

Synthese von Wirkstoffen für Lebensmittel durch degradative Enzyme aus Basidiomycota

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Thorben Günther, M. Sc.

2021

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf G. Berger

Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 19.04.2021

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die Möglichkeit der Promotion im Institut für Lebensmittelchemie unter optimalen Bedingungen und einem Thema, in dem ich mich frei entfalten konnte. Zudem danke ich Herrn Berger für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die sich in anregenden und konstruktiven Diskussionen äußerte. Außerdem bedanke ich mich für die Ermöglichung der Förderung über das Projekt „Rauchenzym“ (Bundesministerium für Bildung und Forschung, 031B0586).

Zudem bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Ursula Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für die freundliche Übernahme des Korreferates sowie bei Herrn Prof. Dr. Andreas Hahn (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Zudem gilt mein Dank Herrn PD Dr. Ulrich Krings für die hilfreichen Ratschläge in sämtlichen analytischen Fragen.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. Franziska Ersoy danken, die mir in proteinchemischen und molekularbiologischen Fragen mit ihrem Rat zur Seite stand.

Frau Dr. Annabel Nieter und Frau Dr. Diana Linke danke ich für die Betreuung in den ersten Monaten der Arbeit.

Ich danke außerdem sämtlichen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie, die mich durch die Zeit der Promotion begleiteten und die durch unzählige dienstliche und private Gespräche maßgeblich zu der äußerst angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die Unterstützung in allen privaten Höhen und Tiefen.

Zusammenfassung

Mit zunehmender Industrialisierung der Lebensmittelproduktion werden Produkten vermehrt Wirkstoffe wie Farb-, Konservierungs- und Aromastoffe zugesetzt, um sie aufzuwerten. Hierbei wird von Konsumenten das Prädikat „natürlich“ bevorzugt, das beispielsweise durch die enzymatische Produktion dieser Wirkstoffe erhalten wird. Hier bieten sich Basidiomycota als Genspender an, da sie als Hauptdestruenten von Pflanzenresten ein breites jedoch bisher nur unzureichend beschriebenes Spektrum an potenten degradativen Enzymen bieten. In dieser Arbeit wurde an der natürlichen Produktion der Raucharomakomponente 4-Vinylguajakol (4-VG) sowie dem potentiellen Konservierungsstoff 2,6-Dimethoxychinon (DMBQ) durch degradative basidiomycetische Enzyme gearbeitet.

In einer ersten Studie wurde eine Ferulasäuredecarboxylase aus *Schizophyllum commune* (ScoFAD) als erstes Enzym seiner Art aus Basidiomycota identifiziert und erfolgreich im lebensmittelgeeigneten Expressionswirt *Komagataella phaffii* heterolog produziert. Im Vergleich mit bakteriellen und ascomycetischen Enzymen zeigte die ScoFAD mit $0,16 \text{ mmol L}^{-1}$ die höchste Affinität zu ihrem einzigen Substrat Ferulasäure. Die katalytische Effizienz übertraf die homologer Enzyme mit $4.779 \text{ L s}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$ um mehr als den Faktor 50. Die ScoFAD wurde kovalent auf AminoLink Plus Agarose immobilisiert und zeigte in einem kontinuierlichen Prozess über mehrere Tage Aktivität. So wurde mit der Synthese von natürlichem 4-VG als Schlüsselkomponente des Raucharomas der Weg für neue, nachhaltige und sichere Raucharomen geebnet.

DMBQ besitzt antibakterielle und antifungale Eigenschaften und wurde in vorangegangenen Arbeiten als *in-vitro*-Oxidationsprodukt von Malvidin nachgewiesen. In einer zweiten Studie wurden erstmals komparative Analysen des DMBQ-Gehalts verschiedener Weine durchgeführt. Das Chinon wurde lediglich in den malvidinhaltigen Proben mit Konzentrationen zwischen 28 und $137 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ nachgewiesen, was auf das Vorhandensein des gleichen Bildungsweges *in vivo* hindeutete. Es konnten erstmals *in-vivo*-Bildungskinetiken in homogenisierten roten Früchten aufgenommen werden, die eine Zelldekompartementalisierung als Auslöser der DMBQ-Bildung zeigten. Zudem wurde ein Bioprozess etabliert, der die Produktion des Chinons unter *food-grade*-Bedingungen mit Ausbeuten von 94 % und 65 mg DMBQ/100 g Weintrester mittels einer Laccase aus *Pleurotus pulmonarius* ermöglicht.

Schlagworte: Raucharoma, Konservierungsstoff, 4-Vinylguajakol, 2,6-Dimethoxybenzochinon, Basidiomycota.

