman, 2003)

Je nach Spezifität können unterschiedliche Hydroperoxide gebildet werden. Linolsäure wird durch unspezifische Lipoxygenasen (z. B. LOX III aus der Sojabohne oder LOX I aus der Erbse) zu einem Gemisch aus 9- und 13-Hydroperoxiden umgesetzt. Unspezifische LOX werden unter anderem für die Entfärbung von Carotinoiden im Mehl eingesetzt (Mehlbleichung). Neben den unspezifischen sind jedoch auch hochspezifische LOX bekannt. Während die LOX I aus der Sojabohne Linolsäure zu 94% Hydroperoxide an Position 13 bildet, katalysiert eine Lipoxygenase aus der Tomate hauptsächlich (84%) die Bildung von 9-Hydroperoxiden (Belitz et al., 2008). Der Abbau der gebildeten Hydroperoxide kann

über unterschiedliche Enzyme katalysiert werden oder auch durch homolytischen Zerfall erfolgen. Bei Pflanzen und Pilzen sind hauptsächlich Hydroperoxidlyasen für den Abbau verantwortlich, aber auch Hydroperoxidisomerasen. Sowohl beim homolytischen Zerfall der Hydroperoxide als auch beim enzymatisch katalysierten Abbau entstehen Aldehyde, Ketone, Alkohole und Ester wie Hexanal, 3-Hexenal, Hexanol, 3,6-Nonadienal und 1-Octen-3-ol, die aromaaktiv sind und in vielen Fällen zu Fehlgerüchen bzw. zur Veränderung des Aromas von Lebensmitteln führen (Belitz et al., 2008). Ein bekanntes Abbauprodukt bei Leguminosen ist das Hexanal, welches z. B. Sojamilch ein grasiges Aroma verleiht und als Marker für die Fettsäureoxidation herangezogen wird (Schindler, 2011, Schindler et al., 2011).

Eine weitere besondere Rolle unter den Dioxygenasen nehmen die Cyclooxygenasen ein, die zu den Häm-Oxygenasen zählen und in Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 unterteilt werden. Cyclooxygenasen besitzen neben einer Oxygenaseaktivität eine Peroxidaseaktivität und katalysieren die Übertragung von Sauerstoff auf Arachidonsäure, um die Prostaglandinbildung zu gewährleisten (Schneider et al., 2007).

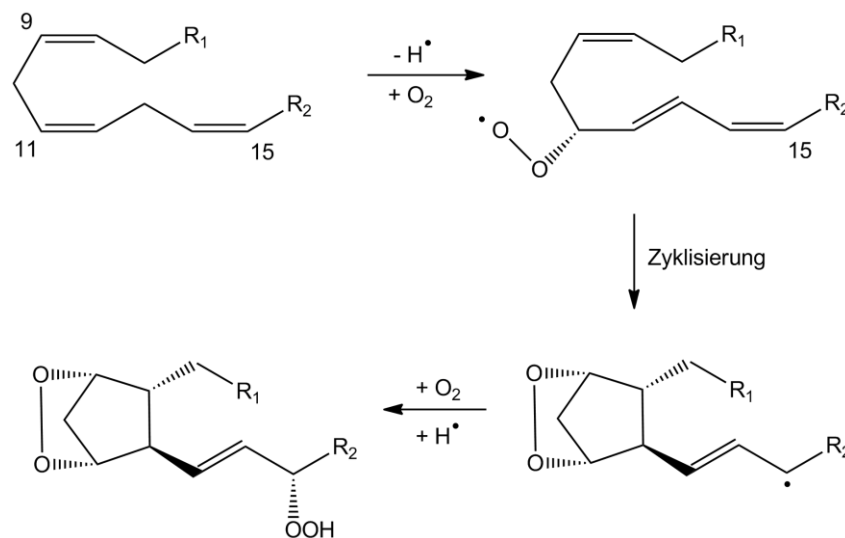


Abbildung 17 Mechanismus von Cyclooxygenasen (Schneider et al., 2007)

Nach Abstraktion eines Wasserstoff-Radikals und anschließender Oxygenierung wird ein Peroxyradikal generiert, welches zu einem Endoperoxid zyklisiert. In einem zweiten Oxygenierungsschritt wird ein Hydroperoxid gebildet (Abbildung 17). Prostaglandine sind Hormone, welche im Entzündungsprozess wichtige Funktionen wie z. B. die Fieberentwicklung und die Regulation von Schmerzprozessen übernehmen (Schneider et al., 2007).



### 1.3.2.2 Reaktionen katalysiert durch Dioxygenasen

#### Hydroperoxidbildung bei allylischen Systemen

Diese Reaktion wird vor allem von Lipoxygenasen katalysiert, die in 1.3.2.1 bereits erwähnt worden sind. Besonders mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure oder Linolensäure, die ein nichtkonjugiertes 1,4-Diensystem aufweisen, werden oxidiert (Abbildung 18). Bereits 1947 wurde eine Lipoxygenase aus der Sojabohne isoliert (Thorell et al., 1947), die besonders stabil ist und die Oxidation von Linolsäure katalysiert. Unter Einfluss des Enzyms wird zu 95% das Hydroperoxid am C13 gebildet. Die distale (von der Säurefunktion weiter entfernte) Seite der Fettsäure wird bei der Hydroperoxidbildung der proximalen Seite vorgezogen (Faber, 2011).

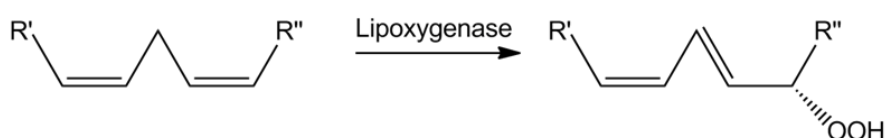


Abbildung 18 Oxidation von 1,4-Dienen durch eine Lipoxygenase (Schneider et al., 2007)

#### $\alpha$ -Hydroperoxidbildung bei Carbonsäuren

Die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Fettsäuren wird ebenso durch Dioxygenasen (umgangssprachlich:  $\alpha$ -Oxidasen) über die Bildung von Hydroperoxiden katalysiert. Als Intermediat wird eine  $\alpha$ -Hydroperoxysäure gebildet, die unterschiedlich weiter reagieren kann. Über Reduktion kann die entsprechende  $\alpha$ -Hydroxysäure entstehen, andererseits ist auch die Decarboxylierung zum Aldehyd vorstellbar (Faber, 2011).  $\alpha$ -Hydroxylierungen werden jedoch nur bei längerkettigen Fettsäuren durchgeführt, die einen lipophilen Charakter aufweisen. Verfügt das Substrat über funktionelle Gruppen, findet eine  $\alpha$ -Hydroxylierung nur statt, wenn sich die Substituenten mehr als drei Kohlenstoffatome von der Carboxylgruppe entfernt befinden. Die gebildeten  $\alpha$ -Hydroperoxysäuren sind zu fast 100% (*R*)-konfiguriert (Faber, 2011).

#### Dihydroxylierung aromatischer Verbindungen

Dioxygenasen spielen eine wichtige Rolle beim Abbau aromatischer Verbindungen. Dafür wird unter Einfluss der Dioxygenasen ein Endoperoxid gebildet, welches aufgrund seiner Instabilität zum *cis*-Diol reagiert (Abbildung 19). Über diesen Mechanismus werden zwei chirale Zentren in das Molekül eingebaut, welche unter Einfluss einer Dehydrogenase verschwinden, da der aromatische Zustand wieder

hergestellt wird. Über oxidative Ringspaltung wird das Molekül weiter abgebaut (Faber, 2011). In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Dihydroxylierung an olefinischen Doppelbindungen durch Mikroorganismen nicht durchgeführt wird, sondern nur an aromatischen Doppelbindungen (Boyd et al., 1993, Lakshman et al., 1998).

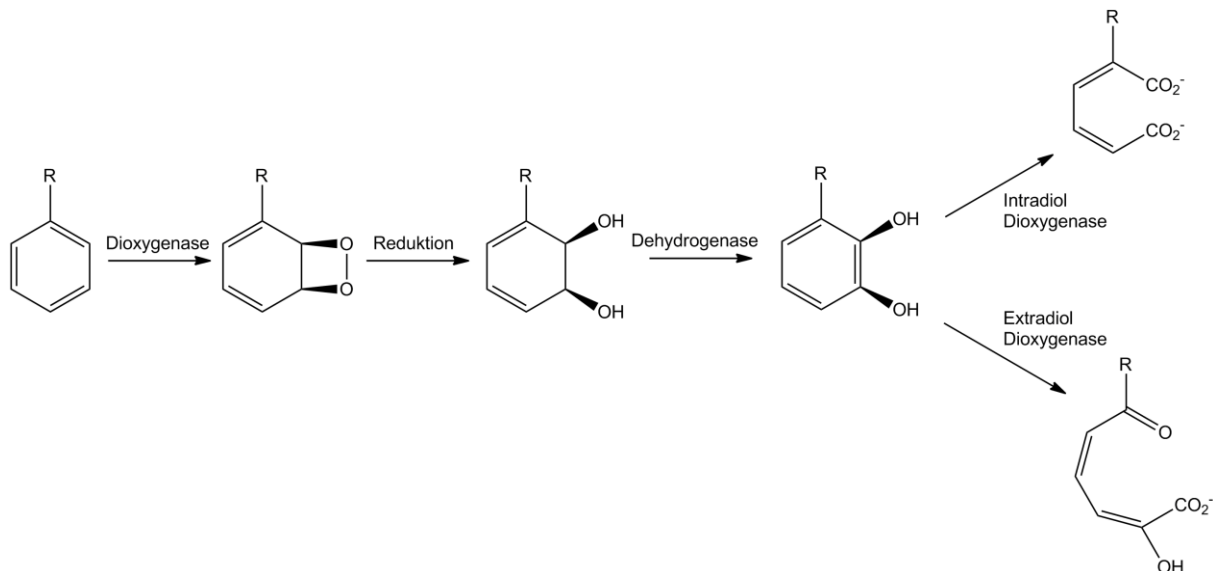


Abbildung 19 Dioxygenase katalysierte Dihydroxylierung (Faber, 2011, Westendorf, 2005)

Von besonderem Interesse sind die *cis*-Cyclohexandiole, wenn diese durch oxidative Spaltung und anschließende Cyclisierung in die cyclopentanoide Form überführt werden. Solche Verbindungen dienen als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Prostaglandinen und Terpenen (Hudlicky et al., 1988).

### 1.3.2.3 Bedeutung von Dioxygenasen bei Terpentransformationen

Neben der Bildung von Fehlparfums durch Lipoxygenasen beim oxidativen Fettsäureverderb spielen Dioxygenasen eine bedeutende Rolle bei der Umsetzung von Terpenen zu aromaaktiven Verbindungen. Bekanntes Beispiel ist hier die Spaltung von Carotinoiden. Eine Dioxygenase aus der Tomate (*Lycopersicon esculentum*, cv. M82) konnte mit der Spaltung von Zeaxanthin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -Carotin und Lycopin in Verbindung gebracht werden. Es entstanden flüchtige Spaltprodukte, von denen  $\beta$ -Ionon, Pseudoionon und Geranylaceton die Hauptprodukte waren. Als Minorbestandteile lagen  $\alpha$ -Ionon, der  $C_{14}$ -Dialdehyd und 3-Hydroxy- $\beta$ -ionon vor (Simkin et al., 2004). Weitere Dioxygenasen, die die Spaltung von Carotinoiden

katalysieren, wurden in Petunien (*Petunia hybrida*) (Simkin et al., 2004), in der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (Auldridge et al., 2006), in der Melone (*Cucumis melo* L.) (Ibdah et al., 2006), im Pfirsich (*Prunus persica* L. Batsch) (Brandi et al., 2011) oder in der Süßen Duftblüte (*Osmanthus fragrans* Lour. var. *aurantiacus*) (Baldermann et al., 2010) entdeckt. Dabei konnten zusätzlich  $\beta$ -Cyclocitral und Dihydroactinidiolid als Abbauprodukte identifiziert werden (Ibdah et al., 2006). Besonders begehrte Verbindungen im Zusammenhang mit dem Carotinoidabbau sind sowohl Ionone als auch  $\beta$ -Cyclocitral, die eine geringe Geruchsschwelle haben.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon weisen einen veilchenartigen bzw. an Rosen erinnernden Geruch auf und  $\beta$ -Cyclocitral ist durch eine intensive Citrusnote charakterisiert. Diese Umstände machen sie zu gefragten Aromastoffen in der Kosmetik-, Parfüm- und Waschmittelindustrie.

Dioxygenasen werden darüber hinaus zur Oxyfunktionalisierung des Sesquiterpens Valencen zu Nootkaton eingesetzt, was bereits in einer Patentanmeldung resultierte (Zorn et al., 2009). Aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* wurde eine Dioxygenase identifiziert, die die Bildung von intermediären Hydroperoxiden in allylischer Position katalysiert. Die Hydroperoxide reagieren nach anschließender Oxidation zum Nootkaton bzw. Reduktion zu den korrespondierenden Nootkatolen (Fraatz et al., 2009, Krügener et al., 2010). Es wird postuliert, dass das gleiche Enzym für die Oxyfunktionalisierung von Myrcen zu Perillen verantwortlich ist (Krügener et al., 2009). Auch in diesem Fall entsteht ein begehrter Aromastoff, indem ein Terpen oxyfunktionalisiert wird.

In weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass Dioxygenasen die Bildung aromaaktiver Substanzen nicht nur aus terpenoiden Vorläufersubstanzen katalysieren. Eine Dioxygenase aus *P. putida* wurde über gerichtete Evolution derart modifiziert, dass die Umsetzung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-2,3-dihydrofuran-3-on aus *p*-Xylen katalysiert wird. Bei dem Produkt handelt es sich um Erdbeerfuranon, welches das Aroma von Ananas, Erdbeer und Mango prägt (Newman et al., 2004).

Anhand der in diesem Abschnitt aufgeführten Anwendungsbeispiele für den Einsatz von Dioxygenasen wird noch einmal verdeutlicht, dass Dioxygenasen neben den Monooxygenasen in der Aromenchemie eine wichtige Rolle spielen und als ernstzunehmende Alternative zu chemosynthetischen Methoden betrachtet werden können.

### 1.3.3 Haloperoxidasen

Da Haloperoxidasen zwar für die vorliegende Arbeit keine Bedeutung haben, sie jedoch zu den oxygenierenden Enzymen gehören, soll das folgende Kapitel nur einen kurzen Einblick in den Mechanismus und die Anwendung dieser Enzyme geben.

Peroxidasen zählen wie Mono- und Dioxygenasen zu den oxidierenden Enzymen, bauen im Allgemeinen jedoch keinen Sauerstoff in Substrate ein. Sie sind sehr verbreitet und kommen in Pflanzen, Mikroorganismen und Tieren vor. Allen Peroxidasen ist gemein, dass Wasserstoffperoxid bzw. ein Derivat als Oxidans fungiert. Als prosthetische Gruppe sind bei Peroxidasen Häm-Gruppen, Selen, Vanadium, Mangan oder Flavin bekannt, wobei die größte Gruppe die Häm-Peroxidasen darstellen (Leak et al., 2009).

Der katalytische Mechanismus der Peroxidasen ist dem der P450 Monooxygenasen sehr ähnlich (Abbildung 20). Entscheidender Unterschied ist die Tatsache, dass der Mechanismus der Peroxidasen vollständig Cofaktor-unabhängig funktioniert, indem Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor fungiert (Faber, 2011).

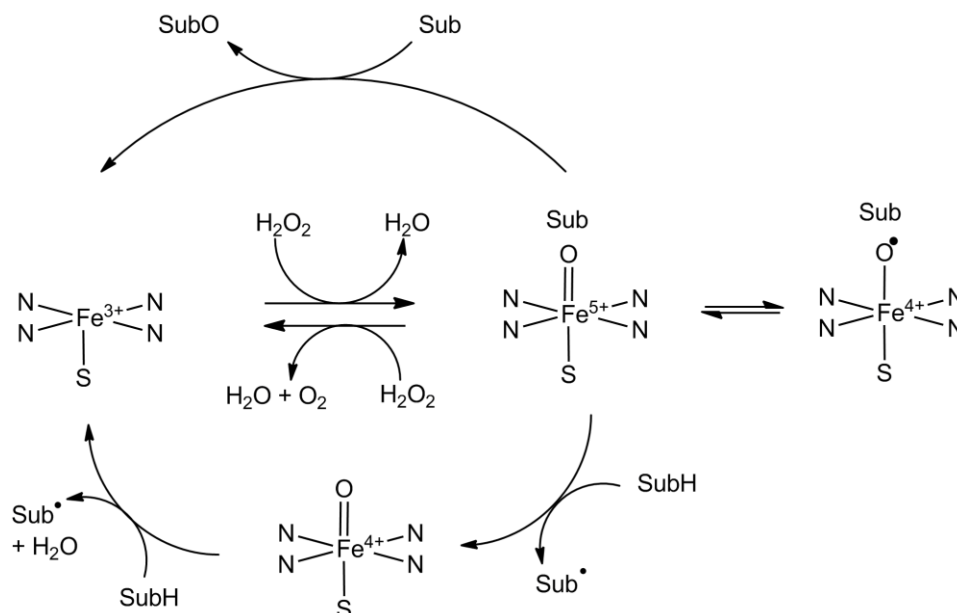


Abbildung 20 Katalytischer Zyklus von Häm-abhängigen Peroxidasen (Faber, 2011)

Eisen(III) ist das Zentralatom, an welches äquatorial das Häm und axial ein Schwefelatom aus einem Cysteinrest koordiniert. Auf Wasserstoffperoxid werden zwei Elektronen übertragen, ein Sauerstoffatom bindet an das Eisen, das dadurch als Fe(V)=O vorliegt, und ein Wassermolekül entsteht. Im Unterschied dazu ist bei

den Monooxygenasen ein Cofaktor (NAD(P)) für die Elektronenübertragung notwendig. Ausgehend vom Fe(V)=O wird in zwei Teilschritten jeweils ein Elektron von einem elektronenreichen Substrat abstrahiert, Wasser freigesetzt und die Ursprungsform des Enzyms regeneriert. Auf diesem Weg wird kein Sauerstoff in das Substrat eingebaut; es wird lediglich ein Wasserstoff-Radikal vom Substrat abstrahiert.

In einem zweiten Weg kann jedoch die Fe(V)=O-Verbindung mittels einer Zweielektronenübertragung direkt ein Sauerstoffatom auf ein Substrat übertragen (Faber, 2011). Diesen zweiten Weg, der dem Mechanismus der P450 Monooxygenasen ähnelt, wird vor allem von Haloperoxidasen durchgeführt, dessen prominentester Vertreter die Chloroperoxidase aus dem Organismus *Caldariomyces fumago* ist. In zahlreichen Versuchen, die mit der Chloroperoxidase durchgeführt worden sind, konnte festgestellt werden, dass neben der oxidativen Halogenierung zahlreiche weitere Reaktionen katalysiert werden. Während *in vivo* die oxidative Halogenierung stattfindet (Leak et al., 2009), konnten *in vitro* weitere Reaktionen wie Hydroxylierungen (Miller et al., 1995, Zaks & Dodds, 1995), olefinische Epoxidierungen (Allain et al., 1993, Dexter et al., 1995), Sulfoxidationen (Colonna et al., 1997, Colonna et al., 1992, van Deurzen et al., 1997) und Oxidationen primärer Alkohole zu Aldehyden (Hu & Dordick, 2002, Samra et al., 1999, van Deurzen et al., 1997) nachvollzogen werden. Eine Hydroxylierung von C-H-Bindungen wird durch die Chloroperoxidase begünstigt, wenn diese aktiviert sind wie z. B. durch  $\pi$ -Elektronen-Systeme. Allylische Hydroxylierungen werden im Gegensatz zu benzyllischen kaum katalysiert, was zu hohen Ausbeuten an sekundären aromatischen Alkoholen führt. Abhängig von der Länge der Alkylseitenkette werden dabei die (S)- bzw. (R)-konfigurierten Verbindungen gebildet. So wird bei einer Ethylkette die Bildung des (R)-konfigurierten und bei einer Propylkette die Bildung des (S)-konfigurierten sekundären Alkohols begünstigt (Faber, 2011). Die Chloroperoxidase katalysiert ähnlich der Monooxygenasen enantioselektiv die Epoxidierung von Doppelbindungen (Hager et al., 1998), genauso wie die Sulfoxidierung von Thioethern. Methylthioether werden von der Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* hochselektiv zum (R)-Sulfoxid umgesetzt (Faber, 2011). Im Gegensatz dazu favorisiert eine Haloperoxidase aus *Corallina officinalis* die Bildung von (S)-Sulfoxiden (Allenmark & Andersson, 1996, Andersson et al., 1997).