Abstract

The growing industrialisation of food production goes hand in hand with the increasing addition of active compounds such as dyes, preservatives, and flavours to improve the products' properties. In such additives, consumers prefer the classification "natural", which can be achieved by enzymatically catalysed synthesis. A suitable source of such enzymes are destruent-like Basidiomycota, as they produce a broad variety of potent but not well described degrading enzymes. This work was focussed on the natural production of the smoke flavour compound 4-vinylguaiacol (4-VG) and the potential preservative 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) *via* degrading basidiomycetous enzymes.

In a first study, a ferulic acid decarboxylase from *Schizophyllum commune* (ScoFAD) was successfully identified as the first of its kind in Basidiomycota and was heterologously produced in the food-grade host *Komagataella phaffii*. In contrast to homologous bacterial and ascomycetous enzymes, ScoFAD offered the highest described affinity of 0.16 mmol L⁻¹ towards its only substrate, ferulic acid. Further, its catalytic efficiency of 4,779 L s⁻¹ mmol⁻¹ exceeded the next best known enzyme by more than a factor of 50. The enzyme was covalently immobilised on AminoLink Plus Agarose and showed activity for several days in a continuous process. This enzymatic synthesis of natural 4-VG as a key compound of smoke paves the way for a new generation of sustainable and safe smoke flavours.

The compound DMBQ offers anti-bacterial and anti-fungal activities and was identified as an oxidation product of malvidin in previous studies. In a second study, comparative analysis of the DMBQ content of different wine beverages were performed for the first time. The quinone was solely found in malvidin containing wines with concentrations ranging from 28 to 137 µg L⁻¹, indicating that DMBQ formation also takes place *in vivo*. Formation kinetics in anthocyanin-rich fruits were recorded and demonstrated that quinone formation is triggered by cell decompartmentalisation. Further, a bioprocess was established enabling the production of natural DMBQ from wine pomace *via* a laccase of *Pleurotus pulmonarius* with yields of 94 % and 65 mg DMBQ/100 g wine pomace.

Keywords: Smoke flavour, Preservative, 4-Vinylguaiacol, 2,6-Dimethoxybenzoquinone, Basidiomycota.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	1
Zusammenfassung.....	II
Abstract.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XIV
1 Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur	1
1.1 Basidiomycota.....	1
1.1.1 Lebenszyklus.....	3
1.1.2 Lignocellulose.....	5
1.2 Degradative Enzyme aus Basidiomycota.....	7
1.2.1 Oxidoreduktasen (EC 1.X.X.X).....	7
1.2.1.1 Laccasen.....	7
1.2.1.2 Peroxidasen	10
1.2.2 Hydrolasen (EC 3.X.X.X).....	11
1.2.2.1 Cellulasen.....	11
1.2.2.2 Hemicellulasen.....	13
1.2.2.3 Ferulasäureesterasen.....	14
1.2.3 Lyasen (EC 4.X.X.X).....	15
1.3 Wirkstoffe.....	17
1.3.1 Farbstoffe.....	17
1.3.1.1 Anthocyane	18
1.3.2 Konservierungsstoffe	21
1.3.2.1 Räucherrauch.....	22
1.3.3 Aromastoffe.....	23
2 Problemstellung und Zielsetzung.....	24

3	Vorwort zur Publikation „Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants”	25
4	Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants.....	26
4.1	Introduction.....	27
4.2	Material and methods.....	29
4.2.1	Chemicals, reagents, and substrates.....	29
4.2.2	Cultivation of <i>Schizophyllum commune</i> and RNA isolation.....	29
4.2.3	Gene amplification and cloning.....	29
4.2.4	Heterologous expression in <i>Komagataella phaffii</i>	30
4.2.5	BRADFORD assay.....	30
4.2.6	Ni-NTA affinity chromatography and SDS-PAGE.....	31
4.2.7	Decarboxylase activity assay and HPLC.....	31
4.2.8	Determination of kinetic constants.....	32
4.2.9	Multiple sequence alignment.....	32
4.2.10	Immobilisation.....	32
4.3	Results.....	33
4.3.1	Amplification of the ScoFAD mRNA.....	33
4.3.2	Heterologous production and protein purification.....	33
4.3.3	Biochemical characterisation.....	34
4.3.4	Substrate specificity and kinetic characterisation.....	35
4.3.5	Protein modelling.....	36
4.3.6	Enzyme immobilisation.....	38
4.4	Discussion.....	40
4.5	Conclusion.....	42
4.6	Supporting information.....	43
5	Vorwort zur Publikation „Formation of 2,6-DMBQ in anthocyanin-rich foods”	47

6	Formation of 2,6-DMBQ in anthocyanin-rich foods.....	48
6.1	Introduction.....	49
6.2	Material and methods.....	50
6.2.1	Chemicals.....	50
6.2.2	Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside extraction.....	51
6.2.3	HPLC analysis of anthocyanins.....	51
6.2.4	Homogenisation of fruits.....	51
6.2.5	Sample preparation.....	52
6.2.6	Solid phase extraction of anthocyanins and bioconversion	52
6.2.7	Solid phase extraction of DMBQ	53
6.2.8	LC-MS analysis.....	53
6.3	Results.....	54
6.3.1	Occurrence of DMBQ in grape wines and juices.....	54
6.3.2	Formation kinetics in anthocyanin-rich fruits	55
6.3.3	Production and purification of DMBQ from grape pomace.....	56
6.4	Discussion.....	58
6.5	Conclusion.....	59
7	Ausblick	61
8	Literaturverzeichnis.....	62
	Lebenslauf.....	78
	Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen.....	79

Abkürzungsverzeichnis

ACS	<i>American Chemical Society</i>
AIPAD	Phenolsäuredecarboxylase aus <i>Aspergillus luchuenses</i>
AnP	Antarctic Phosphatase
APC	Artikelprozessierungsgebühr (<i>article processing charge</i>)
BaPAD	Phenolsäuredecarboxylase aus <i>Bacillus atrophaeus</i>
<i>o</i> -BDC	<i>o</i> -Benzoessäuredecarboxylasen
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMMY	Gepuffertes Minimalmedium mit Methanol für Hefen (<i>buffered minimal methanol complex medium for yeast</i>)
Bpu	<i>Bacillus pumilus</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
Bzw.	Beziehungsweise
CA	Kaffesäure
CBH	Cellobiohydrolase
Cfa	<i>Cordyceps farinosa</i>
CiAs	Zimtsäure und Derivate
DMBQ	2,6-Dimethoxybenzochinon
2,5-DMBQ	2,5-Dimethoxybenzochinon
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DyP	<i>dye-decolourising</i> Peroxidase
EC	Enzymklassifizierungsnummer (<i>enzyme commission number</i>)
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (<i>European food safety authority</i>)
EG	<i>Endo</i> -1,4- β -glucanase
Esp	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Et al.</i>	Und andere (<i>et altera</i>)
EtOH	Ethanol
FA	Ferulasäure (<i>ferulic acid</i>)
FAD	Ferulasäuredecarboxylase
FAE	Ferulasäureesterase

FDA	US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FDC1	Ferulasäuredecarboxylase 1 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
For	Primer in Vorwärts-Richtung (<i>forward primer</i>)
FPLC	Schnelle Protein Flüssigchromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
GC	Gaschromatographie (<i>gas chromatography</i>)
GRAS	Allgemein als sicher anerkannt (<i>Generally recognised as safe</i>)
HCA	heterozyklisches Amin (<i>heterocyclic amine</i>)
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IfaPAD	Phenolsäuredecarboxylase aus <i>Isaria farinosa</i>
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
k_{cat}	Katalytische Wechselzahl
K_M	MICHAELIS-MENTEN-Konstante
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung
LiP	Ligninperoxidase
Mal-Glu	Malvidinglukosid
MnP	Manganperoxidase
MS	Massenspektrometrie (<i>mass spectrometry</i>)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
<i>P.a.</i>	Analysenrein (<i>pro analysis</i>)
PAD	Phenolsäuredecarboxylase
PAK // PAH	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff (<i>polycyclic aromatic hydrocarbon</i>)
<i>pCA</i>	<i>p</i> -Cumarsäure (<i>p-coumaric acid</i>)
PrFMN	Prenyliertes Flavinmononukleotid (<i>prenylated flavin mononucleotide</i>)
pH	Gegenzahl des dekadischen Logarithmus der Protonenkonzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
Rev	Primer in Rückwärts-Richtung (<i>reverse primer</i>)

Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RspCAE	<i>p</i> -Cumarsäureesterase aus <i>Rhizoctonia solani</i>
ScoFAD	Ferulasäuredecarboxylase aus <i>Schizophyllum commune</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SNL	Standardnährlösung
SPE	Festphasenextraktion
<i>Sp.</i>	nicht näher bezeichnete Spezies (<i>species</i>)
<i>Spp.</i>	Mehrere Spezies (<i>species pluralis</i>)
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
UV	Ultraviolett
4-VG	4-Vinylguajakol
Vgl.	Vergleiche
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
XAD	Experimentell und entwicklungsbezogen (<i>experimental and developmental</i>)
YPD	Hefeextrakt Pepton Dextrose (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.1: Schematischer Aufbau von Ständerpilzen nach Flück (2020).....	2
Abb. 1.1.2: Übersicht eines typischen Lebenszyklus von Basidiomycota nach Piepenbring (2015).....	4
Abb. 1.1.3: Schematischer Aufbau von Lignocellulose in pflanzlichen Zellwänden nach de Oliveira <i>et al.</i> (2015); Bamdad <i>et al.</i> (2017).....	6
Abb. 1.2.1: Laccase-katalysierte Oxidation von Phenol zu einem Phenoxyradikal unter Bildung von Wasser nach de Oliveira <i>et al.</i> (2015).	8
Abb. 1.2.2: Kupferzentren (Typ 1-3) von Laccasen nach Agrawal <i>et al.</i> (2018).....	9
Abb. 1.2.3: Synergistische Hydrolyse von Cellulose durch <i>Endo</i> -1,4- β -glucanasen, Cellobiohydrolasen und β -Glucosidasen nach Rytioja <i>et al.</i> (2014); Saini <i>et al.</i> (2014). \square : D-Glukose, \bullet : Reduzierendes Ende.....	12
Abb. 1.2.4: Synergistische Hydrolyse von Arabinoxylan durch <i>Endo</i> -1,4- β -xylanasen, Xylobiohydrolasen, β -Xylosidasen, Arabinofuranosidasen und Ferulasäureesterasen nach Rytioja <i>et al.</i> (2014). \square : D-Xylose, \circ : L-Arabinose, \triangle : Ferulasäure.....	13
Abb. 1.2.5: Strukturen verbreiteter Hydroxyzimtsäuren nach Taofiq <i>et al.</i> (2017).....	14
Abb. 1.2.6: Mechanismus der Decarboxylierung von Ferulasäure zu 4-Vinylguajakol nach Gu <i>et al.</i> (2011).....	16
Abb. 1.3.1: Flavyliumkationen verbreiteter Anthocyanidine nach Detering <i>et al.</i> (2018).....	18
Abb. 1.3.2: Postulierter Mechanismus des durch Multikupferoxidasen (MCOs) katalysierten Abbaus des Flavyliumkations von Malvidin-3- <i>O</i> -galactosid zu 2,6-Dimethoxybenzochinon nach Detering <i>et al.</i> (2018). Die phenolische Hydroxygruppe des B-Rings wird zu einem Phenoxyradikal oxidiert (I) und durch Mesomerie zum tertiären Kohlenstoff transloziert (II). Sauerstoff als Diradikal greift an dieser Position an und bildet ein Peroxyradikal (III), das folgend zu einem Peroxid reduziert wird (IV). Ein freies Elektronenpaar des Peroxides greift die benachbarte elektrophile Position nukleophil an und bildet ein Endoperoxid (V). Der instabile Vierring wird unter Spaltung der C-C-Bindung zwischen B- und C-Ring geöffnet, sodass DMBQ und ein Coumaringlykosid als Produkte entstehen (VI).....	20
Fig. 4.1.1: Reaction scheme of the decarboxylation of FA forming 4-VG catalysed by FADs as proposed by Gu <i>et al.</i> (2011).	27
Fig. 4.3.1: SDS-PAGE (12 %) of the raw culture supernatant and the purified enzyme. The culture supernatant of recombinant <i>Komagataella phaffii</i> GS115 was harvested at the fourth	

day of main culture daily induced with 10 mL L⁻¹ methanol (A) and the heterologous protein purified via Ni-NTA affinity chromatography (B). As standard protein marker, 5 µL of unstained Precision Protein™ (Bio-Rad) was used (M). Both samples were tenfold concentrated using membrane filters (3 kDa cut-off), and 10 µL of each were applied. The gel was stained overnight in Imperial Protein Stain solution (Thermo Scientific) and washed with distilled water..... 34

Fig. 4.3.2: Biochemical characterisation of the heterologously produced ScoFAD. pH (a) and temperature (b) dependencies of the heterologously produced and purified ScoFAD. Optimum curves are displayed as squares with solid lines and stability curves as triangles and dotted lines. For the pH studies, Britton–Robinson buffer was used. For the temperature stability studies, samples were incubated for one hour at the given temperature prior to the assay. All values were measured in triplicate..... 35

Fig. 4.3.3: Multiple sequence alignment (MSA) of different phenolic acid decarboxylases. The new ferulic acid decarboxylase ScoFAD described in this work (Sco, MT459803), an ascomycetous *p*-coumaric acid decarboxylase from *Cordyceps farinosa* described by (Linke *et al.*, 2017) (Cfa, CUI18215), and two bacterial ferulic acid decarboxylases from *Enterobacter sp.* studied by (Gu *et al.*, 2011) (Esp, ACJ26748) and from *Bacillus pumilus* by (Matte *et al.*, 2010) (Bpu, Q45361) were aligned by Clustal W. Conserved residues are marked in black, conservative mutations in dark-grey and semiconservative mutations in light-grey. The active-site residues proposed by (Gu *et al.*, 2011) are indicated by black triangles..... 37