In der Literatur sind weitere Umsetzungen von terpenoiden Verbindungen mit Peroxidasen zu oxyfunktionalisierten Produkten bekannt. Eine Peroxidase aus dem Pilz *Pleurotus eryngii* setzt  $\beta,\beta$ -Carotin zu den flüchtigen und aromaaktiven Spaltprodukten  $\beta$ -Ionon,  $\beta$ -Cyclocitral, Dihydroactinidiolid und 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanon um (Zelena et al., 2009, Zorn et al., 2003). Der Abbau von  $\beta$ -Carotin und eine damit verbundene Entfärbung konnte weiter bei zwei Peroxidasen (MsP1 und MsP2) aus dem Pilz *Marasmius scorodoni* beobachtet werden (Scheibner et al., 2008, Zelena et al., 2009). Im Zuge dessen wurden neben  $\beta$ -Carotin auch Zeaxanthin, Lutein, Neoxanthin, Violaxanthin und Lycopin zu flüchtigen Norisoprenoiden umgesetzt (Zelena et al., 2009).

Terpenumsetzungen mit Haloperoxidasen sind im Gegensatz dazu bisher kaum beschrieben worden. Neben den bereits erwähnten Reaktionen katalysiert die Chloroperoxidase aus *Caldariomyces fumago* in Abwesenheit von Halogenid-Ionen des Weiteren die Umwandlung von Terpenalkoholen wie Geraniol, Citronellol und Nerol zu den entsprechenden Aldehyden Geranial, Citronellal und Neral, die ein intensives Aroma aufweisen. Terpenkohlenwasserstoffe werden unter diesen Bedingungen jedoch nicht umgesetzt und in Anwesenheit von Halogenid-Ionen wird die Bildung von Halohydrinen aus ungesättigten Terpenen begünstigt (Schrader & Kaup, 2007).

Enormer Vorteil der Peroxidase-katalysierten Reaktionen ist ihre Unabhängigkeit von Cofaktoren, die als kostenintensive Komponenten zugefügt oder aufwendig regeneriert werden müssten, wenn nicht im Ganzzellsystem gearbeitet wird. Im Gegensatz dazu stellt Wasserstoffperoxid eine Verbindung dar, die zwar sehr kostengünstig ist, aber in hohen Konzentrationen zu nichtenzymatischen Oxidationen führen oder auch enzyminhibierend wirken kann. Daher muss die Konzentration möglichst gering gehalten und genau nachdosiert werden, um eine hohe Effizienz der Reaktionen zu gewährleisten. Da ein hoher Bedarf an enantiomerenreinen Chemikalien besonders in der Arzneimittel- und Feinchemikalienindustrie besteht, bieten sich die hochselektiven Haloperoxidasen für den großtechnischen Einsatz besonders an.

## 1.4 Zielsetzung

Im Zuge der biokatalytischen Herstellung von Aromastoffen wie Nootkaton hat es sich erwiesen, diese aus Vorläufersubstanzen herzustellen statt sie aufwendig und teuer aus ätherischen Ölen zu isolieren. Durch eine Isolierung können statt reiner Aromastoffe meist nur Terpengemische gewonnen werden, die weiter aufgereinigt werden müssen. Die Herstellung von beispielsweise Nootkaton, einer nach Grapefruit riechenden Verbindung, erfolgt daher über die Oxyfunktionalisierung von Valencen. Dieser Ansatz wurde mit Enzymen aus den unterschiedlichsten Organismen verfolgt. So konnte beobachtet werden, dass der Ascomycet *Chaetomium globosum* in Submerskultur, aber auch das Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* Valencen zu (+)-Nootkaton umsetzten (Kaspera, 2004, Kaspera et al., 2005). Es ist naheliegend, dass Basidiomyceten als potenzielle Organismen für die Biokonversion von Terpenen in Frage kommen. Aufgrund ihres natürlichen Habitats auf Laub- und Nadelhölzern sind sie von Natur aus Terpenen exponiert und haben sich an diese Lebensweise adaptiert. Mit ihrem breiten Spektrum an intra- und extrazellulären Enzymen sind Basidiomyceten ausgezeichnet an ihre Umwelt angepasst. Besonders der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* hat sich als guter Kandidat für die Terpenbiokonversion erwiesen. Extrazelluläre Enzyme wie Laccasen, Peroxidasen und Lipasen, aber auch intrazelluläre Enzyme wie Monooxygenasen sind aus diesem Pilz bekannt (Bouws, 2008). Neben Valencen setzte *P. sapidus* auch  $\beta$ -Myrcen zu Perillen (Krügener et al., 2009) sowie *R*-(+)-Limonen zu Carvon und den korrespondierenden *cis/trans*-Carveolen um (Onken & Berger, 1999). Die Umsetzungen folgten dem gleichen radikalischen Mechanismus, der über intermediäre Hydroperoxide zu den oxyfunktionalisierten Terpenen in allylischer Position führt. Statt der vermuteten P450 Monooxygenase konnte eine Dioxygenase für die Oxyfunktionalisierung der Terpene nachgewiesen werden (Krügener et al., 2010). Das für die Oxidation von Valencen verantwortliche Enzym zeigte die größten Homologien zu einer Lipoxygenase eines Ascomyceten auf, jedoch keine zu einer P450 Monooxygenase (Fraatz et al., 2009).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Substrate aus der Klasse der Monoterpene zu transformieren, um die Substratspezifität der Dioxygenase aus *Pleurotus sapidus* weiter zu charakterisieren. Hierzu sollten die bereits am Institut etablierten Versuche unter identischen Bedingungen auf die neuen Substrate übertragen werden. Enzymatisch katalysierte Oxidationsreaktionen sollten der

Autoxidation gegenübergestellt werden. Weiterhin konnten die postulierten Hydroperoxide der Terpene bisher nicht eindeutig mit analytischen Methoden identifiziert werden, was im Zuge der vorliegenden Arbeit verifiziert werden sollte.



## 2 Autoxidation versus biotransformation of $\alpha$ -pinene to flavours with *Pleurotus sapidus* – regioselective hydroperoxidation of $\alpha$ -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol

---

Reproduced with permission from *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 9944-9950. Copyright 2009 American Chemical Society.

### 2.1 Abstract

The enzymatic conversion of  $\alpha$ -pinene to verbenols, verbenone, and minor volatile flavors was studied using submerged cultured cells, lyophilisate, and microsomal fractions of the edible basidiomycete *Pleurotus sapidus*. The similarity of the product range obtained by the bioconversions with the range of products found after autoxidation of  $\alpha$ -pinene at 100 °C suggested similar initial pinene radicals. Extracts of the bioconversions were analyzed using thin layer chromatography with hydroperoxide staining and cool on-column capillary gas chromatography-mass spectrometry. Two isomer  $\alpha$ -pinene hydroperoxides were identified as the key intermediates and their structures confirmed by comparison with synthesized reference samples and by micro-chemical reduction to (*Z*)- and (*E*)-verbenol. When the biocatalysts were supplemented with one of the verbenols, only the (*Z*)-isomer was oxidized, indicating the activity of a highly stereospecific monoterpene dehydrogenase. The structural comparison of subunits shows that fungal oxifunctionalization reactions of some common terpene substrates, such as (+)-limonene or (+)-valencene, might likewise be catalyzed by dioxygenases rather than by CYP450 enzymes, as previously assumed.

**Keywords:** *Pleurotus sapidus*, autoxidation,  $\alpha$ -pinene dioxygenase, hydroperoxides, stereoselective verbenol dehydrogenase

## 2.2 Introduction

Terpenoids (isoprenoids) encompass more than 40,000 structures and form the largest class of known plant metabolites. They are widely used as industrially important chemicals, including pharmaceuticals, flavors, fragrances, pesticides, and disinfectants and as large-volume feedstocks for chemical industries (Bohlmann J, 2008). Many terpene hydrocarbons are abundant in nature, for example, (+)-limonene and the pinenes. Due to their chemical instability and poor sensory impact, they are not qualified as flavorings, but represent an ideal starting material for biocatalytic oxyfunctionalization leading to natural terpenoid flavor and fragrance compounds (Schrader, 2007). The oxygenation of hydrocarbons with dioxygen occurs formally along four possible mechanisms of reductive activation of oxygen (Kuznetsova *et al.*, 2005):

- i) Liquid-phase oxidation reactions, particularly conversion of unsaturated hydrocarbons, are most often proceed by an autoxidation mechanism. The reaction is initiated by the abstraction of a hydrogen atom in allylic position to form free radicals from the substrate. Dioxygen (triplet oxygen) is activated through attachment to an alkyl radical with formation of a hydroperoxide radical.
- ii) In terms of photo-oxidation a double bond is directly attacked by light-excited dioxygen (singlet oxygen) to give the respective hydroperoxides.
- iii) If the system contains a coreducer that is more readily oxidizable by oxygen into a peroxide than the substrate, then the overall process will be a conjugate reaction (co-oxidation). The unsaturated hydrocarbon will react with the primarily generated peroxide by a homolytic or heterolytic mechanism.
- iv) Enzymatic oxidations are regarded as a special class of conjugated reactions. The high selectivity of substrate conversion is due to transition metal complexes, the ligands of which participate in electron transfer and control the stereochemistry of the process.

One of the earliest publications on microbial terpene oxyfunctionalization described the biotransformation of  $\alpha$ -pinene **1** by *Aspergillus niger*. The culture broth contained verbenone **4**, (*E*)-sobrerol **11**, hydroxycarvotanacetone, and (*Z*)-verbenol **3b** as main

products (Bhattacharyya *et al.*, 1960). Since that time, verbenone **4**, an impact compound of rosemary oil, and its precursor verbenol **3** have been frequently described as the main products of biotransformations of  $\alpha$ -pinene with bacteria, yeasts, and fungi (Bicas *et al.*, 2008, Schrader, 2007). The oxyfunctionalization reactions are usually attributed to cytochrome P450 monooxygenases. However, only a few microbial terpene transforming P450 proteins were purified. Among the few exceptions are P450cam from *Pseudomonas putida* and P450BM-3 from *Bacillus megaterium*, which converted (+)-valencene to a number of terpenoids of the nootkatone family (Sowden *et al.*, 2005). This paper describes the biotransformation of  $\alpha$ -pinene with *Pleurotus sapidus*. On the basis of the identification of novel intermediates and products, the reaction mechanism was elucidated, and two enzymes, a regiospecific  $\alpha$ -pinene dioxygenase and a stereoselective (*Z*)-verbenol dehydrogenase, were described for the first time to be responsible for the microbial formation of verbenone **4**.

## **2.3 Materials and Methods**

### **2.3.1 Fungi**

*Pleurotus sapidus* (DSM 8266), *Chaetomium globosum* (DSM 1962), *Stemphylium botryosum* (DSM 62928), *Pleurotus eryngii* (CBS 458.79), and *Penicillium solitum* (CBS 424.89) were obtained from the culture collections of DSMZ, Braunschweig, Germany and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn, The Netherlands. For maintenance on agar slants and submerged culture, the fungi were grown on glucose/asparagine/yeast extract medium as described elsewhere (Onken & Berger, 1999). The flasks were sealed with cellulose plugs and autoclaved for 20 min at 121 °C.

### **2.3.2 Fungal growth**

#### **2.3.2.1 Submerged cultivation (SB)**

The fungal cultures (1 cm<sup>2</sup> of a densely overgrown piece of agar) were inoculated into a 100 mL glucose/asparagine/yeast extract medium, homogenized using an Ultraturrax homogenizer (Jahnke & Kunkel, Staufen Germany), and grown aerobically at 24 °C and 150 rpm on an orbital shaker (Multitron, Infors, Bottingen,

Switzerland) in the dark. Experimental cultures (500 mL shake flasks, 250 mL medium volume) were inoculated with 25 mL 3-day-old pre-cultures grown on the same medium and homogenized prior to inoculation.

### **2.3.2.2 Mycelium-concentrates (MC), lyophilisates (Lyo), and microsomal fraction (MF)**

After 3 days of fungal growth the active biomass was harvested by centrifugation at 10000g and withdrawal of the supernatant. In terms of MC to approximately 50 g of fungal mycelium (wet weight) was added 50 mL of fresh liquid medium before addition of  $\alpha$ -pinene **1**. For mycelium lyophilisates the fungal biomass was transferred into a 400 mL beaker, shock frozen using liquid nitrogen, and lyophilized (Valco2, Zirbus Technology, 37539 Bad Grund, Germany) at room temperature,  $2 \times 10^{-5}$  Pa, and sterile conditions. The MF was obtained from harvested biomass after cell disruption using a ball mill. To a portion of 30 g of frozen fungal mycelium were added 80 mL of beads and 25 mL of 200 mM HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonic acid) buffer, pH 5.5, with 5% glycerol, and the mixture was cooled down to -16 °C. During the milling process the temperature did not exceed 4 °C. The suspension was separated from the beads by filtration (linen) and subsequently centrifuged for 90 min at 100000g. The microsomal pellet was redissolved in 15 mL of HEPES-buffer containing 0.5% OBAS and 2.0% sodium cholate (MF) and centrifuged again at 100000g.

### **2.3.3 Chemicals**

$\alpha$ -Pinene (96%, Fluka, Germany) and azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.12) were distilled before use. BHT (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene, 99%), myrtenol (>99%), myrtenal (>95%), (*E*)-pinocarveol (98%), (*E*)-sobrerol (95%), (*Z*)-verbenol (>95%), verbenone (>99%),  $\alpha$ -pinene epoxide (<97), and sodium cholate (purum) were from Fluka (Seelze, Germany), and OBAS (4-octylbenzyl amidosulfobetaine, purum) was provided from Calbiochem (San Diego, CA). All other chemicals used were of analytical grade.

### 2.3.4 Synthesis of (*E*)- and (*Z*)- $\alpha$ -pinene hydroperoxide

(*E*) and (*Z*)- $\alpha$ -pinene hydroperoxides were synthesized according to the method by Moore (Moore et al., 1956). In brief, 100 g of  $\alpha$ -pinene were heated in a stream of oxygen (purity 3.5) at 100 °C. The reaction yielded a mixture of products with  $\alpha$ -pinene epoxide, (*E*)-verbenol, verbenone, and the assumed (*E*)-verbenyl hydroperoxide as the main products in a ratio of 4:4:1:1; (*Z*)-verbenyl hydroperoxide (10% intensity of (*E*)-verbenyl hydroperoxide) was found as a minor product, only. After reduction of the mixture with Na<sub>2</sub>S in the presence of NaOH, the concentration of products remained constant except for verbenyl hydroperoxides, which completely disappeared for the benefit of (*E*)- and (*Z*)-verbenol.

### 2.3.5 (*E*)-Verbenyl hydroperoxide

GC-MS (RICW 20M = 2132); [m/z (% of base peak)] 168 [M<sup>+</sup> (<0.1)], 153 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub> (<0.1)], 150 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O (2.0)], 137 (9.0), 134 (10), 121 (12), 119 (35), 109(82), 94 (57), 91 (100), 81 (61), 55 (49), 43 (65), 41 (89).

### 2.3.6 (*Z*)-Verbenyl hydroperoxide

GC-MS (RICW 20M = 2103); [m/z (% of base peak)]; 168 [M<sup>+</sup> (<0.1)], 150 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O (<0.1)], 137 (10.0), 134 (11), 121 (7), 119 (42), 109(72), 94 (95), 91 (91), 79 (60), 67 (53), 59 (74), 43 (62), 41 (100).

### 2.3.7 Synthesis of (*E*)-verbenol

The reaction mixture of  $\alpha$ -pinene hydroperoxides after reduction with Na<sub>2</sub>S was fractionated using silica gel (silica gel 60; 0.063-0.100 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and pentane/diethyl ether (80:20, v/v) as the eluent yielding (*E*)-verbenol of >95% purity (GC). GC-MS (RICW 20M = 1681); [m/z (% of base peak)]; 152 [M<sup>+</sup> (1.0)], 137 [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub> (10.8)], 134 [M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O (11.5)], 123 (8.9); 121 (13.4), 119 (38.2), 117 (8.2), 110 (9.8), 109 (88.4), 107 (20.4), 105 (15.3), 95 (39.2), 94 (60.3), 93 (20.6), 92 (33.8), 91 (100), 81 (58.0), 79 (40.4), 69 (40.0), 67 (45.2), 55 (47.6), 43 (54.3), 41 (77.8).

The transorientation of the hydroxyl group was confirmed by NMR (nuclear Overhauser effect, NOE) spectrometry (Bruker Advance DRX-500, 1H-NOE-

difference spectrum, 500 MHz, C6D6). A NOE-signal of the proton at C4 and the methyl protons at C9 was observed with (*Z*)-verbenol only.

### 2.3.8 $\alpha$ -Pinene bioconversion

Conversion experiments were started by adding 1 mmol  $\alpha$ -pinene **1** to 100 mL (SB), 50 mL (MC) medium after 3 days of fungal growth, to 15 mL 0.1 M MOPS-buffer pH 7.0 (Lyo), or 0.2 mmol HEPES-buffer pH 5.5 (MF), respectively. Different incubation times at 24 °C and 150 rpm on an orbital shaker (Multitron, Infors, Bottingen, Switzerland) in the dark are referred to in the text. For each  $\alpha$ -pinene biotransformation a blank was performed using exactly the same conditions and the respective heat-inactivated biocatalyst.

### 2.3.9 Product isolation and identification

Conversion products of  $\alpha$ -pinene **1** were extracted three times with 20 mL azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.2, v/v). The combined and dried ( $\text{Na}_2\text{SO}_{4\text{sicc.}}$ ) organic phases were concentrated to approximately 1 mL and injected into a cool on-column after addition of 60  $\mu\text{g}$  of the external standard BHT.

One microliter of each concentrated sample was injected into a CE Instruments Trace GC 2000 equipped with a cool on-column injector, a Zebron ZB-WAX (Phenomenex, USA) fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness), hydrogen as the carrier gas (40  $\text{cm s}^{-1}$ ), and a FID (230 °C) using a temperature program from 40 °C (3 min) to 230 °C at a rate of 3 °C  $\text{min}^{-1}$  to 250 °C hold for 5 min. Quantification was performed according to the standard BHT.

GC-MS analysis was carried out using the same chromatographic conditions as for GC-FID analysis and helium as the carrier gas (38  $\text{cm s}^{-1}$ ). Identification of transformation products was achieved by comparison of EI mass spectra with data from reference compounds or the literature (Wiley 08 / NIST 08, 2008; spectral libraries) using a Fisons GC 8000 gas chromatograph and a Fisons MD 800 mass selective detector (interface, 230 °C; ion source, 200 °C; quadrupole, 100 °C; EI ionization, (70 eV); scan range, m/z 33-300 amu).

Thin layer chromatography was carried out on aluminium sheets covered with silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) and azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.12) as the mobile phase. The TLC plates were dried and subsequently stained with either anisaldehyde or the hydroperoxide specific Huber reagent (3.0 g of  $\alpha$ -naphthol, 150 mL of methanol, 1350 mL of H<sub>2</sub>O, 0.5 g of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 20 mL of acetic acid, 0.5 g of FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 2.2 g of 2-[(4-amino-3-methylphenyl)ethylamino]ethyl sulfate) (Huber & Fröhlke, 1972).

## 2.4 Results and Discussion

### 2.4.1 Biotransformation

Some ascomycetes and basidiomycetes have been found to tolerate mmolar concentrations of the cytotoxic bicyclic monoterpene  $\alpha$ -pinene **1**. Five strains - known for their potential to convert terpenes (Brauer, 2004, Kaspera *et al.*, 2005, Krings *et al.*, 2005) - were submerged cultured and supplied with 1 mmol  $\alpha$ -pinene **1** to produce natural verbenone **4**. Some 20 mg of (*E*)-verbenol **3a** and up to 4 mg of verbenone **4** were found in the culture liquid after 48 h (Tabelle 1).

Tabelle 1 Fungal Biotransformation of  $\alpha$ -Pinene to (*E*)-Verbenol and Verbenone

Fungus / Incubation time	( <i>E</i> )-verbenol [mg L <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	verbenone [mg L <sup>-1</sup> ] <sup>a</sup>	Ratio ( <i>E</i> )-verbenol / verbenone
<i>P. eryngii</i> (SB) <sup>b</sup> / 48 h	< 0.5	15.0	< 1
<i>S. botryosum</i> (SB) / 48 h	10.0	1.9	5.3
<i>P. solitum</i> (SB) / 48 h	10.2	1.5	6.8
<i>C. globosum</i> (SB) / 48 h	13.0	4.0	3.3
<i>P. sapidus</i> (SB) / 48 h	19.9	3.1	6.0
<i>P. sapidus</i> (MC) <sup>b</sup> / 20 h	39.3	9.8	4.0
<i>P. sapidus</i> (Lyo) <sup>b</sup> / 20 h	155.6	61.9	2.5
<i>P. sapidus</i> (MF) <sup>b</sup> / 20 h	152.2	149.3	1.0
blank (Lyo) <sup>c</sup> / 20 h	9.8	1.8	6.1

<sup>a</sup> Mean of at least three independent measurements, CV not exceeding 10%. <sup>b</sup> SB, submerged culture; MC, mycelium concentrate; Lyo, lyophilisate; MF, microsomal fraction. <sup>c</sup> Similar concentrations found with SB and MF

However, control experiments with inactivated biocatalysts under the same conditions resulted in the same product spectrum (Tabelle 1, Tabelle 2) as with the active biocatalysts. This raised the question as to what extent  $\alpha$ -pinene **1** transformation observed was the result of an enzymatic reaction. The difference in product yields of (*E*)-verbenol **3a** and verbenone **4** from the control was largest with *P. sapidus* and doubled approximately the yields obtained with the chemical blank (Tabelle 1). Therefore, further experiments were carried out using *P. sapidus*. Interestingly, *P. eryngii* produced verbenone **4** as the main biotransformation product and did not accumulate any detectable amounts of (*E*)-verbenol **3a**, the main product of  $\alpha$ -pinene autoxidation (blank) and biotransformation with the other fungi.