Fig. 4.3.4: Protein modelling. Overall (a) and active-site-focussed (b) protein model of the ScoFAD (MT459803) generated with SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014) using the template of a phenolic acid decarboxylase from *Bacillus pumilus* (3nad.1) described by (Matte *et al.*, 2010). The substrate FA was docked according to (Gu *et al.*, 2011) and shown in blue sticks, the active-site residues are shown in stick and balls. The figures were created using UCSF Chimera 1.14. 38

Fig. 4.3.5: Stability of the specific activity of ScoFAD covalently immobilised to AminoLink Plus Agarose. In duplicate measurement, 0.28 mg of purified enzyme were bound to 4.7 mg of resin, which corresponded to a bed volume of 100 µL. Substrate solution was pumped through the columns at room temperature with a flow rate of 0.25 mL min⁻¹ for 264 h while collecting samples of the flow through mixing it with the same volume of acetonitrile. The concentration of 4-VG was quantitated using UV-Vis-HPLC and external calibration..... 39

Fig. 4.6.1: MICHAELIS-MENTEN non-linear-regression for the conversion of ferulic acid by ScoFAD. 45

Fig. 4.6.2: Raw SDS-PAGE images.....	46
Fig. 6.3.1: Concentrations of 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) and malvidin-3- <i>O</i> -glucoside (Mal-Glu) in selected wines and juices. HCl was added to the samples followed by addition of 2,5-DMBQ as internal standard and extraction with dichloromethane. ESI-LC-MS/MS analysis in MRM mode using the fragmentation pattern 169 (+)->141 (+) as quantifier ion. The samples were prepared independently and measured as triplets. The content of Mal-Glu was analysed using HPLC-DAD at 493 nm and correlated. CH – Chardonnay white wine; CS – Cabernet Sauvignon red wine; CSJ – Cabernet Sauvignon grape juice; DO – Dornfelder red wine; DOJ – Dornfelder grape juice; LA – Lambrusco red sparkling wine; ME – Merlot red wine; MEJ – Merlot grape juice; MO – Montepulciano red wine; ND – Nero D'Avola red wine; PN – Pinot Noir red wine; PR – Primitivo red wine; RI – Riesling white wine; SY – Syrah red wine; SYR – Syrah rosé wine; TR – Trollinger red wine; TRR – Trollinger rosé wine.	54
Fig. 6.3.2: Formation kinetics of 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) in anthocyanin-rich fruits. The fruits were homogenised in water and samples were taken in triplets after specific time points. The reaction was stopped with HCl and 2,5-DMBQ was added as internal standard. After extraction with dichloromethane, a ESI-LC-MS/MS in MRM mode using the fragmentation pattern 169 (+) → 141 (+) as quantifier ion was performed. ◆ – Blueberry; ▲ – Blackberry; ● – Red grape; × – White grape.....	56
Fig. 6.3.3: Production of 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) from grape pomace under food grade conditions. Dry grape pomace (100 g) was extracted and purified to 206 mg malvidin-3- <i>O</i> -glucoside (Mal-Glu), which was further degraded to DMBQ by a laccase of <i>Pleurotus pulmonarius</i> (PpuLCC) at a conversion rate of 94 % giving the yield of 65 mg/100 g dry matter.	58

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.2.1: Klassifizierung von Ferulasäureesterasen nach Crepin <i>et al.</i> (2004).....	14
Tab. 4.3.1: Comparison of various bacterial and fungal phenolic acid decarboxylases.....	36
Tab. 4.3.2: Activity data for the immobilisation of ScoFAD to AminoLink Agarose.....	39
Tab. 4.6.1: List of chemicals.	43
Tab. 6.3.1: Solid phase extraction of the raw ethanolic anthocyanin extract from grape pomace with XAD7HP and the product of the biotransformation with XAD16N. All samples were prepared and analysed as triplets. Mal-Glu – Malvidin-3- <i>O</i> -glucoside; DMBQ – 2,6-Dimethoxybenzoquinone; * – Not performed.....	57

1 Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur

1.1 Basidiomycota

Basidiomycota (Ständerpilze) bilden taxonomisch gemeinsam mit den Ascomycota die zwei bedeutendsten Abteilungen des Unterreichs Dikarya im Reich der Pilze. Derzeit sind etwa 32.000 verschiedene Spezies der Ständerpilze beschrieben, was etwa 30 % der Eumycota entspricht (Kirk *et al.*, 2008).

Ständerpilze sind in der Regel ähnlich aufgebaut. Ihr Myzel aus feinen Hyphen, die aus angereihten Zellen bestehen, durchdringt den jeweiligen Nährboden und kann sich bei einigen Arten über mehrere Quadratkilometer erstrecken. So ist ein Individuum des Großen Hallimasch (*Armillaria ostoyae*) in einem Nationalpark in Oregon mit etwa 9,5 km² das größte bekannte Lebewesen der Welt (Schmitt *et al.*, 2008).

Aus dikaryotischen Hyphen können die oft für Basidiomycota typischen Fruchtkörper (Basidiokarps) entwachsen. Dieser Vorgang ist in vielen Spezies maßgeblich von physikalischen Faktoren wie Temperatur und Licht abhängig. Je nach Art bilden sich an der Unterseite der Fruchtkörperhüte Lamellen oder Röhren aus, in denen an den Enden der Hyphen die namensgebenden Basidien mitsamt der Basidiosporen gebildet werden (Abb. 1.1.1) (Jennings *et al.*, 1999; Kües *et al.*, 2006).

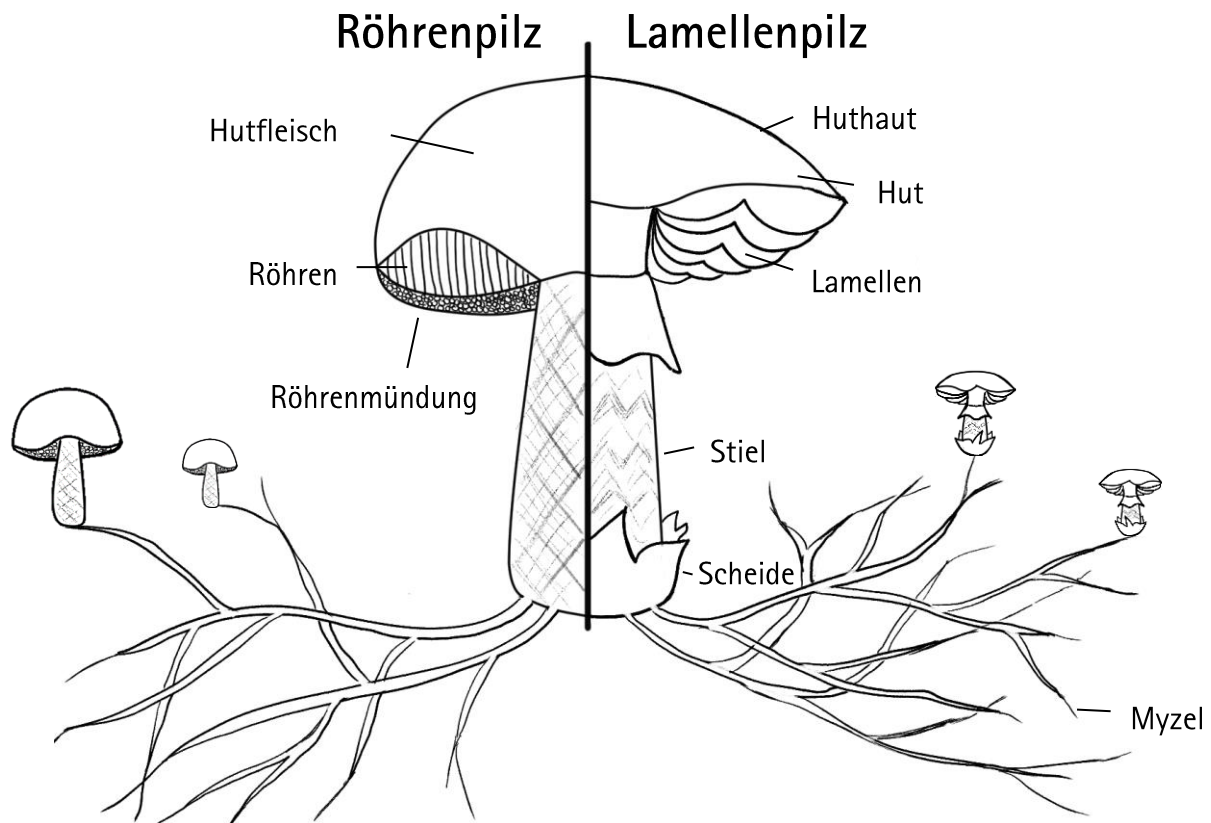


Abb. 1.1.1: Schematischer Aufbau von Ständerpilzen nach Flück (2020).