**Tabelle 2** Volatile Product Spectrum of  $\alpha$ -Pinene Biotransformation (Lyophilisate of *P. sapidus*) and Autoxidation (inactivated lyophilisate); 20 h Incubation Time

Product	Identification <sup>a</sup>	RI (CW 20 M)
$\alpha$ -pinene epoxide <b>10</b>	MS, Ref.	1608
Myrtenal <sup>b</sup> <b>7</b>	MS, Ref.	1612
( <i>E</i> )-pinocarveol <sup>b</sup> <b>9</b>	MS, Ref.	1652
( <i>Z</i> )-verbenol <sup>b</sup> <b>3b</b>	MS, Ref.	1658
( <i>E</i> )-verbenol <b>3a</b>	MS, Syn., NMR	1681
verbenone <b>4</b>	MS, Ref.	1703
Myrtenol <sup>b</sup> <b>6</b>	MS, Ref.	1792
( <i>E</i> )-carveol <sup>b</sup>	MS, Ref.	1841
$\alpha$ -( <i>Z</i> )-verbenyl hydroperoxide <b>2b</b>	MS, Syn.	2103
$\alpha$ -( <i>E</i> )-verbenyl hydroperoxide <b>2a</b>	MS, Syn.	2132
( <i>E</i> )-sobrerol <sup>b</sup> <b>11</b>	MS, Ref.	2225

<sup>a</sup> MS, reference mass spectrum; LRI, retention index (polar GC-column, Carbowax 20M) according to Van den Dool and Kratz method (van den Dool & Dec. Kratz, 1963); ref., reference compound co-analyzed; Syn, reference compound synthesized; NMR, stereochemistry confirmed by NMR data. <sup>b</sup> No significant differences found in blanks and biotransformations, conc. <1.5 mg L<sup>-1</sup>

In concurrent transformation studies it was found that mycelium concentrates and lyophilisates were superior to submerged cultured fungi in terms of terpene oxidation (Krügener et al., 2010, Krügener et al., 2009, Mueller et al., 2005). Consequently, mycelium concentrates and lyophilized mycelium of *P. sapidus* responded to the



presence of  $\alpha$ -pinene **1** with a significant increase of the concentration of (*E*)-verbenol **3a**, verbenone **4**, and, to a minor extent, of pinene epoxide **10**. Other volatile products stayed at the low concentrations observed with the respective blanks (autoxidation). This confirmed that, besides the unavoidable autoxidation, a regioselective enzymatic oxidation of  $\alpha$ -pinene **1** took place. This is supported further by the relative decrease of the (*E*)-verbenol **3a** to verbenone **4** ratio from 6.1 (autoxidation) to 2.5 (lyophilisate) and 1.0 (microsomal fraction) (Tabelle 1).

The increased generation of  $\alpha$ -pinene epoxide **10**, (*E*)-verbenol **3a**, and verbenone **4** might be interpreted as a cytochrome P450 monooxygenase catalyzed oxidation of  $\alpha$ -pinene **1** (Abbildung 21). In eucaryotic organisms the P450 activities are associated with membranes, whereas in bacteria they are found soluble (Jakoby & Ziegler, 1990, Williams et al., 2000).

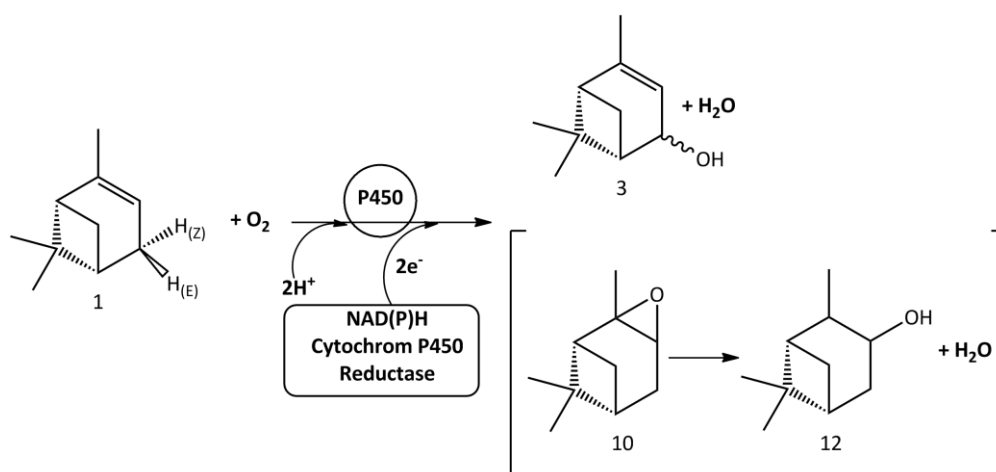


Abbildung 21 Hydroxylation of  $\alpha$ -pinene **1** with the two-component system P450 monooxygenase / reductase (adapted from (Lutz-Wahl, 1999))

To separate the assumed P450-monooxygenase(s) from the fungal mycelium the lyophilisate was resuspended in buffer and solubilized using a combination of two detergents, OBAS and sodium cholate, which was found best to maintain a maximum of  $\alpha$ -pinene oxidizing activity (data not shown). The cell debris was removed by filtration, and the filtrate was centrifuged at 100000g, but neither the resulting microsomal pellet nor the supernatant showed roughly the same high activity as the resuspended lyophilisate. However, re-combination of the supernatant and the microsomal pellet (microsomal fraction, MF) restored the activity completely (data not

shown). Using this MF almost the same peak concentration of (*E*)-verbenol **3a** and a significant increase of the verbenone **4** concentration was achieved. A very weak Soret band, which should have indicated the presence of the haem group of a P450-enzyme in the CO-difference spectrum of the MF (data not shown) and the missing of the corresponding alcohol, 3-pinanol **12**, render P450 monooxygenase catalysis unlikely; instead, a lipoxygenase-like absorption band with  $\lambda_{\text{max}} = 418 \text{ nm}$  was observed. However, a minor contribution of a P450 activity to  $\alpha$ -pinene oxidation cannot be ruled out. The enzyme catalyzed oxidation of  $\alpha$ -pinene **1** seemed to proceed along a similar mechanism as autoxidation, but with a clear regioselective preference toward the allylic oxidation at C4 of  $\alpha$ -pinene **1**.

#### 2.4.2 Autoxidation

To distinguish between autoxidation and a dioxygenase activity a detailed look on the steps of  $\alpha$ -pinene **1** autoxidation is needed. The reaction kinetics follow a radical chain reaction and result in numerous products (Tabelle 1, Tabelle 2). Among other minor products the main products found in several studies were (*E*)-verbenol **3a** and verbenone **4** (Ancel et al., 2004, Lajunen & Koskinen, 1994, Moore et al., 1956). At ambient temperatures and atmospheric conditions, the autoxidation of pine and fir tree resins, with  $\alpha$ -pinene **1** being the major constituent, produces significant amounts of (*E*)-verbenol **3a**, an aggregation pheromone for many species of bark beetles (Hunt et al., 1989). Peroxides might work as initiators of the radical chain reactions in the liquid-phase olefin autoxidations. The rapid decomposition of alkylhydroperoxides in hydrocarbon solution at elevated temperature and/or in the presence of trace amounts of transition metal ions is a well known reaction. It is worth to noting that (*Z*)-verbenol **3b** was not found or found in traces only among the degradation products. Depending on time, temperature and oxygen flow rate the molar ratio of (*E*)-verbenol **3a** to verbenone **4** decreases with increasing values of these three parameters. At ambient temperature, however, a huge excess of (*E*)-verbenol **3a** over verbenone **4** was found (Lajunen, 2001, Moore et al., 1956). The initiation step of  $\alpha$ -pinene **1** autoxidation is the abstraction of a hydrogen atom. The activation energy of this reaction is estimated from Arrhenius plot to be  $81.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Ancel et al., 2004). The propagation of the chain reaction is characterized by oxygen

consumption and the generation of further radicals. The first detectable stable products are the corresponding hydroperoxides, which are prone to cleavage, especially at elevated temperature or in presence of metal ions.  $\alpha$ -Pinene **1** contains three allylic positions (a tertiary at C1, a secondary at C4, and a primary at C10) which are prone to an attack by triplet oxygen or radicals already present. At first sight one of the most likely positions for the formation of a radical is the tertiary carbon atom at C1 (radical A, Abbildung 22), but this carbon atom is not favored because a resonance of the unshared electron along the double bond is not feasible.

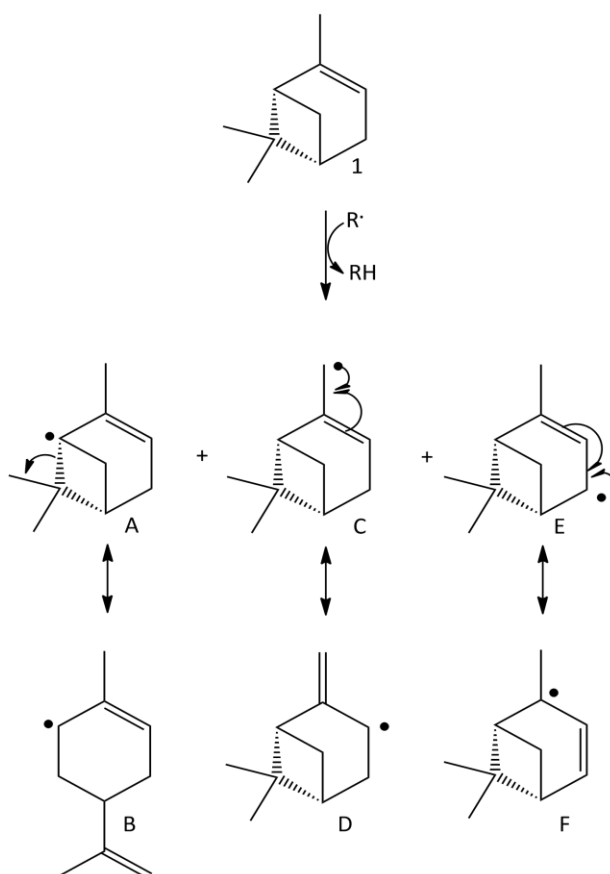


Abbildung 22 Initial radicals of  $\alpha$ -pinene autoxidation

In the rigid structure of  $\alpha$ -pinene **1** the four-membered ring is puckered, and five carbons of the six-membered ring (including olefinic carbons) are approximately in-plane. This configuration does not allow the C1 to change from  $sp^3$  to  $sp^2$  hybridization without C-C-bond cleavage. Reaction products (hydroperoxide or alcohol) of the tertiary radical were not detected; however, the respective hydroperoxide can decompose under ring scission to give radical B (Abbildung 22)

and subsequently the monocyclic (*E*)-carveol (Moore et al., 1956), which was found as a minor product in the controls and transformations of  $\alpha$ -pinene **1** with *P. sapidus* (Tabelle 1, Abbildung 23).

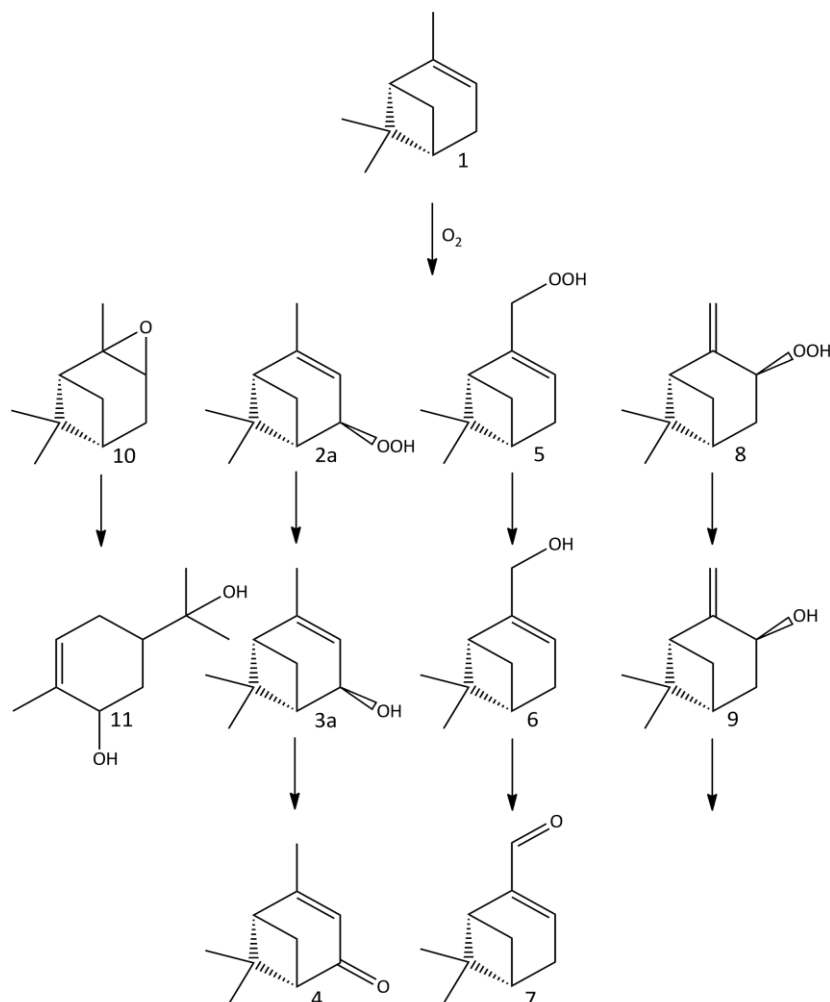


Abbildung 23 Reaction scheme and products of  $\alpha$ -pinene autoxidation

The primary radical (radical C, Abbildung 22) at C10 can be stabilized along the double bond to give the secondary resonance radical (radical D, Abbildung 22) at C3. Products of both radicals were found. Myrtenol **6** and myrtenal **7** are reaction products of the primary myrtenyl hydroperoxide **5**, whereas (*E*)-pinocarveol **9** is the decomposition product of hydroperoxide **8** (Abbildung 23). The dominating products in the blank and the biotransformation assays were (*E*)-verbenol **3a** and verbenone **4**, which correspond to the secondary radical at C4 (radical E, Abbildung 22). This unshared electron can rearrange to result in the most stable tertiary resonance

radical at C2 (radical F, Abbildung 22). However, the expected tertiary alcohol was not detected. The putative hydroperoxide at C2 might undergo a Schenk rearrangement to give verbenyl hydroperoxide **2** (Schenck, 1958) which would result in verbenol **3** and verbenone **4**. This explains satisfactorily the main autoxidation products of  $\alpha$ -pinene at ambient temperature, but does not explain that exclusive generation of (*E*)-verbenol **3a**. However, the failure to detect (*Z*)-verbenol **3b** does not necessarily indicate that only (*E*)-verbenol hydroperoxide **2a** was formed during the autoxidation of  $\alpha$ -pinene **1**. As  $\alpha$ -pinene **1** is a rigid structure with two secondary allylic hydrogens, pro *E* and pro *Z* (Abbildung 21) being at about 45° angle to this plane, it is unlikely that the steric hindrance caused by one of the methyl groups of the out-of-plane carbon atom (C7) of the four membered ring of  $\alpha$ -pinene **1** would entirely exclude the formation of (*Z*)-isomers. (*Z*)-verbenol **3b** is known to be less stable to heat and acid than the (*E*)-form (Moore et al., 1956). Autoxidation of other terpenes such as valencene showed a similar preference for one isomer, in this case 88%  $\alpha$ - compared to 12% of  $\beta$ -nootkatol (Davies & Davison, 1989). The approach of  $^3\text{O}_2$  at the  $\beta$ -face of the intermediate allylic  $\alpha$ -pinene radical is less hindered (Ponce et al., 2000). One of the two methyl groups of the quaternary carbon atom is directed toward the ring plane, thus causing a steric hindrance for the approaching  $^3\text{O}_2$ . Furthermore, a Schenk rearrangement is a nondissociative mechanism (sigmatropic [2,3]-rearrangement, (Ponce et al., 2000)), therefore maintaining the (*E*)-configuration of the first generated hydroperoxide. Verbenone **4** becomes more dominating at elevated temperature or at higher hydroperoxide concentrations at advanced autoxidation (Encinar et al., 1994). Interestingly, in the presence of molecular oxygen and catalytic amounts of  $\text{Co}^{2+}$  complexes at 80 °C the oxidation of verbenol **3** to verbenone **4** was successful in the case of (*E*)-verbenol **3a**, only, whereas (*Z*)-verbenol **3b** was assumed to further react to some rearrangement products. Therefore, (*Z*)-verbenol **3b** is not a direct precursor of verbenone **4** in the autoxidation of  $\alpha$ -pinene **1** (Lajunen, 2001).

The origin of  $\alpha$ -pinene epoxide **10**, detected in the control and biotransformation, during the radical chain reaction in the liquid phase is not yet clear. Ancel et al. (Ancel et al., 2004) described the formation of verbenol **3** (stereochemistry not given)

and  $\alpha$ -pinene epoxide **10** when  $\alpha$ -pinene hydroperoxides **2** were added to  $\alpha$ -pinene **1** in high concentration and/or at elevated temperature. These conditions of  $\alpha$ -pinene epoxide **10** generation might have occurred during the biotransformation of  $\alpha$ -pinene **1**, or during the subsequent product separation and concentration, and definitely existed in GC analysis of the products. It was reported that verbenyl hydroperoxide **2** was unstable during GC analysis, and only the product of its decomposition was observed. In the presence of residual  $\alpha$ -pinene **1** the decomposition products of verbenyl hydroperoxides **2** in the GC-system were verbenol **3** and  $\alpha$ -pinene epoxide **10** (Ancel *et al.*, 2004, Kuznetsova *et al.*, 2005). Detection of sorbreol **11**, a known product of the hydrolysis of  $\alpha$ -pinene epoxide **10** (Moore *et al.*, 1956), gave additional evidence that at least in part  $\alpha$ -pinene epoxide **10** was already generated during the autoxidation of  $\alpha$ -pinene **1** (Abbildung 23).

### 2.4.3 Enzyme catalyzed formation of (*E*)-verbenol and verbenone

Though the qualitative product spectrum of  $\alpha$ -pinene **1** biotransformation was almost identical to chemical blanks (inactivated lyophilisate, Tabelle 2) the selective increase of (*E*)-verbenol **3a** (15 fold) and verbenone **4** (30-100 fold) using lyophilisate or microsomal fraction of *P. sapidus* mycelium proved the action of oxidoreductases. In a study using the same basidiomycete and (+)-valencene as a substrate a dioxygenase was identified that catalyzed a similar transformation, the allylic oxidation to nootkatol and nootkatone via the respective hydroperoxides (Krügener *et al.*, 2010). The thermally instable hydroperoxides were not amenable to GC analysis but were separated and detected via TLC using a hydroperoxide selective staining (Krügener *et al.*, 2010). The same procedure was successfully carried out with the solvent extract of  $\alpha$ -pinene **1** biotransformation and autoxidation (data not shown). Cool on-column GC analysis of the hydroperoxide spots resulted in the known products of  $\alpha$ -pinene **1** autoxidation, with  $\alpha$ -pinene-epoxide **10** and (*E*)-verbenol **3a** as the main products, and verbenone **4** as a minor compound. (*Z*)-verbenol **3b** was found in traces, only. Additionally, two major unknown compounds eluted (RI 2103 and 2132). Both showed a considerable fronting and mass spectra similar to one another and to verbenol **3** and verbenone **4**. These two compounds were assumed to be (*Z*)- **2a** and (*E*)- **2b** verbenyl hydroperoxide. The fronting of the peaks indicated

the thermal decomposition during GC analysis (and not during cool on-column injection) with increasing elution temperature. According to the method of Moore (Moore et al., 1956) a reductive treatment of the hydroperoxides with an alkaline solution of Na<sub>2</sub>S should yield the corresponding alcohols. Reanalysis showed that the two peaks at RI = 2103 and 2132 disappeared in favor of (*E*)-**3a** and (*Z*)-verbenol **3b** newly formed. The peak area of (*E*)-verbenol **3a** was increased to the extent of the peak area of the larger peak disappeared. The same was found for the minor hydroperoxide and (*Z*)-verbenol **3b**. From these results we concluded that the compounds eluting at RI 2103 and RI 2132 were (*Z*)-verbenol hydroperoxide **2b** and at (*R*)-verbenol hydroperoxide **2a**, respectively, which decomposed partially during GC analysis.

Both hydroperoxides were found in the biotransformation assays with *P. sapidus* lyophilisate and MF as well. In contrast to the clear preference for (*E*)-verbenyl hydroperoxide **2a** by autoxidation, the putative  $\alpha$ -pinene dioxygenase generated both verbenyl hydroperoxides, **2a** and **b**. During autoxidation of  $\alpha$ -pinene **1** it was shown that added (*Z*)-verbenol **3b** was not oxidized to verbenone **4**, not even at elevated temperature and Co<sup>2+</sup> catalysis (Lajunen, 2001). Both precursor alcohols were added separately to the active biocatalyst to examine the enzymatic conversion to verbenone **4** by an assumed dehydrogenase. With (*E*)-verbenol **3a** no conversion to verbenone **4** or other conversion products was observed. The blank of (*Z*)-verbenol **3b** showed a slow isomerisation to the thermally more stable (*E*)-isomer.

Tabelle 3 Biotransformation of (*Z*)-Verbenol to Verbenone

Fungus / Incubation time	( <i>Z</i> )-verbenol <b>3b</b> [%] <sup>a</sup>	( <i>E</i> )-verbenol <b>3a</b> [%] <sup>a</sup>	verbenone <b>4</b> [%] <sup>a</sup>
<i>P. eryngii</i> (SB) <sup>b</sup> / 48 h	48	5	47
<i>P. eryngii</i> (MC) <sup>b</sup> / 48 h	<0.5	<0.5	98
<i>P. sapidus</i> (Lyo) <sup>b</sup> / 48 h	< 0.5	1.5	98
<i>P. sapidus</i> (MF) <sup>b</sup> / 20 h	<0.5	2.5	97
blank (Lyo) / 48h	93	7	<0.2

<sup>a</sup> Molar percentage of (*Z*)-verbenol (5.3 mM) fed. <sup>b</sup> SB, submerged culture; MC, mycelium concentrate; Lyo, lyophilisate; MF, microsomal fraction

Depending on the biocatalysts used (*P. eryngii* or *P. sapidus*) (*Z*)-verbenol **3b** was reacted to verbenone **4** in a molar yield of 47% (SB) to 98% (Lyo, MC, and MF) (Tabelle 3). In contrast to autoxidation the fungal formation of verbenone **4** followed the reaction sequence as shown in Abbildung 24: Catalyzed by an  $\alpha$ -pinene dioxygenase and in the presence of molecular oxygen,  $\alpha$ -pinene **1** was oxidized regio-selectively to (*Z*)- and (*E*)-verbenyl hydroperoxide **2a** and **b**.

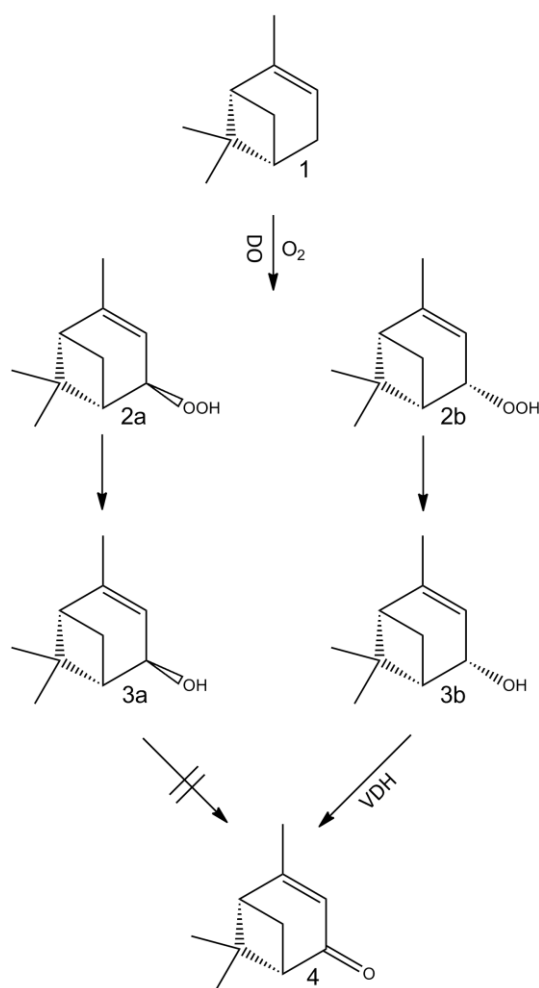


Abbildung 24 Reaction scheme of enzymatic generation of verbenone with *P. sapidus*. DO, dioxygenase; VDH, (*Z*)-verbenol dehydrogenase

The stereoselectivity of the oxygenation could not be determined because of the instability of the hydroperoxides. Homolytic scission of the labile peroxy-bond led to both corresponding alcohols. (*Z*)-Verbenol **3b** was then oxygenated by a diastereoselective (*Z*)-verbenol dehydrogenase to verbenone **4**, whereas (*E*)-verbenol **3a** accumulated. The ratio of 1:1 of (*E*)-verbenol **3a** to verbenone **4** upon



biotransformation with MF suggested that the  $\alpha$ -pinene dioxygenase produced a diastereomeric mixture of verbenyl hydroperoxides **2a** and **b**. The same regioselectivity as with the  $\alpha$ -pinene dioxygenase was observed in biotransformations of other terpenes: i (+)-valencene **15** to nootkatol **16** (Krügener *et al.*, 2010) and ii (+)-limonene **13** to isopiperitenol **14** (Kaspera *et al.*, 2005).

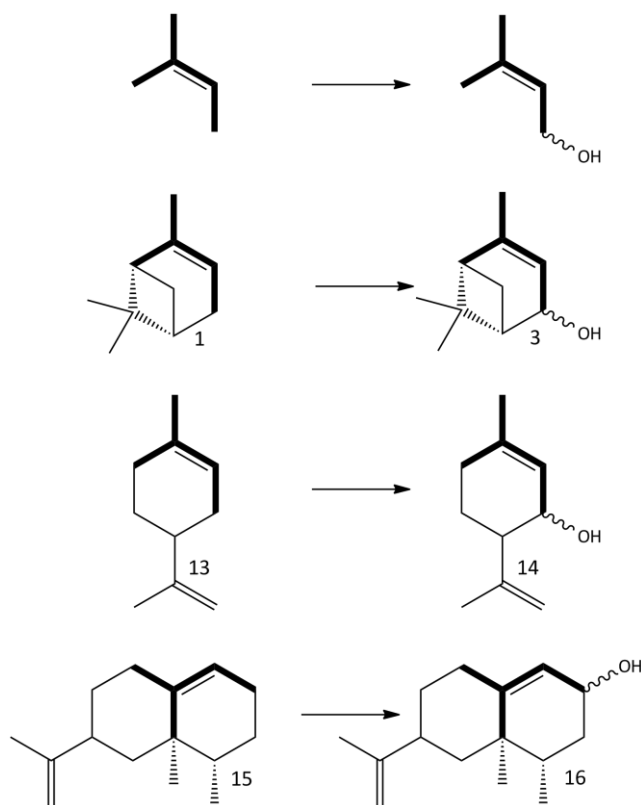


Abbildung 25 Substrate specificity of the putative  $\alpha$ -pinene dioxygenase of *P. sapidus*

The enzyme presumably requires a structural unit with an olefinic tertiary ring carbon atom, which is reacted in allylic position with  $^3\text{O}_2$  (Abbildung 25). Further biotransformations using the dioxygenase of *P. sapidus* will be carried out using structure-related compounds to characterize the substrate specificity of the enzyme in more detail.

## 2.5 Acknowledgements

Support of the work by the “Deutsche Bundesstiftung Umwelt” (AZ 13187-32) is gratefully acknowledged.

## Überleitung I

Die Umsetzung von *Pleurotus sapidus* mit  $\alpha$ -Pinen ergab ein ähnliches Produktspektrum wie die autoxidativen Vorgänge. Es konnte im Vergleich eine deutliche Steigerung der Konzentration der Substanzen Verbenon und der Verbenole erzielt werden, die als geruchsaktive Verbindungen Anwendung in der Aromaindustrie finden können. Anhand der enzymatisch katalysierten Oxidation des Monoterpens  $\alpha$ -Pinen konnte untermauert werden, dass die Dioxygenase aus *Pleurotus sapidus* selektiv die Bildung von Radikalen in allylischen Systemen katalysiert. Neben Valencen, Myrcen und Limonen ist  $\alpha$ -Pinen ein weiteres Terpen, welches Substrat für die Dioxygenase ist. Damit steht ein biotechnologisches Verfahren zur Produktion von Verbenon und (*E*)- bzw. (*Z*)-Verbenol zur Verfügung, um eine synthetische Produktion dieser Verbindungen zu umgehen. Sowohl der Kostenaspekt als auch der Arbeitsaufwand zur Bereitstellung von Aromastoffen wurde optimiert. Gleichzeitig ist die Verbraucherakzeptanz gegenüber biotechnologisch hergestellten Aromastoffen weitaus höher als gegenüber synthetisch hergestellten.

Mit (+)-Car-3-en bot sich ein weiteres Monoterpen als Substrat für die Dioxygenase an. Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Pinen verfügt es jedoch über eine zweite Position, die für die Radikalbildung zu Verfügung steht. Durch Umlagerungen der Radikale besteht die Möglichkeit der Bildung von drei Carenonen und sechs Carenolen (pro Carenon jeweils *cis*- und *trans*-Carenol) (Abbildung 26).

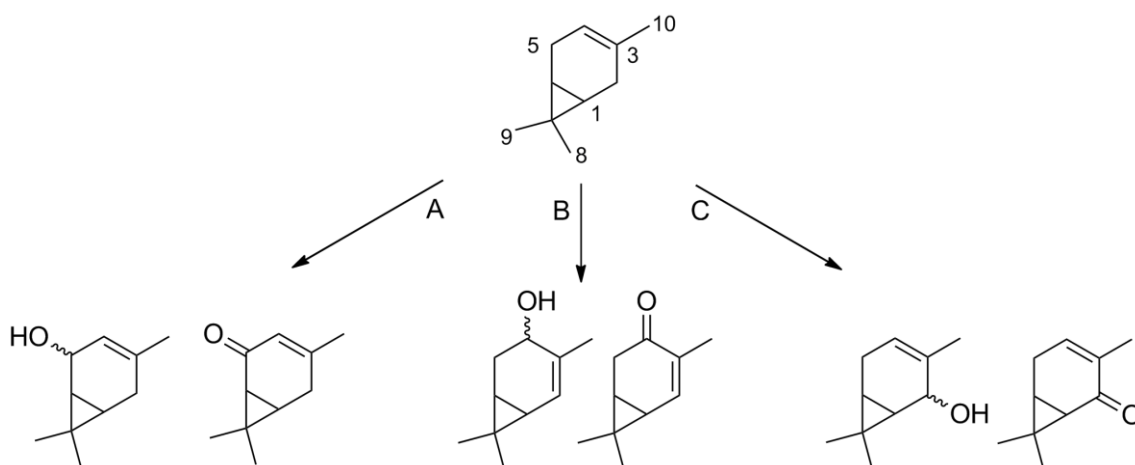


Abbildung 26 Bildung von Car-3-en-5-on/ol (A), Car-2-en-4-on/ol (B) und Car-3-en-3-on/ol (C) aus (+)-Car-3-en

---

In der folgenden Publikation wurde die Substratspezifität der Dioxygenase und der radikalische Mechanismus über intermediäre Hydroperoxide bestätigt. Es wurde weiter untersucht, welches Carenon mit den jeweiligen Carenolen bevorzugt gebildet wird. Das Substrat (+)-Car-3-en verfügt über einen Cyclopropylring, der die Bildung der Carenone/-ole beeinflusst. Aufgrund der planaren Ausrichtung des Rings wurde der Angriff des Sauerstoffs in *trans*-Position dirigiert, so dass bevorzugt die *trans*-Carenone/-ole gebildet wurden.

### 3 Bioconversion of car-3-ene by a dioxygenase of *Pleurotus sapidus*

---

Reprinted from "Bioconversion of car-3-ene by a dioxygenase of *Pleurotus sapidus*", accepted by *Journal of Biotechnology*, **2011**, doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.007, article in press, with permission from Elsevier.

#### 3.1 Abstract

Mycelium of the basidiomycete *Pleurotus sapidus* known to contain a novel dioxygenase was used for the bioconversion of car-3-ene [I]. After 4 h of incubation 25.3 mg L<sup>-1</sup> car-3-en-5-one [V], 5.4 mg L<sup>-1</sup> car-3-en-2-one [VII], and 7.3 mg L<sup>-1</sup> car-2-en-4-one [XV] accumulated as major oxidation products. The identity of the respective carenones and their corresponding alcohols was confirmed by comparison with MS and NMR spectral data obtained for synthesized authentic compounds. The peak areas of oxidation products were at least five times higher as compared with autoxidation. A radical mechanism similar to lipoxygenase catalysis was proposed and substantiated with detailed product analyses. The reduction of assumed car-3-ene hydroperoxides to the corresponding alcohols evidenced the radical initiated formation of hydroperoxides and confirmed the regio- and stereo-selectivity of the dioxygenase. The introduction of molecular oxygen into the bicyclic car-3-ene [I] molecule occurred at allylic positions of a cyclic isopentenyl moiety with a pronounced preference for the position adjacent to the non-substituted carbon atom of the C-C-double bond. This co-factor independent selective oxygenation presents an alternative to P450 mono-oxygenase based approaches for the production of terpene derived flavor compounds, pharmaceuticals and other fine chemicals.

Keywords: *Pleurotus sapidus*, (+)-car-3-ene, bioconversion, regio-selectivity, stereo-selectivity, dioxygenase

#### 3.2 Introduction

Terpenoids (isoprenoids) encompass more than 40,000 structures and form the largest class of plant metabolites. They are widely used as industrially important chemicals, including pharmaceuticals, flavors, fragrances, pesticides and

disinfectants, and as large-volume feedstock for chemical industries (Bohlmann J, 2008). The bicyclic monoterpene (+)-car-3-ene (3,7,7-trimethyl bicyclo [4.1.0] hept-3-ene, [I]) is a constituent of the tropical pine trees *Pinus roxburghii* and *Pinus logifolia* (55–65%) (Pattekhan *et al.*, 1997), some juniper species, and citrus trees. The (-)-car-3-ene enantiomer is found in the essential oil of the Scots pine (*Pinus silvestris*) (Breitmaier, 2006). Both enantiomers are natural, inexpensive and widely available raw materials and serve as appropriate synthons in the chemical synthesis of pharmaceuticals, agrochemicals, flavors and fragrances (Kuriata *et al.*, 2010, Macaev & Malkov, 2006, Moreira & Nascimento, 2007). Terpene hydrocarbons present suitable precursors for a sustainable biotechnological production of antibiotics, hormones, vitamins, amino acids, and for flavor compounds (Antranikian & Heiden, 2006, Krings & Berger, 2010, Sijbesma & Schepens, 2003, Ulber & Sell, 2007). As early as in 1962 car-3-ene [I] was used as a precursor in bioconversion studies with *Aspergillus niger* that resulted in the formation of low yields of a hydroxyketone (Prema & Bhattacharyya, 1962, Prema & Bhattacharyya, 1962). Another study described the microbial oxidation of (+)-car-3-ene [I] using *Mycobacterium smegmatis*, with (+)-chaminic acid, car-3-en-5-one [V] and 2-(3'-methylcyclohexa-3',5'-dienyl)propane-2-ol as the products (Stumpf *et al.*, 1990). The epoxidation of the cyclic double occurred during incubation of *Nicotiana tabacum* and *Catharanthus roseus* with car-3-ene [I] (Hirata *et al.*, 1994, Miyazawa & Kano, 2010). During the last decade the bioconversion of terpenes using higher fungi has attracted notice with a special emphasis on the production of natural flavors. The basidiomycete *Pleurotus sapidus* was shown to convert bicyclic terpene hydrocarbons regio- and stereo-specifically to valuable flavor compounds:  $\alpha$ -pinene to verbenone (Krings *et al.*, 2009) and valencene to the grapefruit aroma impact nootkatone (Kaspera *et al.*, 2005, Krügener *et al.*, 2010). This study presents the regio- and stereo-selective oxidation of the bicyclic monoterpene car-3-ene [I] using a dioxygenase previously isolated and sequenced from mycelium homogenate of *P. sapidus* (Fraatz *et al.*, 2009).

### 3.3 Materials and methods

#### 3.3.1 Chemicals

(+)-Car-3-ene [I] (90%, Sigma Aldrich, Germany) and azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.12) were distilled (> 99% purity) before use. In (+)-car-3-ene no oxidations

products were detectable. BHT (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene, 99%) was from Fluka (Seelze, Germany). All other chemicals used were analytical grade.

### 3.3.2 Fungi

*Pleurotus sapidus* (DSMZ 8266) was obtained from the culture collections of DSMZ, Braunschweig. For maintenance on agar slants and submerged culture, the fungus was grown on glucose/L-asparagine/yeast extract medium as described elsewhere (Onken & Berger, 1999).

### 3.3.3 Fungal growth

The fungal cultures (1 cm<sup>2</sup> of a densely overgrown piece of agar) were inoculated into a 150 mL glucose/L-asparagine/yeast extract medium, homogenized using an Ultraturrax homogenizer (Jahnke & Kunkel, Staufen Germany), and grown aerobically at 24°C and 150 rpm on an orbital shaker (Multitron, Infors, Bottingen, Switzerland). Experimental cultures (500 mL shake flasks, 225 mL medium volume) were inoculated with 25 mL 5-day-old pre-cultures grown on the same medium and homogenized prior to inoculation.

### 3.3.4 Mycelium homogenates (MH)

After 5 days of fungal growth the active biomass was harvested by centrifugation at 10,000 x *g* and separation of the supernatant. To 500 mg of fungal mycelium (wet weight) 1 mL of 200 mM HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonic acid) buffer, pH 5.5 with 5% glycerol was added and homogenized with an Ultraturrax (Micra D-9) for 2 min at 16,000 rpm on ice.

### 3.3.5 Bioconversion

Conversion experiments were started by adding 300 mg L<sup>-1</sup> of (+)-car-3-ene [I] to 500 mg fungal mycelium homogenized in 1 mL HEPES-buffer. The homogenates were incubated 4 h at 24°C and 150 rpm on an orbital shaker (Multitron, Infors, Bottingen, Switzerland). Conversion products were extracted three times with 1.5 mL azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.2, v/v). The combined and dried (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sub>sicc.</sub>) organic phases were concentrated to approx. 1 mL and after addition of 60 µg of the external standard BHT (3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene; response factor 1.0 assumed) and analyzed by means of thin layer chromatography (TLC) and high resolution gas chromatography mass spectrometry (HRGC-MS). Blanks were carried out by

incubation of inactivated (30 min at 100 °C) homogenates with (+)-car-3-ene [I] in HEPES-buffer. Furthermore the solvent extracts were reacted with NaBH<sub>4</sub> to convert presumed hydroperoxides to the corresponding alcohols ( Section 3.3.11).

### 3.3.6 High resolution gas chromatography (HRGC) / high resolution gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS)

One µL of each concentrated sample was injected into a Fison GC MFC 800 equipped with a cool on-column injector, a Factor Four VF Wax ms (Varian, USA) fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 µm film thickness), hydrogen as the carrier gas (40 cm s<sup>-1</sup>), and a flame ionization detector (fid, 230 °C) using a temperature program from 40°C (3 min) to 200°C with a rate of 3°C min<sup>-1</sup> and to 240°C with a rate of 10°C min<sup>-1</sup> and hold for 5 min. Quantification was performed according to the standard BHT. GC-MS analysis was carried out using the same chromatographic conditions as for GC-FID analysis and helium as the carrier gas (38 cm s<sup>-1</sup>). Identification of transformation products was achieved by comparison of mass spectra with data from reference compounds or literature (Wiley 08 / NIST 08, 2008; spectral libraries) and by linear retention index values using a Fisons GC 8000 gas chromatograph and a Fisons MD 800 mass selective detector (interface: 230°C, ion source: 200°C, quadrupole: 100°C, electron impact ionization (ei, 70 eV), scan range m/z 33 to 300 amu).

### 3.3.7 Thin layer chromatography (TLC)

TLC was carried out on aluminium sheets covered with silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) and azeotropic pentane/diethyl ether (1:1.12) as mobile phase. The TLC plates were dried and subsequently stained with either anise aldehyde (0.5 g anise aldehyde, 10 mL glacial acetic acid, 85 mL methanol, 5 mL concentrated sulphuric acid) (van der Heide, 1966) or the hydroperoxide specific Huber reagent (3.0 g α-naphthol, 150 mL methanol, 1350 mL H<sub>2</sub>O, 0.5 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 20 mL acetic acid, 0.5 g FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 2.2 g 2-[(4-amino-3-methylphenyl)ethylamino]ethyl sulfate) (Huber & Fröhlke, 1972).

### 3.3.8 NMR

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR were performed on a BRUKER Advance DRX-500 (<sup>1</sup>H at 500 MHz, <sup>13</sup>C at 125 MHz) and samples were dissolved in CDCl<sub>3</sub>. The chemical shift signals were referenced to the residual signal of the solvent.