Ebendiese Fruchtkörper machten die Basidiomycota bekannt, da viele essbar sind. Es sind 950 verzehrbare Spezies beschrieben, von denen etwa 50 kommerziell kultiviert und vertrieben werden (Rühl *et al.*, 2007). Solche Speisepilze stammen meist aus der Klasse der Agaricomycetes, die populäre Beispiele wie den Champignon (*Agaricus bisporus*), Shiitake (*Lentinula edododes*), Austern-Seitling (*Pleurotus ostreatus*) und Steinpilz (*Boletus edulis*) hervorbringt.

In den vergangenen Dekaden nahm die weltweite Produktion von Speisepilzen stetig zu. So versiebenfachte sich diese zwischen 1961 und 1998, in Europa verzehnfachte sie sich sogar. Im Jahre 1994 produzierte China als weltweit führendes Land mehr als 2,4 Mio. t Speisepilze, wovon fast die Hälfte auf *Lentinula* (632.000 t) und *Pleurotus* (654.000 t) entfiel. In westlichen Ländern dagegen war vor allem *Agaricus* kommerziell bedeutend und stellte mit einer Gesamtproduktion von 1,8 Mio. t den weltweit meist produzierten Speisepilz dar (Kües *et al.*, 2000).

1.1.1 Lebenszyklus

Die reguläre Vermehrung der Basidiomycota erfolgt sexuell. Typischerweise liegen zwei Kreuzungstypen (bipolar) vor, die über den *mating type locus* gegeben sind. Bedeutende Ausnahmen bilden beispielsweise *Cryptococcus neoformans*, der sich unter gewissen Bedingungen ohne verschiedenen Kreuzungstyp und somit unipolar fortpflanzt, oder *Ustilago maydis* der über zwei unabhängige *mating type loci* (tetrapolar) auf verschiedenen Chromosomen verfügt (Sun *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2018). Die *mating type loci* kodieren oft Transkriptionsfaktoren oder Proteine in Pheromon/Signalkaskaden, die beispielsweise wichtig für das Wachstum der entstehenden dikaryotischen Zellen sind (Kronstad *et al.*, 1997).

Treffen zwei monokaryotische und haploide Hyphenzellen ungleichen Kreuzungstypes aufeinander, kann es zu einer Plasmogamie kommen, bei der die Zellplasmen miteinander verschmelzen und eine dikaryotische Zelle bilden. Anders als in anderen Organismen ist dieser Zustand stabil und führt nicht direkt zu einer Fusion der Zellkerne. Bei der Teilung dieser Zellen bilden viele Basidiomycota Schnallen aus, die sicherstellen, dass auch beide Tochterzellen dikaryotisch sind (Banuett, 2015). In den Lamellen bzw. Röhren des Basidiokarps verschmelzen schließlich beide Kerne im Rahmen der Karyogamie zu einem diploiden Zellkern und bilden die Mutterzelle einer Basidie. Im Zuge der Meiose entstehen aus der diploiden Zelle vier haploide Basidiosporen, die an der Oberfläche der Basidien präsentiert werden. Diese Sporen können nach Freisetzung und einer Reifung in geeigneter Umgebung wieder neue haploide Hyphen ausbilden (Abb. 1.1.2) (Kües *et al.*, 2006).