### 3.3.9 Synthesis of carenones and carenols

Car-3-en-5-one [V], car-3-en-2-one [VII] and car-2-en-4-one [XV] were synthesized as described elsewhere (Chidambaram & Chandrasekaran, 1987). In brief, 3.87 mmol of (+)-car-3-ene [I] was dissolved in 12 mL dry benzene, 4 mmol 70% *tert*-butyl hydroperoxide and 4 mmol pyridinium dichromate were added and reacted with continuous agitation for 4 h at 25°C. The reaction yielded a mixture of oxygenated products with car-3-en-5-on [V], car-3-en-2-one [VII], and car-2-en-4-one [XV] in a ratio of 2.3:1.3:1.0 as the main products. The carenones were separated from the reaction mixture using flash chromatography on a silica gel column with silica gel 60. For conditioning a portion of 50 g of the silica gel 60 was dried at 120 °C over 12 h and the activity was adjusted to II-III by adding 2.25 mL water and subsequent equilibration for 12 h in a rotary evaporator. The adjusted silica gel was slurried into a glass column (20 cm x 1.5 cm) with pentane /diethyl ether 9:1. The reaction mixture was introduced to the column in three parts. The respective carenones were eluted with pentane/diethyl ether mixtures (9:1, 3:1 and pure diethyl ether, each 200 mL) of increasing polarity. Fractions were collected and concentrated using a Vigreux column and re-dissolved in CDCl<sub>3</sub>. Full separation of car-3-en-2-one [VII] and car-2-en-4-one [XV] was achieved by means of preparative gas chromatography. The structures of purified carenones were confirmed according to their respective spectral data (EI-MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, Tabelle 4). Reduction of the particular carenones with NaBH<sub>4</sub> yielded the corresponding carenols. For *cis/trans* ratios see Tabelle 6.

### 3.3.10 Preparative gas chromatography

Preparative gas chromatography was accomplished on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph. The system was equipped with a CIS 3 cold injection system (Gerstel, Mülheim, Germany), a Multi Column Switching System II (Gerstel, Mülheim, Germany) and a Hewlett Packard 7673 autosampler (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). A pre-column (Optima Wax, 5 m x 0.53 mm x 2 µm) was connected with a preparative column (Optima Wax, 25 m x 0.53 mm x 2 µm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The carrier gas was hydrogen at a flow rate of 8.9 mL min<sup>-1</sup> at 100°C and the detector was a flame ionization detector (FID, 230 °C). The following temperature program was used: 40°C (3 min) to 200°C with a rate of 3°C min<sup>-1</sup> and to 240°C with a rate of 10°C min<sup>-1</sup> and hold for 5 min.



### 3.3.11 Reduction of bioconversion products/synthetics

Isolated bioconversion products or synthesized reference substances were re-dissolved in 0.5 mL MeOH (water free) and treated with NaBH<sub>4</sub> for 1 h on ice with subsequent addition of 0.5 mL water. The reaction mixture was evaporated to dryness and re-dissolved in pentane/diethyl ether (1:1.12) and submitted to HRGC-MS.

## 3.4 Results

Homogenates of *P. sapidus* were incubated with 300 mg L<sup>-1</sup> of (+)-car-3-ene [I]. After 4 hours of agitating several car-3-ene [I] derived oxidation products were detected in concentration up to 25.3 mg L<sup>-1</sup> for the major product car-3-en-5-one [V], 5.4 mg L<sup>-1</sup> car-3-en-2-one [VII], and 7.3 mg L<sup>-1</sup> car-2-en-4-one [XV]. It is known that, after contact with molecular oxygen, (+)-car-3-ene [I] is prone to autoxidation and readily polymerizes above 40°C (Rothenberg et al., 1998). In fact, longer incubation times were found to direct the transformation towards car-3-ene [I] polymerization products (data not shown) which had an adverse impact on both concentration of primary oxygenated products and on HR-GC analysis. Because most of the mono-oxygenated car-3-enes [I] are not commercially available and HRGC-MS data in literature are inconsistent, car-3-en-5-one [V], car-3-en-2-one [VII], and car-3-en-5-one [XV] have been synthesized to confirm the respective structures. Spectral data (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR and MS) are presented in Tabelle 4. In contrast to EI-MS data NMR data are in good accordance with published data (Kolehmainen et al., 1993, Maas et al., 1984, Menini et al., 2008).

Tabelle 4 Spectral data of carenones

C/H	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm)	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	m/z / (%) of bp
(a) Car-3-en-5-one [V]			
8	1.06 (s, 3H)	14.39	[M <sup>+</sup> ], 150 (81)
7		22.56	135 (39)
10	1.89 (s, 3H)	23.69	122 (16)
1	1.46 (t, 1H, <sup>3</sup> J <sub>1-6</sub> = <sup>3</sup> J <sub>1-2</sub> = 8.2 Hz)	25.83	109 (34)
2	2.34 (d, 1H, <sup>2</sup> J=20.9)	27.86	108 (62)
2	2.65 (dd, 1H, <sup>2</sup> J=21.2, <sup>3</sup> J <sub>2-1</sub> =8.1)		107 (100)
9	1.20 (s, 3H)	28.43	95 (24)

C/H	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	m/z / (%) of bp
6	1.58 (d, 1H, $^3J_{6-1} = 7.9$ )	32.84	91 (76)
4	5.84 (s, 1H)	126.36	80 (20)
3		158.91	79 (55)
5		196.75	77 (30)
(b) Car-3-en-2-one [VII]			
8	1.10 (s, 3H)	14.3	[M <sup>+</sup> ], 150 (100)
10	1.79 (s, 3H)	16.1	135 (59)
7		21.9	121 (12)
5	2.46 (d, 1H, $^2J = 21.4$ )	23.1	109 (27)
5	2.71 (dd, 1H, $^2J = 20.8$ , $^3J_{5-6} = 8.3$ ),		108 (70)
6	1.44 (t, 1H, $^3J_{6-1} = ^3J_{6-5} = 8.0$ )	26.4	107 (96)
9	1.20 (s, 3H),	28.5	95 (18)
1	1.66 (d, 1H, $^3J_{1-6} = 7.9$ )	34.4	91 (72)
3		135.1	79 (58)
4	6.42 (s, 1H)	142.6	67 (59)
2		196.6	65 (18)
(c) Car-2-en-4-one [XV]			
8	0.85 (s, 3H)	13.4	[M <sup>+</sup> ], 150 (59)
10	1.81 (s, 3H)	16.0	135 (30)
6	1.37 (t, 1H, $^3J_{6-1} = ^3J_{6-5} = 8.0$ )	23.4	122 (9)
1	1.52 (s, 3H)	24.1	109 (19)
7		24.9	108 (95)
9	1.26 (s, 3H)	27.6	107 (100)
5	2.61 (d)	33.3	105 (17)
5	2.63 (dd)		93 (25)
3		133.2	91 (83)
2	6.84 (d, 1H, $^2J = 7.8$ )	144.5	80 (19)
4		196.7	79 (75)

Bp, base peak (100%)

Tabelle 5 shows the peak concentration of car-3-ene [I] derived mono-oxygenated products. Both, bioconversion and autoxidation of caren-3-ene [I] showed a similar product spectrum, but differed in terms of regio-chemistry and quantity. The carenones V, VII, and XV were the predominating products in bioconversion batches, whereas the major autoxidation product found was  $\alpha$ -phellandren-8-ol [XVI]. Generally, the concentration of oxygenated products was considerably higher - five times averaged over all products - in the bioconversion trials compared to car-3-ene autoxidation. This ratio was much higher than average for the three carenones [V, VII, XV], especially for the car-3-en-5-one [V] supporting a predominant enzyme catalyzed formation of the respective ketone. The samples were concentrated up to 24 mg L<sup>-1</sup> (car-3-en-5-one [V]), 24 g L<sup>-1</sup> (car-3-en-2-one [VII]) and 11.5 g L<sup>-1</sup> (car-2-en-4-one [XV]), but no odor impression was detected during GC-olfactometry (data not shown).

**Tabelle 5 Car-3-ene derived oxidation products of *P. sapidus* (4.4  $\mu$ mol in 1 mL buffer + 500 mg homogenized mycelium, 4 h)**

Product	Bioconversion (mg L <sup>-1</sup> )	Autoxidation (mg L <sup>-1</sup> )	Identification
Car-3-en-5-one [V]	25.3	0.9	MS, Syn, NMR
Car-3-en-2-one [VII]	5.4	0.4	MS, Syn, NMR
Car-2-en-4-one [XV]	7.3	0.2	MS, Syn, NMR
<i>cis/trans</i> -Car-3-en-5-ol [IV]	8.1	1.5	MS, Syn
<i>cis/trans</i> -Car-3-en-2-ol [VI]	1.6	0.4	MS, Syn
<i>cis/trans</i> -Car-2-en-4-ol [XIV]	2.4	0.7	MS, Syn
$\alpha$ -Phellandren-8-ol [XVI]	2.9	1.9	MS, RI
<i>m</i> -Mentha-4,6-dien-8-ol [XII]	0.36	0.1	MS, RI
4-Cymen-8-ol [XVII]	0.8	0.10	MS, RI
3-Cymen-8-ol [XIII]	n.d.	< 0.1	MS, RI

MS, mass spectrum; Syn, synthesis; NMR, nuclear magnetic resonance, n.d., not detected. Analyses were performed in duplicates; all standard deviations were below 10%

Thin layer chromatography with subsequent peroxide selective staining (*Huber's* reagent) indicated that both biochemical and autoxidative generation of oxygenated products were initiated by the formation of allylic radicals of car-3-ene [I] which either instantly added molecular oxygen, or underwent re-arrangements before the

respective terpene hydroperoxide was built. Comparing biochemical and autoxidative car-3-ene [I] oxygenation not only the reaction rate differed, but the regio-chemical orientation of the oxygenation products was different, too. Tabelle 6 (a and b) shows the relative ratios of carenones [V, VII, XV], carenols [IV, VI, XIV] and their respective *cis/trans* ratios.

**Tabelle 6** Product ratios after bioconversion and autoxidation of car-3-ene with *P. sapidus*: (a) Carenones and corresponding carenols; (b) *cis/trans* ratios of the respective carenols before and after NaBH<sub>4</sub> reduction

	Car-3-en-5-one [V]	Car-3-en-2-one [VII]	Car-2-en-4-one [XV]
(a) Carenones and corresponding carenols			
Bioconversion	4.7	1.0	1.4
Autoxidation	1.6	1.0	0.3
	Car-3-en-5-ol [IV]	Car-3-en-2-ol [VI]	Car-2-en-4-ol [XIV]
(a) Carenones and corresponding alcohols			
Bioconversion	1.4	1.0	0,7
Autoxidation	1.2	1.0	0.6
(b) <i>cis/trans</i> ratios	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>	<i>cis/trans</i>
Bioconversion	<i>trans</i>	0.15/1.0	0.15/1.0
Autoxidation	<i>trans</i>	0.3/1.0	0.5/1.0
Bioconversion (red.) <sup>a</sup>	0.34/1.0	2.0/1.0	2.4/1.0
Carenones (red.) <sup>a</sup>	4.0/1.0	2.5/1.0	2.4/1.0

<sup>a</sup> Reduced with NaBH<sub>4</sub>; *trans*, *trans*-isomer detected only); n.d., not definable

For autoxidation and bioconversion the initial oxidative attack took place predominantly at the C5 of car-3-ene [I] to give [V] and [VI] and to a minor extent at C2 to give [VI] and [VII], respectively, but a significant formation of car-2-en-4-one [XV] occurred during the bioconversion only (Tabelle 6a). Autoxidation and bioconversion yielded the corresponding carenols in almost the same ratio as the carenones. Of the detected carenols the respective *trans*-isomers prevailed in all cases (Tabelle 6b). In order to measure the amount of intact carene hydroperoxides

the concentrated solvent extract of the bioconversion was treated with a surplus of NaBH<sub>4</sub>. Most of each carenone [VII] and [XV] was reduced to the corresponding carenols and increased their amount proportionally. As the NaBH<sub>4</sub> reduction of pure references yielded preferably the *cis* configured carenols (Kuhn & Fischer, 2009), the ratio turned to *cis* carenols in the reduced bioconversion trial. However, the increase of the response of the isomeric car-3-en-5-ols [IV] was almost twice as much than calculated from the reduction of the corresponding car-3-en-5-one [V] alone with an unexpected surplus of *trans*-car-3-en-5-ol (Tabelle 6b). An accurate calculation was not feasible due to incomplete reduction of the ketones, rearrangements and partial integrity of the presumed car-3-en-5-hydroperoxide [II] during reduction.

### 3.5 Discussion

The first introduction of oxygen is usually the rate limiting step in the catabolism of non-polar compounds, such as terpenes. Especially cytochrome P450 systems, constitutive of all living beings and representing one of the largest and oldest gene super-families, may act as terminal mono-oxygenases in a range of reactions. However, for an industrial application of co-factor dependent enzymes, several crucial obstacles have to be surmounted. Therefore, co-factor independent specific oxygenation of terpene precursors would encounter particular interest of both research and industry (Krings & Berger, 2010). Recently, a novel dioxygenase from *P. sapidus* was characterized and the structural gene sequenced. The dioxygenase, with best homologies to lipoxygenases from ascomycetes, catalyzed regio- and stereo-specifically the allylic hydroperoxygenation of (+)-valencene to the valuable flavor compound nootkatone (Fraatz et al., 2009, Krügener et al., 2010) and of  $\alpha$ -pinene to verbenone (Krings et al., 2009). In this study (+)-car-3-ene [I] was used as another bicyclic terpene substrate to confirm the assumed substrate specificity and stereo-selectivity of the enzyme. For the above mentioned mono- and sesquiterpene it was shown that both autoxidation and bioconversion took place along the same radical mediated pathway. Thus, enzyme catalyzed oxygenation and autoxidation needed to be carefully distinguished. This was likewise found for the bioconversion of (+)-car-3-ene [I]. The incubation time was restricted to 4 hours, as the dioxygenase initiated reaction ran out of control in terms of selectivity with increasing incubation

time because of the high reactivity of both (+)-car-3-ene [I] and the hydroperoxide intermediates.

### 3.5.1 Autoxidation

As confirmed by TLC with hydroperoxide specific staining the initial introduction of molecular triplet oxygen during autoxidation yielded several hydroperoxides of (+)-car-3-ene [I] which was in good agreement with earlier work on car-3-ene autoxidation (McGraw et al., 1999, Rothenberg et al., 1998). Based on a detailed product analysis a substantiated reaction pathway was deduced which is shown in Abbildung 27.

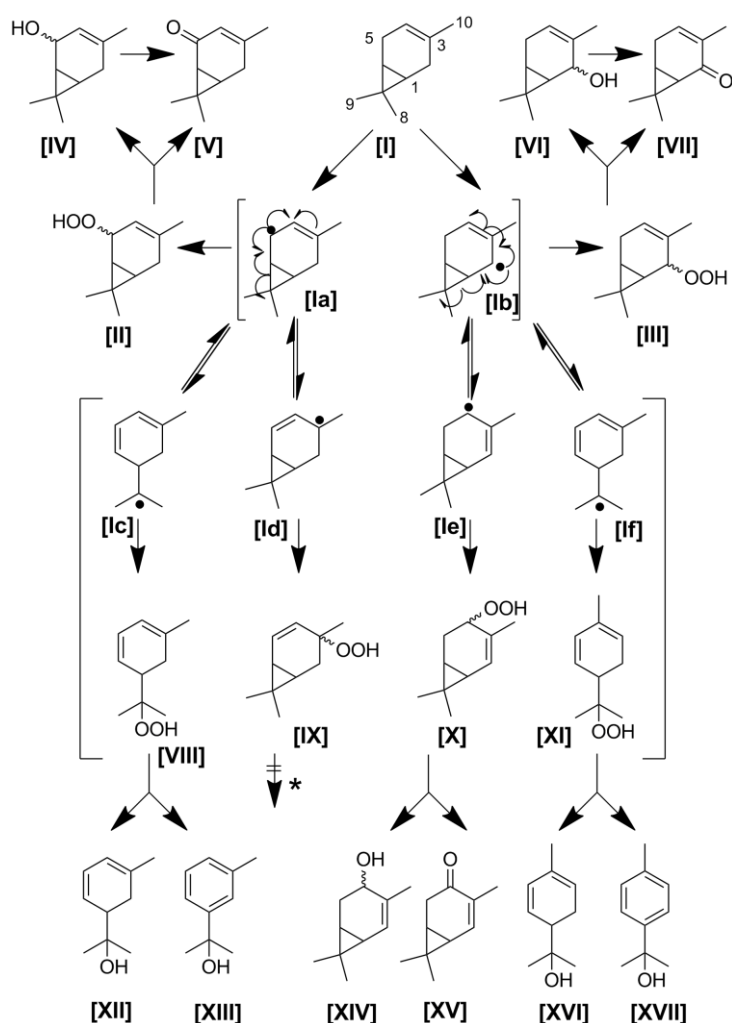


Abbildung 27 Reaction scheme of bioconversion and autoxidation of car-3-ene [I]. (\* rearrangement of (Limberger et al., 2007) afforded hydroperoxide [II] (Schenck et al., 1958))

The first attack occurred at the two allylic ring positions (C2, C5) of (+)-car-3-ene [I] and afforded the two radicals [Ia, Ib] which either reacted directly with triplet oxygen to give the respective hydroperoxides [II, III] or underwent diverse rearrangements.

While maintaining the bicyclic backbone, oxygen uptake gave the hydroperoxides (Limberger et al.) and [X]. The cleavage of the cyclopropyl ring shifted the reaction towards the formation of menthadiene hydroperoxides [VIII, XI]. As known for other terpene hydroperoxides (Krings et al., 2009, Krügener et al., 2010, Kuznetsova et al., 2005) carene hydroperoxides were unstable during GC-analysis. Their occurrence was confirmed by TLC with selective peroxide staining and concluded from their respective degradation products. The structures of the corresponding alcohols and ketones were unambiguously elucidated (Tabelle 4, Tabelle 5). Though tertiary radical [Id] is likely the most stable carbon centered radical, degradation products of the corresponding hydroperoxide (Limberger et al.) were not found. Tertiary hydroperoxides in conjugation to a double bond are known to undergo a fast rearrangement, and this afforded hydroperoxide [II] (Schenck et al., 1958). The same rearrangement was described for (+)-valencene autoxidation (Krügener et al., 2010).

The approach of triplet oxygen to the intermediate free radicals of *car-3-ene* [I] took place preferably on the opposite side of the cyclopropyl ring and afforded the *trans*-configured carene hydroperoxides [II], [III], and [X]. The energy minimized (CS Chem 3D Ultra 7.0) conformation of *car-3-ene* (Abbildung 28) shows the almost planar cyclohexenyl ring with the methyl group (at C3) in plane and the bis-methylated cyclopropyl ring out of plane hampering the free access of oxygen from this side.

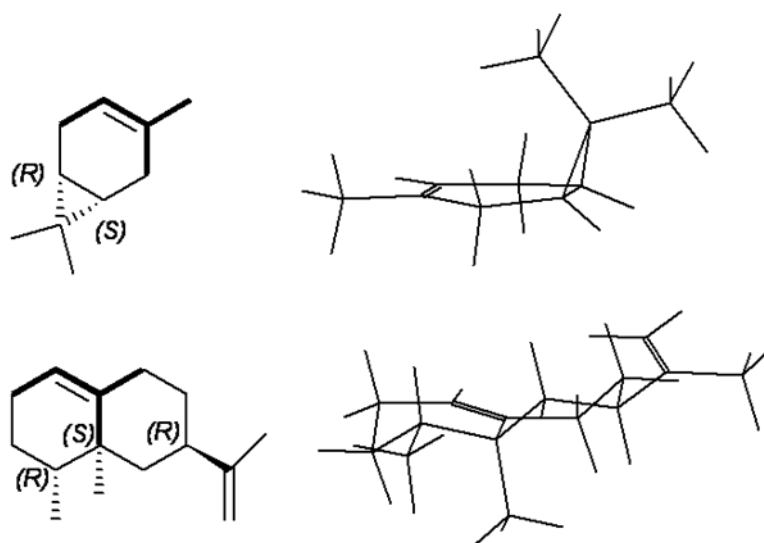


Abbildung 28 Structure and energy minimized (CS Chem 3D Ultra 7.0) conformation of *car-3-ene* and (+)-valencene

### 3.5.2 Enzyme catalysis

The enzyme catalyzed oxygenation of car-3-ene [I] showed a significantly accelerated product formation (Tabelle 5). For the respective carenones, at first glance, the regio-selectivity seemed to be similar to autoxidation. However, the true regio-chemical orientation of the dioxygenase catalyzed oxygenation was revealed after reduction of the respective carene hydroperoxides and carenones. After treating the product mixture of the bioconversion with NaBH<sub>4</sub> the measured amount of *trans*-car-3-en-5-ol [IV] was much higher than expected from the total of genuine car-3-en-5-ol [IV] and the calculated amount of [IV] obtained after the reduction of car-3-en-5-one [V] that resulted in a preferred *cis*-orientation of the respective carenol. This was not observed for the two other carenols [VI, XIV]. This gives evidence for a preferred enzyme catalyzed formation of *trans*-car-3-en-5-hydroperoxide [II] that remained during the bioconversion. After reduction of the bioconversion extract, the ratio of *cis/trans* for both car-3-en-5-ol [IV] and car-2-en-4-ol [XIV] was found inverted, whereas *trans*-car-3-en-5-ol [IV] was still prevailing (Tabelle 6b). This strongly suggests that in agreement to car-3-ene [I] autoxidation the dioxygenase catalyzed introduction of oxygen occurred on the opposite side of the bulky bis-methylated cyclopropyl ring but in contrast to autoxidation predominately at the allylic C5 position. With increasing incubation time hydroperoxides accumulate. This may start to inhibit the activity of the dioxygenase and also deliver starters for non-selective autoxidation.

The radical mediated reaction mechanism as well as the regio- and stereo-selective orientation of the dioxygenase catalyzed oxidation of car-3-en [I] is in line with results obtained for the bioconversion of valencene using the same enzyme. However, in the case of the oxygenation of valencene even autoxidation showed an apparent regio-selectivity. Owing to allylic rearrangements of the respective allylic “valencene hydroperoxides” oxidation products were found at C7 only (Davies & Davison, 1989, Krügener et al., 2010, Schenck et al., 1958). The dioxygenase catalyzed reaction showed a pronounced preference towards the formation of 6(*R*)-Isopropenyl-4(*R*),4a(*S*)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(*R*)-yl-hydroperoxide (introduction of O<sub>2</sub> opposite to both methyl groups and on the same side as the distant isopropylene group), whereas the autoxidation resulted simply in a slight excess of the same diastereomer (mean steric hindrance due to the two methyl groups, Abbildung 28).



In conclusion, the dioxygenase of *P. sapidus* catalyzed the regio- and stereo-selective introduction of molecular oxygen into mono- and sesquiterpenes at allylic positions of cyclic isopentenyl moieties with a pronounced preference for the allylic position adjacent to the non-substituted carbon atom of the C-C-double bond. In contrast to P450-enzymes the dioxygenase did not require any redox-cofactor which is an important advantage for possible industrial applications. However, because of the reactivity of the hydroperoxides intermediates the bioconversion was not easily controlled, and autoxidation competed on the longer run.

### **3.6 Acknowledgements**

Supported by Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (Bonn) through AIF and BMWi (AIF 299 ZN). H. Zorn and M. A. Fraatz are thanked for their kind cooperation.

## Überleitung II

Auch für (+)-Car-3-en als Substrat konnte gezeigt werden, dass die Dioxygenase aus *Pleurotus sapidus* regio- und stereoselektiv die Radikalbildung in allylischer Position katalysiert. Das Produktspektrum war erneut mit der Autoxidation vergleichbar, zeigte jedoch deutlich höhere Konzentrationen an Carenonen und Carenolen. Die Bildung des Car-3-en-5-on und der entsprechenden Carenole war gegenüber der Bildung der beiden anderen Carenone und der dazugehörigen Carenole favorisiert. Bei der Bildung von Car-3-en-5-ol stellte sich heraus, dass der *trans*-Alkohol bevorzugt entsteht, welcher sich aufgrund sterischer Begünstigung entgegengesetzt zum Cyclopropylring ausrichtete (Abbildung 28).

Bei den Untersuchungen zu den Terpenhydroperoxiden war die direkte Detektion erschwert. Über Dünnschichtchromatographie mit anschließender Hydroperoxid spezifischer Färbung konnten erste Hinweise auf die Terpenhydroperoxide gewonnen werden. Reduktion und Oxidation der Reaktionsansätze führten jeweils zu den entsprechenden Terpenalkoholen bzw. -ketonen, die gaschromatographisch eindeutig detektiert werden konnten. Eine direkte gaschromatographische Messung mit diskreten Peaks erwies sich als nicht zufriedenstellend. Eine postulierte Degradation der Hydroperoxide auf der GC-Säule erklärt stark tailende Peaks, deren zugehörige Massenspektren die Massenpeaks der entsprechenden Ketone bzw. Alkohole aufwiesen. Die folgende Publikation beschäftigt sich mit der direkten Erfassung der Terpenhydroperoxide am Beispiel von (+)-Car-3-en. Mittels Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie und Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen wurde eine Methode zur Detektion der Terpenhydroperoxide etabliert und die vermuteten Strukturen identifiziert.

---

## 4 Analysis of car-3-en-5-hydroperoxide

---

Reproduced with permission from *Natural Product Communications*, **2011**, 6 (9), 1217-1220. Copyright 2011.

### 4.1 Abstract

HRGC-MS, using split/splitless injection (230°C), showed that a dioxygenase from *Pleurotus sapidus* regio-selectively transformed (+)-car-3-ene to car-3-en-5-one as the major volatile product to minor amounts of the corresponding alcohol, and to some other volatiles. Thus, the reaction was assumed to be radical mediated and similar to the lipoxygenase catalyzed peroxidation of polyunsaturated fatty acids, but the expected car-3-ene-hydroperoxides were not detected. TLC of the reaction products, followed by hydroperoxide specific staining, visually indicated the presence of hydroperoxides. TLC spots were eluted and re-analyzed using cool, on-column injection, but only tailing peaks showing a mixed mass spectrum of car-3-en-5-ol/one were obtained. An unequivocal identification of car-3-en-5-hydroperoxides was achieved only after using APCI<sup>+</sup>-LC-MS. Upon structural confirmation, the car-3-en-5-hydroperoxide was accumulated by preparative HPLC, re-injected cool on-column, and the continuing degradation of the hydroperoxide to monoterpene ketone and alcohol during chromatography was verified. It was concluded that terpene hydroperoxides may occur in essential oils more frequently than anticipated, but are not recognized due to the principal blindness of capillary gas chromatography techniques and UV/vis LC-detectors.

**Keywords:** (+)-car-3-ene, car-3-en-5-hydroperoxide, car-3-en-5-one, bioconversion, *Pleurotus sapidus*

### 4.2 Introduction

Looking at the abundant olefinic structures of oligoisoprenoids in essential oils, photo- (Chiron et al., 1997, Schieberle et al., 1987) and autoxidation reactions (Karlberg et al., 1994, Rothenberg et al., 1998) to peroxides must be expected.

However, steam distillation followed by high resolution gas chromatography is still common in essential oil analysis, and both steam and the hot injector surface inevitably degrade any primary terpene (hydro) peroxides present in the sample. Not surprisingly, only very few terpene endoperoxides are well characterized, such as the antimalarial drugs artemisinin and arthemether, and the anthelmintic ascaridol (Breitmaier, 2006). Occasionally, endo- and hydroperoxides were isolated from solvent extracts of medical plants (Kastner et al., 1995). Indirect evidence for a secondary formation of peroxy-structures is provided by the frequently observed antimicrobial properties of essential oils, which are increasing during aging (Chiron et al., 1997).

Interest in terpene hydroperoxides rose when it was discovered that hydroperoxides of widely used fragrance chemicals, such as (*R*)-(+)-limonene, are potent contact allergens (Karlberg et al., 1994). More recently, several monoterpenes used in cosmetics, fragrances and household products were examined in detail for autoxidation kinetics, structural requirements and mechanistic details (Johansson et al., 2009, Nilsson et al., 2008, Rothenberg et al., 1998). Various reactions, among them a thiol-ene mechanism, may be involved in the formation of an immunogenic terpene-protein complex (Johansson et al., 2009).

Analysis of hydroperoxides is generally complicated by their chemical instability. Quantification was based on iodometry (Rothenberg et al., 1998). Isolation and separation of peroxides was usually carried out using liquid chromatography on silica phases (Van Tilborg, 1975), followed by mass spectrometry (Warscheid & Hoffmann, 2001). Different ionization methods were applied to analyze hydroperoxides of (-)-limonene, linalool, (-)- $\beta$ -pinene, (+) and (-)- $\alpha$ -pinene (Chiron et al., 1997, Johansson et al., 2009, Nilsson et al., 2008, Schieberle et al., 1987). The hydroperoxidation of (+)-car-3-ene was suggested, but no attempts were made to isolate and structurally characterize the product(s) (Rothenberg et al., 1998). Gas chromatographic analyses of terpene hydroperoxides were successful in rare cases only (Karlberg et al., 1994, Schieberle et al., 1987).

Recent studies elucidated the bioconversion of terpenes catalyzed by a dioxygenase of the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. (*R*)-(+)-Limonene was converted to carvone, as well as to the corresponding *cis/trans*-carveols (Onken & Berger, 1999),  $\alpha$ -pinene to verbenone and *cis/trans*-verbenols (Krings et al., 2009), and the bicyclic valencene

to nootkatone and to  $\alpha$ - $\beta$ -nootkatols (Krügener et al., 2010). The sequence homology of the enzyme, a relative of a fungal lipoxygenase, and the patterns of the oxo-functionalized products pointed to the presence of hydroperoxides as the primary products of enzyme catalysis. The present paper reports concerted thin-layer, gas and liquid chromatographic analyses of the transformation products after treating (+)-car-3-ene with the same enzyme from mycelia of *P. sapidus* (Lehnert et al., 2011).

### 4.3 Results and discussion

Homogenates of mycelium of *Pleurotus sapidus* were incubated for four hours with (+)-car-3-ene (I). Extracts were analyzed using HRGC with different injection techniques. After splitless or split injection, car-3-en-5-one (IV), car-3-en-2-one (VI), car-2-en-4-one (VIII), the corresponding *cis/trans*-alcohols (III),  $\alpha$ -phellandren-8-ol (IX) and *p*-cymen-8-ol (X) were found as products (Abbildung 29).

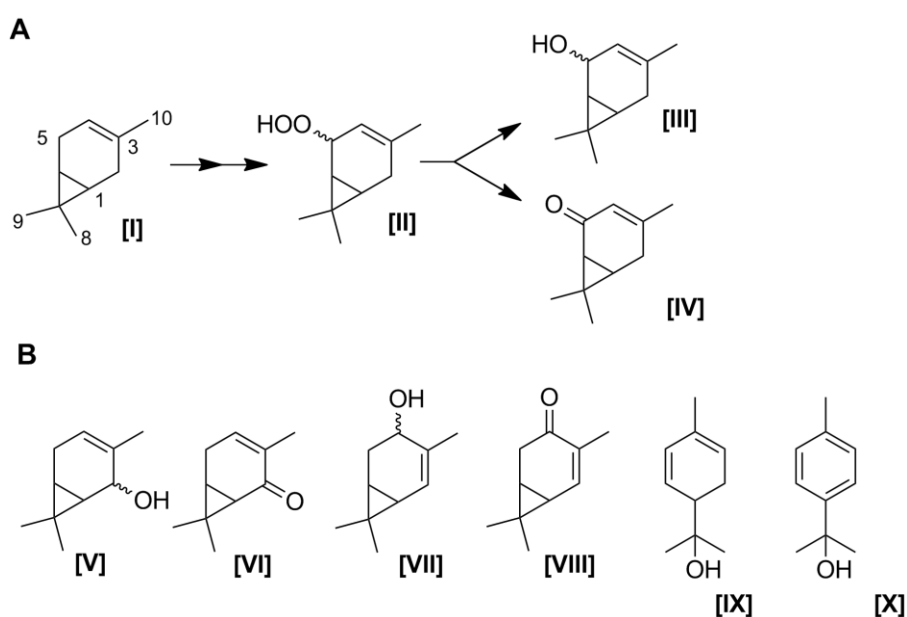
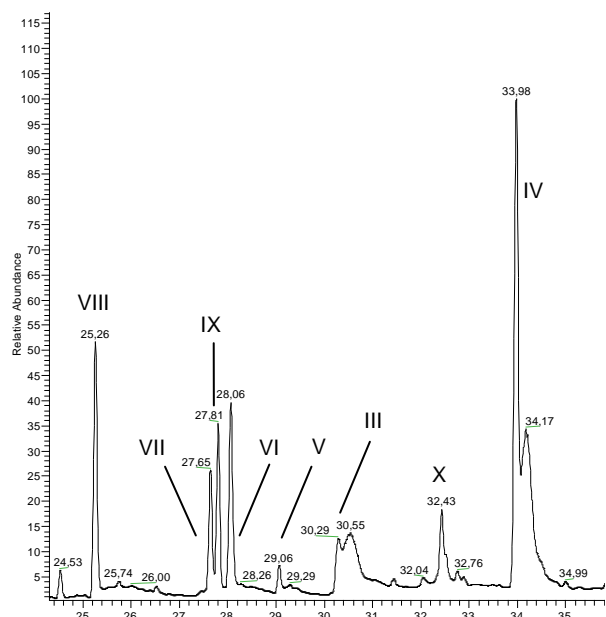


Abbildung 29 A: Formation of car-3-en-5-hydroperoxide (II) and chemical decomposition to *cis/trans*-car-3-en-5-ols (III) and car-3-en-5-one (IV) B: Further bioconversion products: *cis/trans*-car-3-en-2-ol (V), car-3-en-2-one (VI), *cis/trans*-car-2-en-4-ol (VII), car-2-en-4-one (VIII),  $\alpha$ -phellandren-8-ol (IX), *p*-cymen-8-ol (X)

No indication for the presence of hydroperoxides was found. Using cool on-column injection two tailing peaks at 30.55 min and 34.17 min were detected (Abbildung 30). Prior studies suggested the decomposition of hydroperoxides on the GC-column to the corresponding ketones and alcohols (Krings et al., 2009, Van Tilborg, 1975). When cool on-column GC-MS of a bioconversion extract was performed, traces of ions at  $m/z$  150 and 152 were monitored throughout the chromatogram indicating a continuous degradation of the non-volatile hydroperoxides with increasing column

temperature. The poor shape of the two additional tailing peaks indicated that even cool on-column gas chromatography destroyed the presumed hydroperoxides (Abbildung 30).



**Abbildung 30** HRGC-MS chromatogram after bioconversion of mycelial extract of *Pleurotus sapidus* with (+)-car-3-ene on a Factor Four VF Wax ms (Varian, USA) fused silica capillary column and cool, on-column injection

A TLC separation of bioconversion extracts, followed by a hydroperoxide sensitive Huber staining visually confirmed the presence of hydroperoxides. By staining with anisaldehyde the carenones and carenols were visualized and clearly separated from the hydroperoxide spot. The Huber positive spot was eluted from the plate, and the concentrated extract was analyzed using HPLC and HRGC-MS. Even cool, on-column GC-MS showed car-3-en-5-one (IV) and the *cis/trans*-alcohols (III) only, confirming the assumption of degradation of hydroperoxides during analysis.

Comparative analysis of bioconversion samples and of synthesized standard compounds using HPLC-DAD confirmed the presence of car-3-en-5-one (IV), car-3-en-2-one (VI), and car-2-en-4-one (VIII). Additionally, an unknown peak occurred that was accumulated in several subsequent LC runs. The sample was concentrated and re-analyzed using HRGC. After cool on-column injection, peaks with the retention times and mass spectra of car-3-en-5-one (IV) and *trans*-car-3-en-5-ol (III) appeared.

Detailed analysis of the LC-MS data confirmed the three respective carenones (according to authentic standards) and carenols (by mass spectrum, only), and also showed an unidentified compound (shoulder in the chromatogram, Abbildung 31).

After oxidation of the sample using Cu(I)Cl the unidentified peak disappeared completely and the peak of car-3-en-5-one (IV) increased by roughly the same peak area. This (a comparable response factor provided) strongly indicated that the unidentified peak represented car-3-en-5-hydroperoxide (II). The APCI<sup>+</sup>-MS of the assumed car-3-en-5-hydroperoxide (II) showed signals that matched the proposed structure: MS (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 183 [M + H<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>OH] (15), 169 [M + H<sup>+</sup>] (23), 151 [M + H<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O] (100), 152 (23), 135 (8), 109 (8), 107 (6). The [MH<sup>+</sup>] ion at  $m/z$  169 fitted the molecular mass of car-3-en-5-hydroperoxide (II) with 168 g mol<sup>-1</sup>. Signals at  $m/z$  151 and 183 indicated the [MH<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O] and the [MH<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>OH] ions.  $\alpha$ -Phellandren-8-ol (IX) was identified as the substance partly co-eluting with the car-3-en-5-hydroperoxide (II).

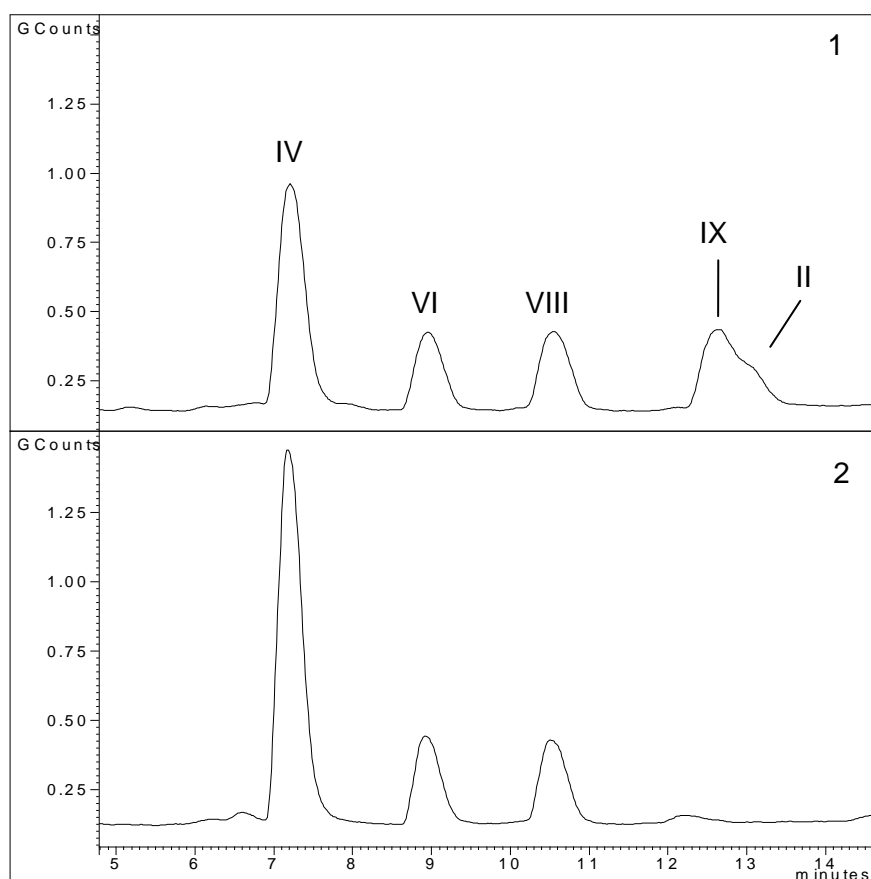


Abbildung 31 LC-MS section of a sample of the bioconversion of (+)-car-3-ene (1) and the same sample after oxidation (2) (a: Car-2-en-4-one, c:  $\alpha$ -Phellandren-8-ol, d: Car-3-en-2-one, h: Car-3-en-5-one (IV), i: Car-3-en-5-hydroperoxide (II))

The peaks of car-3-en-2-one (VI) and car-2-en-4-one (VIII) did not increase after Cu(I)Cl oxidation. Obviously, the actual concentration of the potentially formed car-2-en-4-hydroperoxide and the car-3-en-2-hydroperoxide was too low. This is explained by a lower rate of formation and/or stability compared with car-3-en-5-hydroperoxide

(II). The oxidation at C5 appears to be preferred during the bioconversion process resulting in the formation of the stereo-chemically more stable car-3-en-5-hydroperoxide (II) and its respective degradations products (Lehnert et al., 2011). The genuine concentration of car-3-en-5-hydroperoxide (II) during the bioconversion is most likely underestimated because of the continuing degradation to ketone and alcohol. A side reaction of the treatment with Cu(I)Cl was the oxidation of  $\alpha$ -phellandren-8-ol (IX) to *p*-cymen-8-ol (X) (data not shown).

In summary, TLC with hydroperoxide specific staining, HRGC, HPLC, LC-MS and the oxidation experiment proved the assumption that car-3-en-5-one (IV) and *trans*-car-3-en-5-ol (III) in bioconversion samples were formed through the intermediate hydroperoxide. Analogous hydroperoxides may be the sources of the other carenones and carenols identified, but were too unstable to be detected under the conditions used. The degradation of car-3-en-5-hydroperoxide (II) in the ion source of the mass spectrometer resulted in mixed spectra with ions at 150 *m/z* for the carenone and 152 *m/z* for the carenol. These results agree with data presented for hydroperoxides of limonene. Using chemical ionization with either isobutene (positive mode) or methane (negative mode), respectively, the molecular ion of the respective hydroperoxide was obtained for one out of six isomers only (Karlberg et al., 1994).

The incubation of dioxygenase rich mycelia of *Pleurotus sapidus* with (+)-car-3-ene (I) yielded, although in much higher quantities, a product spectrum not unlike that of autoxidation (Lehnert et al., 2011). In previous studies, the same enzymatic mechanism converted terpenes as different as limonene,  $\alpha$ -pinene, and valencene to mixtures of terpene ketone and alcohol (Krings et al., 2009, Krügener et al., 2010, Onken & Berger, 1999). As in autoxidation reactions, the key step was the dioxygenase catalyzed introduction of oxygen to form a corresponding hydroperoxide. The formation of the ketones and alcohols resulted from the chemical decomposition of hydroperoxides, and not by the direct action of Cytochrome P450s or else on the terpene substrates.

Terpene hydroperoxides may occur more frequently in microbiological samples and in autoxidized essential oils, but are not recognized due to the principal blindness of the standard analytical methods applied. The concurrent occurrence and increase upon incubation/storage of ketone/alcohol pairs may serve to signal peroxidation.



## 4.4 Experimental

### 4.4.1 Chemicals

Car-3-ene (I) (90%, Sigma Aldrich, Germany) and azeotropic *n*-pentane/diethyl ether (1:1.12) were distilled before use. All other chemicals used were analytical grade.

### 4.4.2 Preparation of car-3-en-5-hydroperoxide

Car-3-en-5-hydroperoxide (II) was obtained after the incubation of (+)-car-3-ene (I) with mycelial homogenates of *Pleurotus sapidus*, followed by extraction, drying (NaSO<sub>4</sub> sicc), and gentle concentration, as described elsewhere (Lehnert et al., 2011).

### 4.4.3 HRGC/HRGC-MS

One  $\mu\text{L}$  of each concentrated sample was injected into a Fisons GC MFC 800 equipped with both a cool on-column injector and a split/splitless port, a Factor Four VF Wax MS (Varian, USA) fused silica capillary column (30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness), hydrogen as the carrier gas (40  $\text{cm s}^{-1}$ ), and a FID (230°C) using a temperature program from 40°C (3 min) to 200°C, with a rate of 3°C  $\text{min}^{-1}$  and to 240°C with a rate of 10°C  $\text{min}^{-1}$  and held for 5 min. In the case of split injection a split ratio of 1:10 was used.

HRGC-MS analysis was carried out using the same conditions as for GC-FID analysis and helium as the carrier gas (38  $\text{cm s}^{-1}$ ). Identification of transformation products was achieved by comparison of EI MS with data from either synthesized reference compounds or literature (Wiley 08 / NIST 08, 2008; spectral libraries) using a Fisons GC 8000 gas chromatograph and a Fisons MD 800 mass selective detector (interface: 230°C, ion source: 200°C, quadrupole: 100°C, EI ionization (70 eV), scan range  $m/z$  33-300 amu).

### 4.4.4 Thin layer chromatography

TLC was carried out on silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany) with azeotropic *n*-pentane/diethyl ether (1:1.12) as the mobile phase. The TLC plates were dried and subsequently stained with either anisaldehyde or the hydroperoxide specific Huber reagent (Lehnert et al., 2011). For HRGC and for treatment with Cu(I)Cl the silica gel spots were eluted with *n*-pentane/diethyl ether (1:1.12). The dried and concentrated extracts were used.

#### 4.4.5 HPLC

Aliquots (1 mL) of the respective concentrates were evaporated to dryness and re-dissolved in MeOH: H<sub>2</sub>O (40:60 v/v). For HPLC analysis, a Kinetex 100-C18, 100 x 4.6 mm, 2.6 μm column was used. The mobile phase was MeOH (A) and water with 0.05% HCOOH (B) at a flow of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Samples were injected (5 μL) at 40% A raised to 80% A in 15 min, held for 10 min and turned back to starting conditions in 5 min. The effluent was monitored at 210 nm. LC-MS was carried out using a Varian 320-MS TQ mass spectrometer (Palo Alto, CA, USA), two high pressure gradient Varian 212-LC chromatography pumps (Palo Alto, CA, USA), a Varian 4 channel vacuum degasser (Palo Alto, CA, USA) and a Varian Pro Star UV/Vis detector (Palo Alto, CA, USA). Ion detection was achieved in the APCI (+) mode (5 μA corona current), drying gas at 172 kPa and 200°C, vaporizer gas at 82.7 kPa and 400°C, 379 kPa nebulizer gas pressure, and API housing at 65 °C. Data were recorded at 40 V capillary voltage.

#### 4.4.6 Chemical oxidation of hydroperoxides

Isolated bioconversion products were re-dissolved in pyridine and treated with Cu(I)Cl (Schulte-Elte, 1974) for 2 h. The reaction mixture was evaporated to dryness and either dissolved in *n*-pentane/diethyl ether (1:1.12) for HRGC or methanol for HPLC analysis, respectively.

### 4.5 Acknowledgement

Supported by Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (Bonn) through AIF and BMWi (AIF 299 ZN) and the BMBF Cluster Biokatalyse 2021.

## 5 Ausblick

---

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Dioxygenase aus *Pleurotus sapidus* dazu in der Lage ist, bei Monoterpenen in allylischer Position Radikale zu bilden. Im Fall des  $\alpha$ -Pinen konnten veredelte Substanzen erzeugt werden, die aufgrund ihrer höheren Wertschöpfung für die Aroma- und Lebensmittelindustrie von großem Interesse sind. Im Zuge dessen sind weiterführende Arbeiten mit weiteren Monoterpenen, aber auch höhermolekularen Terpenen vorstellbar, um Aroma- und Duftstoffe aus natürlichen Quellen bereit zu stellen.

Homologien kodierender Sequenzen deuten darauf hin, dass es sich bei der vorliegenden Dioxygenase um eine Lipxygenase handeln könnte, die die größten Übereinstimmungen (50%) mit einer Lipxygenase aus *Aspergillus fumigatus* zeigt (Fraatz et al., 2009). Da Lipxygenasen vor allem ungesättigte Fettsäuren als Substrate bevorzugen, ist ein Substratscreening für das vorliegende Enzym notwendig. Anhand des Screenings kann die Dioxygenase genauer klassifiziert bzw. charakterisiert werden.

Ausgehend von den vorliegenden Daten der Biokonversionsansätze sind für großtechnische Ansätze im Technikumsmaßstab weitere Versuche unabdingbar, die die Optimierung der Versuche im Labormaßstab als Ziel haben. Dabei sollte die Sauerstoffzufuhr während der Umsetzung soweit angepasst werden, dass eine maximale Ausbeute an oxygenierten Produkten erzielt wird. Des Weiteren sollte die Konzentration des Substrats definiert eingestellt werden. Die Konzentration an Substrat sollte so hoch sein, dass eine möglichst hohe Umsatzrate gewährleistet werden kann, jedoch nicht so hoch, dass die Dioxygenase inhibiert wird. Im Zuge dessen sollten Reaktionsprodukte kontinuierlich aus dem System (z. B. durch Festphasenextraktion) entfernt werden. Durch die Produktabtrennung *in situ* würde die Ausbeute an Produkten zusätzlich erhöht werden. Aber auch kinetische Untersuchungen zur Produktbildung sollten erfolgen, um die Reaktion zu charakterisieren und die Bedingungen der Umsetzung zu optimieren.

Für die einfache und kostengünstige Bereitstellung der Dioxygenase ist die heterologe Expression des Enzyms eine weitere Option, die eine Alternative zum

Arbeiten mit dem Pilz (Wildtyp) darstellt. Damit könnten Substrate direkt ohne Medium- und Myzelbestandteile umgesetzt werden, was eine anschließende Aufreinigung der Zielverbindungen deutlich vereinfacht. Mittels etablierter molekularbiologischer Methoden wie der gerichteten Evolution könnten die Eigenschaften des Enzyms gezielt modifiziert werden, um es dem jeweiligen Substrat und biotechnologischem Prozess anzupassen.

*Pleurotus* sp. weisen untereinander hohe Homologien der kodierenden Sequenzen auf. In weiteren Arbeiten könnte ein Genomscreening innerhalb der Pleuroten durchgeführt werden bzw. ein Screening nach konservierten Regionen. Mit Hilfe von DNA-Sonden, die für die konservierten Regionen abgeleitet werden, kann gezielt nach Dioxygenase-kodierenden Sequenzen gesucht werden, mit dem Ziel weitere Dioxygenasen zu finden, die terpenoide Verbindungen umsetzen können.

## 6 Literaturverzeichnis

---

- Acosta, M., Mazas, N., Mejias, E., Pino, J. (1996) Obtencion de aromatizantes mediante biotransformacion del limoneno. *Alimentaria* 272:73-75
- Allain, E. J., Hager, L. P., Deng, L., Jacobsen, E. N. (1993) Highly enantioselective epoxidation of disubstituted alkenes with hydrogen-peroxide catalyzed by chloroperoxidase. *Journal of the American Chemical Society* 115:4415-4416
- Allenmark, S. G., Andersson, M. A. (1996) Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric synthesis of series of aromatic cyclic sulfoxides. *Tetrahedron: Asymmetry* 7:1089-1094
- Ancel, J. E., Maksimchuk, N. V., Simakova, I. L., Semikolenov, V. A. (2004) Kinetic peculiarities of  $\alpha$ -pinene oxidation by molecular oxygen. *Applied Catalysis A: General* 272:109-114
- Andersson, M., Willetts, A., Allenmark, S. (1997) Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium-containing bromoperoxidase. *Journal of Organic Chemistry* 62:8455-8458
- Antranikian, G., Heiden, S. (2006) White biotechnology: status quo and future. *Nachrichten aus der Chemie* 54:1202-1206
- Auldridge, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D. R., Klee, H. J. (2006) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *The Plant Journal* 45:982-993
- Auldridge, M. E., McCarty, D. R., Klee, H. J. (2006) Plant carotenoid oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology* 9:315-321
- Baldermann, S., Kato, M., Kurosawa, M., Kurobayashi, Y., Fujita, A., Fleischmann, P., Watanabe, N. (2010) Functional characterization of a carotenoid cleavage

- dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour. *Journal of Experimental Botany* 61:2967-2977
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2008) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (6.), Berlin Heidelberg, Springer-Verlag
- Bell, S. G., Dale, A., Rees, N. H., Wong, L.-L. (2010) A cytochrome P450 class I electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:163-175
- Bell, S. G., Sowden, R. J., Wong, L.-L. (2001) Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450cam for monoterpene oxidation. *Chemical Communications* 7:635 - 636
- Bhattacharyya, P. K., Prema, B. R., Kulkarni, B. D., Pradhan, S. K. (1960) Microbiological transformation of terpenes: Hydroxylation of  $\alpha$ -pinene. *Nature* 187:689-690
- Bicas, J. L., Fontanille, P., Pastore, G. M., Larroche, C. (2008) Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of Applied Microbiology* 105:1991-2001
- Bisakowski, B., Perraud, X., Kermasha, S. (1997) Characterization of hydroperoxides and carbonyl compounds obtained by lipoxygenase extracts of selected microorganisms. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 61:1262-1269
- Bohlmann J, K. C. (2008) Terpenoid biomaterials. *Plant Journal* 54:656-669
- Bouws, H. W., A.; Zorn, H. (2008) Fungal secretomes - nature's toolbox for white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80:381-388
- Boyd, D. R., Sharma, N. D., Boyle, R., McMurry, B. T., Evans, T. A., Malone, F. J., Dalton, H., Chima, J., Sheldrake, G. N. (1993) Biotransformation of

- unsaturated heterocyclic rings by *Pseudomonas putida* to yield *cis*-diols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 49-51
- Branca, Q., Fischli, A. (1977) Eine chirale ökonomische Totalsynthese von (*R*)- und (*S*)-Muskon via Epoxysulfoncylofragmentierung. *Helvetica Chimica Acta* 60:925-944
- Brandi, F., Bar, E., Mourgues, F., Horvath, G., Turcsi, E., Giuliano, G., Liverani, A., Tartarini, S., Lewinsohn, E., Rosati, C. (2011) Study of 'Redhaven' peach and its white-fleshed mutant suggests a key role of CCD4 carotenoid dioxygenase in carotenoid and norisoprenoid volatile metabolism. *BMC Plant Biology* 11:24
- Brauer, B. (2004) Biotechnologische Veredelung von terpenhaltigen Reststofffraktionen der citrusverarbeitenden Industrie zu hochwertigen natürlichen Duft- und Aromastoffen. Leibniz Universität Hannover, Dissertation
- Breitmaier, E. (2006) *Terpene - Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone* (2nd), Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
- Brenna, E., Fuganti, C., Serra, S., Kraft, P. (2002) Optically active ionones and derivatives: Preparation and olfactory properties. *European Journal of Organic Chemistry* 967–978
- Bugg, T. D. H., Ramaswamy, S. (2008) Non-heme iron-dependent dioxygenases: unravelling catalytic mechanisms for complex enzymatic oxidations. *Current Opinion in Chemical Biology* 12:134-140
- Bühler, B. A. (2003) Specific Oxyfunctionalization of Pseudocumene by multistep biocatalysis - mechanism and scale up. Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Dissertation
- Burton, S. G. (2003) Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology* 21:543-549

- Celik, A., Flitsch, S. L., Turner, N. J. (2005) Efficient terpene hydroxylation catalysts based upon P450 enzymes derived from actinomycetes. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3:2930–2934
- Chapman, P. J., Meerman, G., Gunsalus, I. C. (1965) The microbiological transformation of fenchone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 20:104
- Chidambaram, N., Chandrasekaran, S. (1987) *tert*-Butyl hydroperoxide-pyridinium dichromate: a convenient reagent system for allylic and benzylic oxidations. *The Journal of Organic Chemistry* 52:5048-5051
- Chiron, F., Chalchat, J. C., Garry, R. P., Pilichowski, J. F., Lacoste, J. (1997) Photochemical hydroperoxidation of terpenes I. Synthesis and characterization of  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene and limonene hydroperoxides. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 111:75-86
- Colonna, S., Gaggero, N., Carrea, G., Pasta, P. (1997) A new enzymatic enantioselective synthesis of dialkyl sulfoxides catalysed by monooxygenases. *Chemical Communications* 5:439-440
- Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G., Pasta, P. (1992) Chloroperoxidase and hydrogen-peroxide-an efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidations. *Tetrahedron: Asymmetry* 3:95-106
- Criegee, R. (1948) Die Umlagerung der Dekalin-peroxydester als Folge von kationischem Sauerstoff. *Liebigs Annalen der Chemie* 560:127
- Davies, A. G., Davison, I. G. E. (1989) The rearrangements of allylic hydroperoxides derived from (+)-valencene. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II* 825-830
- de Kraker, J.-W., Schurink, M., Franssen, M. C. R., König, W. A., de Groot, A., Bouwmeester, H. J. (2003) Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Tetrahedron* 59:409-418



- Dexter, A. F., Lakner, F. J., Campbell, R. A., Hager, L. P. (1995) Highly enantioselective epoxidation of 1,1-disubstituted alkenes catalyzed by chloroperoxidase. *Journal of the American Chemical Society* 117:6412-6413
- Doig, S. D., O'Sullivan, L. M., Patel, S., Ward, J. M., Woodley, J. M. (2001) Large scale of hyclohexanone monooxygenase from *Escherichia coli* TOP10 pQR239. *Enzyme and Microbial Technology* 28:265-274
- Encinar, J. M., Beltrán, F. J., Frades, J. M. (1994) Liquid phase oxidation of  $\alpha$ -pinene. Influence of sodium hydroxide as additive. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 61:359-365
- Eschenmoser, W., Uevelhart, P., Eugster, C. H. (1981) Synthesis and structure of the enantiomeric 6-hydroxy- $\alpha$ -ionone and *cis*- and *trans*-5, 6-dihydroxy-5, 6-dihydro- $\beta$ -ionone. *Helvetica Chimica Acta* 64:2681–2690
- Faber, K. (2011) *Biotransformations in organic chemistry* (6th), Berlin, Heidelberg, New York, Springer
- Fang, J.-M., Lin, C.-H., Bradshaw, C. W., Wong, C.-H. (1995) Enzymes in organic synthesis: oxidoreductions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* 967-978
- Faraldos, J. A., Kariuki, B. M., Coates, R. M. (2011) 2-Azapinanes: aza analogues of the enantiomeric pinyl carbocation intermediates in pinene biosynthesis. *Organic Letters* 13:836-839
- Fraatz, M. A., Riemer, S. J. L., Stöber, R., Kaspera, R., Nimtz, M., Berger, R. G., Zorn, H. (2009) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61:202-207
- Freeman, A., Woodley, J. M., Lilly, M. D. (1993) In situ product removal as a tool for bioprocessing. *Biology* 11:1007-1012

- Fried, J. T., R. W.; Kinsberg, A. (1953) Oxidation of steroids by microorganisms. III Side chain degradation, ring D-gleavage and dehydrogenation in ring A. *Journal of the American Chemical Society* 75:5764
- Fu, H., Newcomb, M., Wong, C.-H. (1991) *Pseudomonas oleovorans* monooxygenase-catalyzed asymmetric epoxidation of allyl alcohol derivatives and hydroxylation of a hypersensitive radical probe with the radical ring-opening rate exceeding the oxygen-rebound rate. *Journal of the American Chemical Society* 113:5878
- Gershenzon, J., Croteau, R. (1991) *Terpenoids, Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites, Vol. 1: The Chemical Participants* (2nd), San Diego, Academic Press
- Hager, L. P., Lakner, F. J., Basavapathruni, A. (1998) Chiral synthons via chloroperoxidase catalysis. *Journal of Molecular Catalysis B* 5:95-101
- Harayama, S., Kok, M., Neidle, E. L. (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology* 46:565-601
- Harayama, S., Rekik, M. (1989) Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry* 264:15328-15333
- Hirata, T., Ikeda, Y., Izumi, S., Shimoda, K., Hamada, H., Kawamura, T. (1994) Introduction of oxygenated functional groups into 3-carene and 2-pinene by cultured cells. *Phytochemistry* 37:401-3
- Holland, H. L. (1999) C-H activation. *Current Opinion in Chemical Biology* 3:22-27
- Holland, H. L., Carter, I. M. (1983) An investigation of the biotransformation of organic selenides by fungi. *Bioorganic Chemistry* 12:
- Hu, S., Dordick, J. S. (2002) Highly enantioselective oxidation of ciscyclopropylmethanols to corresponding aldehydes catalyzed by chloroperoxidase. *Journal of Organic Chemistry* 67:314-317

- Huber, W., Fröhlke, E. (1972) Ein neues Sprühreagens zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Peroxiden. *Chromatographia* 5:256-257
- Hudlicky, T., Luna, H., Barbieri, G., Kwart, L. D. (1988) Enantioselective synthesis through microbial oxidation of arenes. 1. Efficient preparation of terpene and prostanoid synthons. *Journal of the American Chemical Society* 110:4735-4741
- Hunt, D. W. A., Borden, J. H., Lindgren, B. S., Gries, G. (1989) The role of autoxidation of  $\alpha$ -pinene in the production of pheromones of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Canadian Journal of Forest Research* 19:1275-1282
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger, Y., Hirschberg, J., Schaffer, A. A., Katzir, N., Tadmor, Y., Lewinsohn, E. (2006) Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* 67:1579-1589
- Jacobsen, E. N. (1993) *Catalytic Asymmetric Synthesis* (1st ed.), New York, VCH
- Jakoby, W. B., Ziegler, D. M. (1990) The enzymes of detoxication. *Journal of Biological Chemistry* 265:20715-20718
- Johansson, S. G. H., Emilsson, K., Grøtli, M., Börje, A. (2009) Structural influence on radical formation and sensitizing capacity of alkylic limonene hydroperoxide analogues in allergic contact dermatitis. *Chemical Research in Toxicology* 23:677-688
- Johnson, R. A., Sharpless, K. B. (1986) *Catalytic Asymmetric Synthesis* (1st ed.), New York, VC
- Kaefer, C. M., Milner, J. A. (2008) The role of herbs and spices in cancer prevention. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 19:347-361

- Karlberg, A. T., Shao, L. P., Nilsson, U., Gäfvert, E., Nilsson, J. L. G. (1994) Hydroperoxides in oxidized  $\alpha$ -limonene identified as potent contact allergens. *Archives of Dermatological Research* 286:97-103
- Kaspera, R. (2004) Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse. Leibniz Universität Hannover, Dissertation
- Kaspera, R., Krings, U., Nanzad, T., Berger, R. G. (2005) Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:477-483
- Kaspera, R., Krings, U., Pescheck, M., Sell, D., Schrader, J., Berger, R. G. (2005) Regio- and stereoselective fungal oxyfunctionalisation of limonenes. *Zeitschrift Naturforschung* 60c:459 - 466
- Kastner, U., Breuer, J., Glasl, S., Baumann, A., Robien, W., Jurenitsch, J., Rücker, G., Kubelka, W. (1995) Guaianolide-endoperoxide and monoterpene-hydroperoxides from *Achillea nobilis*. *Planta Medica* 61:83 - 85
- Khatri, Y., Girhard, M., Romankiewicz, A., Ringle, M., Hannemann, F., Urlacher, V., Hutter, M., Bernhardt, R. (2010) Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88:485-495
- Klibanov, A. M. (1990) Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts of Chemical Research* 23:114
- Kolehmainen, E., Laihia, K., Heinanen, M., Rissanen, K., Frohlich, R., Korvola, J., Manttari, P., Kauppinen, R. (1993) Oxygen-Containing Bicyclic Monoterpenes.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{17}\text{O}$  NMR Spectroscopic and X-Ray-Diffraction Studies of 7 Oxidation-Products of (+)-3-Carene. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions II* 641-648

- Krings, U., Berger, R. G. (2010) Terpene bioconversion – how does its future look? *Natural Product Communications* 5:1507 - 1522
- Krings, U., Brauer, B., Kaspera, R. d., Berger, R. G. (2005) Biotransformation of  $\beta$ -terpinene using *Stemphylium botryosum* (Wallroth) yields p-mentha-1,4-dien-9-ol, a novel odorous monoterpenol. *Biocatalysis and Biotransformation* 23:457-463
- Krings, U., Lehnert, N., Fraatz, M. A., Hardebusch, B., Zorn, H., Berger, R. G. (2009) Autoxidation versus biotransformation of  $\alpha$ -pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*: regioselective hydroperoxidation of  $\alpha$ -pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:9944-9950
- Krügenger, S., Krings, U., Zorn, H., Berger, R. G. (2010) A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. *Bioresource Technology* 101:457-462
- Krügenger, S., Schaper, C., Krings, U., Berger, R. G. (2009) *Pleurotus* species convert monoterpenes to furanoterpenoids through 1,4-endoperoxides. *Bioresource Technology* 100:2855-2860
- Kuhn, A., Fischer, P. (2009) Absolute Asymmetric Reduction Based on the Relative Orientation of Achiral Reactants. *Angewandte Chemie International Edition* 48:6857-6860
- Kühn, H., Schewe, T., Rapoport, S. M. (1986) The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 58:273-311
- Kuriata, R., Gajcy, K., Turowska-Tyrk, I., Lochynski, S. (2010) Stereochemistry of terpene derivatives. Part 6: Chemoenzymatic synthesis of chiral bicyclo[3.1.0]hexane derivatives with olfactory properties. *Tetrahedron: Asymmetry* 21:805-809

- Kuznetsova, N. I., Kuznetsova, L. I., Kirillova, N. V., Detusheva, L. G., Likholobov, V. A., Khramov, M. I., Ansel, J. E. (2005) Oxidation of hydrocarbons with dioxygen via peroxide intermediates. *Kinetics and Catalysis* 46:204-216
- Lajunen, M., Koskinen, A. M. P. (1994) Co(II)-catalysed allylic oxidation of  $\alpha$ -pinene by molecular oxygen; synthesis of verbenone. *Tetrahedron Letters* 35:4461-4464
- Lajunen, M. K. (2001) Co(II) catalysed oxidation of  $\alpha$ -pinene by molecular oxygen: Part III. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 169:33-40
- Lakshman, M. K., Chaturvedi, S., Zaijc, B., Gibson, D. T., Resnick, S. M. (1998) A general chemoenzymatic synthesis of enantiopure *cis*  $\beta$ -amino alcohols from microbially derived *cis*-glycols. *Synthesis* 1352-1356
- Leak, D. J., Sheldon, R. A., Woodley, J. M., Adlercreutz, P. (2009) Biocatalysts for selective introduction of oxygen. *Biocatalysis and Biotransformation* 27:1-26
- Lee, B. H., Kornis, G. I., Ciadella, J. I., Clothier, M. F., Marshall, V. P., Martin, D. G., McNally, P. L., Mizesak, S. A., Whaley, H. A., Wiley, V. H. (1997) Microbail hydroxylation at eight individual carbon atoms of marcfortine A. *Journal of Natural Products* 60:1139-1142
- Lehnert, N., Krings, U., Sydes, D., Wittig, M., Berger, R. G. (2011) Bioconversion of car-3-ene by a dioxygenase of *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology* In Press, Corrected Proof:doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.007
- Limberger, R. P., Aleixo, A. M., Fett-Neto, A. G., Henriques, A. T. (2007) Bioconversion of (+)- and (-)- $\alpha$ -pinene to (+)- and (-)-verbenone by plant cell cultures of *Psychotria brachyceras* and *Rauvolfia sellowii*. *Electronic Journal of Biotechnology* 10:500 - 507
- Liu, W. G., Goswami, A., Steffek, R. P., Chapman, R. L., Sariaslani, F. S., Steffens, J. J., Rosazza, J. P. N. (1988) Stereochemistry of microbiological hydroxylations of 1,4-cineole. *The Journal of Organic Chemistry* 53:5700-5704

- Luckner, M. (1990) *Secondary metabolism in plants and animals* Jena, VEB Gustav Fischer Verlag
- Lutz-Wahl, S. (1999) Selektive Hydroxylierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon durch *Streptomyces* Stämme und molekulargenetische Arbeiten zur Identifizierung und Isolierung der Ionon Hydroxylase aus *Streptomyces fradiae* Tü 27. Universität Stuttgart, Dissertation
- Lye, G. J., Woodley, J. M. (1999) Application of in situ product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends in Biotechnology* 17:395-402
- Maas, D. D., Blagg, M., Wiemer, D. F. (1984) Synthesis and reactions of (-) and (+)-carenonones. *The Journal of Organic Chemistry* 49:853-6
- Macaev, F. Z., Malkov, A. V. (2006) Use of monoterpenes, 3-carene, and 2-carene, as synthons in the stereoselective synthesis of 2,2-dimethyl-1,3-disubstituted cyclopropanes. *Tetrahedron* 62:9-29
- McGraw, G. W., Hemingway, R. W., Ingram, L. L., Jr., Canady, C. S., McGraw, W. B. (1999) Thermal Degradation of Terpenes: Camphene,  $\Delta^3$ -Carene, Limonene, and  $\alpha$ -Terpinene. *Environmental Science & Technology* 33:4029-4033
- Menini, L., Pereira, M. C., Parreira, L. A., Fabris, J. D., Gusevskaya, E. V. (2008) Cobalt- and manganese-substituted ferrites as efficient single-site heterogeneous catalysts for aerobic oxidation of monoterpene alkenes under solvent-free conditions. *Journal of Catalysis* 254:355-364
- Miller, V. P., Tschirretguth, R. A., Demontellano, P. R. O. (1995) Chloroperoxidase-catalyzed benzylic hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 319:333-340
- Miyazawa, M., Kano, H. (2010) Regio- and Stereoselective Oxidation of (+)- $\Delta^3$ -3-Carene by the Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:3855-3858

- Moore, R. N., Golumbic, C., Fisher, G. S. (1956) Autoxidation of  $\alpha$ -Pinene. *Journal of the American Chemical Society* 78:1173-1176
- Moreira, M. A., Nascimento, M. G. (2007) Chemo-enzymatic epoxidation of (+)-3-carene. *Catalysis Communications* 8:2043-2047
- Mueller, M., Dirlam, K., Wenk, H. H., Berger, R. G., Krings, U., Kaspera, R. (2005) Fungal biotransformation of terpenes. International Patent. WO 20050781 10
- Newman, L. M., Garcia, H., Hudlicky, T., Selifonov, S. A. (2004) Directed evolution of the dioxygenase complex for the synthesis of furanone flavor compounds. *Tetrahedron* 60:729-734
- Nilsson, J., Carlberg, J., Abrahamsson, P., Hulthe, G., Persson, B. A., Karlberg, A. T. (2008) Evaluation of ionization techniques for mass spectrometric detection of contact allergenic hydroperoxides formed by autoxidation of fragrance terpenes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22:3593-3598
- Nöthe, C., Hartmans, S. (1994) Formation and degradation of styrene oxide stereoisomers by different microorganisms. *Biocatalysis* 10:219-225
- Ohashi, T., Hasegawa, J. (1992) *New preparative methods for optically active  $\beta$ -hydroxycarboxylic acids*. In: *Chirality in Industry* New York, Wiley
- Ohloff, G. (1994) *Scent and Fragrances, the Fascination of Odors and their Chemical Perspective* Springer-Verlag
- Ohta, H., Okamoto, Y., Tsuchihashi, G. (1985) Oxidation of allylic sulfides with *Corynebacterium equi*. *Agricultural and Biological Chemistry* 49:2229-2231
- Okito, K., Sakaida, I., Hino, K. (2002) Current Strategies for chemoprevention of hepatocellular carcinoma *Oncology* 62:24-28
- Omura, T. (1999) Forty Years of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266:690-698



- Onken, J., Berger, R. G. (1999) Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of Biotechnology* 69:163-168
- Panke, S., Meyer, A., Huber, C. M., Witholt, B., Wubbolts, M. G. (1999) An alkane responsive expression system for the production of fine chemicals. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2324-2332
- Panke, S., Witholt, B., Schmid, A., Wubbolts, M. G. (1998) Towards a biocatalyst for (S)-styrene oxide production: characterization of the styrene degradation pathway of *Pseudomonas* sp. strain VLB120. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2032-2043
- Panke, S., Wubbolts, M. G., Schmid, A., Witholt, B. (2000) Production of enantiopure styrene oxide by recombinant *Escherichia coli* synthesizing a two-component styrene monooxygenase. *Biotechnology and Bioengineering* 69:91-100
- Pattabhiraman, S. (2003) Transcriptional regulation of 12/15-lipoxygenase expression and the implication of the enzyme in hepoxilin biosynthesis and apoptosis Medizinische Fakultät der Charité Berlin, Dissertation
- Pattekhani, H. H., Varadaraj, M. C., Keshava, N., Divakar, S. (1997) Influence of  $\beta$ -cyclodextrin in bio-transformation of (+)-3-carene by cell suspension cultures of *Acetobacter acetii*. *Biotechnology Techniques* 11:379-383
- Peterson, D. H., Eppstein, S. H., Meister, P. D., Murray, H. C., Leigh, H. M., Weintraub, A., Reineke, L. M. (1953) Microbial transformations of steroids. IX. Degradation of C<sub>21</sub> steroids to C<sub>19</sub> ketones and to testololactone. *Journal of the American Chemical Society* 75:5768
- Pinheiro, L., Marsaioli, A. J. (2007) Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44:78-86
- Ponce, M. A., Ramirez, J. A., Galagovsky, L. R., Gros, E. G., Erra-Balsells, R. (2000) Singlet-oxygen ene reaction with 3 $\beta$ -substituted stigmastanes. An alternative

- pathway for the classical Schenck rearrangement. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 2351-2358
- Porta, H., Rocha-Sosa, M. (2001) Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology* 147:3199-3200
- Prema, B. R., Bhattacharyya, P. K. (1962) Microbiological transformation of terpenes II: Transformations of  $\alpha$ -pinene. *Applied Microbiology* 10:524-528
- Prema, B. R., Bhattacharyya, P. K. (1962) Microbiological transformation of terpenes, III. Transformation of some mono- and sesquiterpenes. *Applied Microbiology* 10:529 - 531
- Roberts, S. M., Wan, P. W. H. (1998) Enzyme-catalysed Baeyer-Villiger oxidations. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4:111-136
- Robinson, G. K., Stephens, G. M., Dalton, H., Geary, P. J. (1992) The production of catechols from benzene and toluene by *Pseudomonas putida* in glucose fed-batch culture. *Biocatalysis* 6:81-100
- Rosazza, J. P. N., Steffens, J. J., Sariaslani, S., Goswami, A., Beale, J. M., Reeg, S., Chapman, R. (1987) Microbial hydroxylation of 1,4-cineole. *Applied and Environmental Microbiology* 53:2482-2486
- Rothenberg, G., Yatziv, Y., Sasson, Y. (1998) Comparative autoxidation of 3-carene and  $\alpha$ -pinene: Factors governing regioselective hydrogen abstraction reactions. *Tetrahedron* 54:593-598
- Samra, B. K., Andersson, M., Adlercreutz, P. (1999) Chloroperoxidase catalysed oxidation of benzyl alcohol using tert-butyl hydroperoxide oxidant in organic media. *Biocatalysis and Biotransformation* 17:381-391
- Savage, T. J., Croteau, R. (1993) Biosynthesis of monoterpenes: regio- and stereochemistry of (+)-3-carene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 305:581-587

- Sawada, S., Kulprecha, S., Nilubol, N., Yoshida, T., Kinoshita, S., Taguchi, H. (1982) Microbial production of ursodeoxycholic acid from lithocholic acid by *Fusarium equiseti* M41. *Applied and Environmental Microbiology* 44:1249-1252
- Scheibner, M., Hülsdau, B., Zelena, K., Nimtz, M., de Boer, L., Berger, R., Zorn, H. (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade  $\beta$ -carotene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77:1241-1250
- Schenck, G. O., Neumüller, O. A., Eisfeld, W. (1958) Neuartige Allyl-Umlagerung von Steroid-Hydroperoxyden. Zur photosensibilisierten Autoxydation der Steroide, II. *Angewandte Chemie* 70:595-595
- Schenck, G. O., Neumüller, O. A., Eisfeld, W. (1958) Zur photosensibilisierten Autoxydation der Steroide:  $\Delta^5$ -Steroid-7- $\alpha$ -Hydroperoxyde und -7-ketone durch Allylumlagerung von  $\Delta^6$ -steroid-5- $\alpha$ -hydroperoxyden. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 618:202-210
- Schieberle, P., Maier, W., Firl, J., Grosch, W. (1987) HRGC separation of hydroperoxides formed during the photosensitized oxidation of (R)-(+)-Limonene. *Journal of High Resolution Chromatography* 10:588-593
- Schindler, S. (2011) Aromastoffprofile und Lagerstabilität technologisch modifizierter Lebensmittel. Leibniz Universität Hannover, Dissertation
- Schindler, S., Wittig, M., Zelena, K., Krings, U., Bez, J., Eisner, P., Berger, R. G. (2011) Lactic fermentation to improve the aroma of protein isolates of sweet lupin (*Lupinus angustifolius*). *Food Chemistry in press*:
- Schneider, C., Pratt, D. A., Porter, N. A., Brash, A. R. (2007) Control of Oxygenation in Lipoxygenase and Cyclooxygenase Catalysis. *Chemistry & Biology* 14:473-488
- Schrader, J. (2007) *Microbial flavour production in Flavours and Fragrances* Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag

- Schrader, J., Kaup, B.-A. (2007) Transformation of terpenes using *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase. International Patent. DE102006010910B3
- Schulte-Elte, K.-H., Fracheboud, M.G., Ohloff, G. (1974) Procédé pour la préparation d'une cétone bicyclique. International Patent. CH 541533
- Sejbold, S. J., Bohlmann, J., Raffa, K. F. (2000) Biosynthesis of coniferophagous bark beetle pheromones and conifer isoprenoids: Evolutionary perspective and synthesis. *Canadian Entomology* 132:705-715
- Shaw, R. (1966) Microbiological oxidation of cyclic ketones. *Nature* 209:1369
- Sijbesma, F., Schepens, H. (2003) White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future. 2003:
- Silverman, R. B. (2000) *The organic chemistry of enzyme-catalysed reactions* Academic Press
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Aldridge, M., Taylor, M. G., Klee, H. J. (2004) The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal* 40:882-892
- Simkin, A. J., Underwood, B. A., Aldridge, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. G., Klee, H. J. (2004) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiology* 136:3504-3514
- Sowden, R. J., Yasmin, S., Rees, N. H., Bell, S. G., Wong, L.-L. (2005) Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450cam and P450BM-3. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3:57-64
- Stewart, J. D., Reed, K. W., Kayser, M. M. (1996) 'Designer yeast': A new reagent for enantioselective Baeyer-Villiger oxidations. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* 8:755-757

- Stewart, J. D., Reed, K. W., Martinez, C. A., Zhu, J., Chen, G., Kayser, M. M. (1998) Rekombinant baker's yeast as a whole cell catalyst for asymmetric Baeyer-Villiger oxidations. *Journal of the American Chemical Society* 120:3541-3548
- Straathof, A., Panke, S., Schmid, A. (2002) The production of fine chemicals by biotransformations *Current Opinion in Biotechnology* 13 548-556
- Stumpf, B., Wray, V., Kieslich, K. (1990) Oxidation of carenes to chaminic acids by *Mycobacterium smegmatis* DSM 43061. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33:251-4
- Su, C., Oliw, E. H. (1998) Manganese lipooxygenase. Purification and characterization. *Journal of Biological Chemistry* 273:13072-13079
- Suske, W. A., Held, M., Schmid, A., Fleischmann, T., Wubbolts, M. G., Kohler, H.-P. E. (1997) Purification and Characterization of 2-Hydroxybiphenyl 3-Monooxygenase, a Novel NADH-dependent, FAD-containing Aromatic Hydroxylase from *Pseudomonas azelaica* HBP1. *Journal of Biological Chemistry* 272:24257-24265
- Tan, Q., Day, D. F. (1998) Organic co-solvent effects on the bioconversion of (R)-(+)-limonene to  $\alpha$ -terpineol. *Process Biochemistry* 33:29-37
- Thorell, H., Holmann, R. T., Akeson, A. (1947) Crystalline Lipoxidase. *Acta Chemica Scandinavica* 1:571-576
- Ulber, R., Sell, D. (2007) *White Biotechnology* Berlin Heidelberg, Springer-Verlag
- Urlacher, V. B., Makhsumkhanov, A., Schmid Rolf, D. (2006) Biotransformation of  $\beta$ -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70:53-59
- van den Dool, H., Kratz, P. D. (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* 11:463-471

- van der Heide, R. F. (1966) Reagents for the detection of antioxidants on thin layers of silica. *Journal of Chromatography A* 24:239-243
- van Deurzen, M. P. J., Remkes, I. J., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (1997) Chloroperoxidase catalyzed oxidations in t-butyl alcohol/water mixtures. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemistry* 117:329-337
- van Deurzen, M. P. J., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A. (1997) Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of 5-(hydroxymethyl)furfural. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 16:299-309
- van Tilborg, W. J. M. (1975) Qualitative and quantitative determination of hydroperoxides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 115:616-620
- Voser, W. (1982) Isolation of hydrophilic fermentation products by adsorption chromatography. *Journal of Chemical and Technical Biotechnology* 32:109-118
- Wackett, L. P. (2002) Mechanism and applications of Rieske non-heme iron dioxxygenases. *Enzyme and Microbial Technology* 31:577-587
- Walton, A. Z., Stewart, J. D. (2002) An efficient enzymatic Baeyer-Villiger oxidation by engineered *Escherichia coli* cells under non growing conditions. *Biotechnology Progress* 18:262-268
- Walton, A. Z., Stewart, J. D. (2004) Understanding and improving NADPH-dependent reactions by nongrowing *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Progress* 20:403-411
- Warscheid, B., Hoffmann, T. (2001) Structural elucidation of monoterpene oxidation products by ion trap fragmentation using on-line atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry in the negative ion mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15:2259-2272

- Westendorf, A. (2005) Enantioselektive Verwertung von Phenoxyalkanoat-Herbiziden durch Bakterien – Eine Charakterisierung der Dioxygenasen des initialen Abbau-Schrittes. Universität Leipzig, Dissertation
- Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., McRee, D. E. (2000) Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular Cell* 5:121-131
- Zaks, A., Dodds, D. R. (1995) Chloroperoxidase-catalyzed asymmetric oxidations - substrate-specificity and mechanistic study. *Journal of the American Chemical Society* 117:10419-10424
- Zehentgruber, D. (2009) Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Düsseldorf, Dissertation
- Zelena, K., Hardebusch, B., Hülsdau, B., Berger, R. G., Zorn, H. (2009) Generation of norisoprenoid flavors from carotenoids by fungal peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:9951-9955
- Zhu, B. C., Henderson, G., Sauer, A. M., Yu, Y., Crowe, W., Laine, R. A. (2003) Structureactivity of valencenoid derivatives and their repellence to the Formosan subterranean termite. *Journal of Chemical Ecology* 29:2695-2701
- Zorn, H., Fraatz, M. A., Riemer, S. J. L., Takenberg, M., Krings, U., Berger, R. G., Marx, S. (2009) Enzymatic synthesis of nootkatone by oxidation of valencene. International Patent. WO 2010060898 A1 20100603
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., Berger, R. G. (2003) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta,\beta$ -carotene to flavor compounds. *Biological Chemistry* 384:1049-1056

## 7 Lebenslauf

---

### PERSÖNLICHE ANGABEN

Name, Vorname                   Lehnert, Nicole  
Geburtsdatum, -ort            05.05.1983, Stendal

### SCHULE

09/1993 - 06/2002            Gymnasium Martineum in Halberstadt, Sachsen-Anhalt  
Abschluss: Abitur (*sehr gut*)

### STUDIUM

10/2002 – 09/2004            Grundstudium (1. Prüfungsabschnitt) der Lebensmittel-  
chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
Fachbereich Chemie

10/2004 – 04/2007            Hauptstudium (2. Prüfungsabschnitt) der Lebensmittel-  
chemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
Fachbereich Chemie

Thema der Diplomarbeit: *„Isolierung und  
Strukturaufklärung phenolischer Inhaltsstoffe aus den  
Stängeln und Blättern von Rhabarber“*

Abschluss: Diplom/1. Staatsexamen (*sehr gut*)

### Studienbegleitende Tätigkeiten

07/2005 – 09/2005            Isolierung von Salicylaten aus der Sauerkirsche und  
chromatographische Untersuchungen zum Verhalten von  
Salicylsäure an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg



### BERUFSPRAKTISCHE AUSBILDUNG

05/2007 – 04/2008      Berufspraktikum (3. Prüfungsabschnitt) am Landesamt für  
Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt in Halle/Saale

Abschluss: 2. Staatsexamen (*gut*)

### PROMOTION

06/2008 – 12/2011      Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für  
Lebensmittelchemie bei Prof. Dr. Dr. Berger, Leibniz  
Universität Hannover