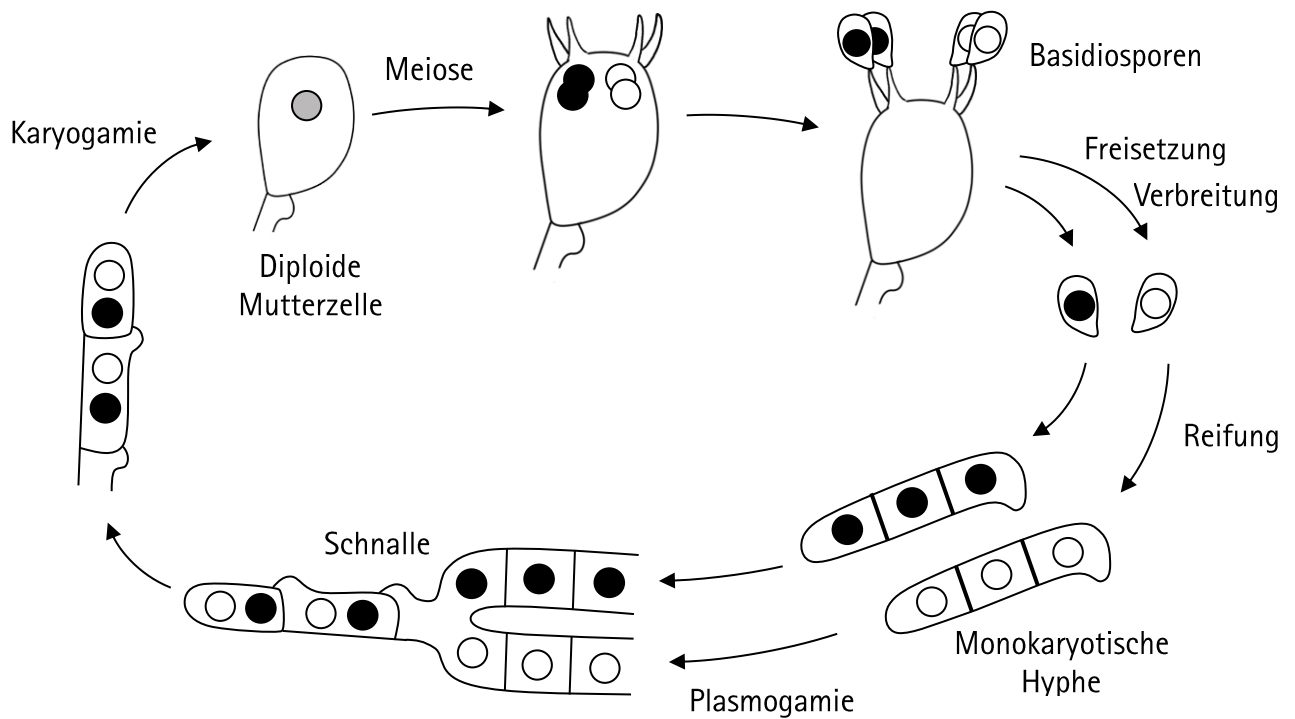


Abb. 1.1.2: Übersicht eines typischen Lebenszyklus von Basidiomycota nach Piepenbring (2015).

Die meisten Pilze können sich allerdings auch asexuell vermehren. Beispiele hierfür sind die Basidiomycota *Ustilago maydis* und *Microbotryum spp.*, die sich in ihren nicht pathogenen Hefeformen asexuell vermehren und erst bei Kontakt mit ungleichen Kreuzungstypen zu pathogenen Dikaryonten verschmelzen, die dann in den entsprechenden Wirten Pflanzenkrankheiten wie Maisbeulenbrand auslösen können (Coelho *et al.*, 2017)

1.1.2 Lignocellulose

Jährlich fallen weltweit etwa 80 Mio. t Kohlenstoff in Form von toter pflanzlicher Biomasse an (Luysaert *et al.*, 2010). Mit Ausnahme einiger Ascomycota sind Basidiomycota die einzigen Organismen, die dieses Substrat durch den Abbau der enthaltenen Lignocellulose erschließen können (Shary *et al.*, 2007). So erfüllen sie in ihren Ökosystemen die wichtige Rolle als Destruenten von abgestorbenen, verholzten Pflanzenteilen und sind daher vor allem in Wäldern zu finden, wo ihre Myzelien die humusreiche Erde durchdringen (Kwaśna *et al.*, 2016; Hiscox *et al.*, 2018).

Lignocellulose besteht hauptsächlich aus Cellulose (30 %), Hemicellulose (30 %) und Lignin (35 %). Cellulose ist ein lineares Polysaccharid aus β -(1,4)-verknüpfter D-Glukose und liegt kristallin in Mikrofibrillen von 3 nm Durchmesser vor. Sie bildet das Grundgerüst der pflanzlichen Zellwand und trägt durch ihre unlöslichen und chemisch stabilen Aggregate maßgeblich zur deren Stabilität bei. Die Hemicellulosen bilden eine Gruppe verschiedener, aber strukturell verwandter Polysaccharide, die die Funktion als Bindeglied zwischen Cellulose und Lignin erfüllen. Häufig vorkommende Bausteine in der Hauptkette sind Xylanose, Mannose und Galactose, wobei auch oft kurze Verzweigungen zu finden sind. So besteht die Hemicellulose Arabinoxylan aus β -(1,4)-verknüpfter D-Xylose, die in unregelmäßigen Abständen mit L-Arabinose substituiert ist. Diese Arabinose-Seitenketten sind häufig mit Hydroxyzimtsäuren wie Ferulasäure verestert, über die mittels Bildung eines Phenoxyradikals eine Quervernetzung zu weiteren Hemicellulosen oder Lignin ermöglicht wird. Diese Quervernetzungen führen zu einer enorm gesteigerten Festigkeit der Zellwand (Buanafina, 2009; Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012; de Oliveira *et al.*, 2015).

Lignin ist ein hochmassiges Copolymer aus Sinapyl-, *p*-Cumaryl- und Coniferylalkohol. Pflanzliche Oxidasen wie Laccasen und Peroxidasen katalysieren die radikalische Verknüpfung dieser Monomere zu einem komplexen Netzwerk aus Phenolen. Im Gegensatz zu den weiteren Bestandteilen der pflanzlichen Zellwand sind die Monomere des Lignins häufig über schwer zu spaltende C-C-Bindungen verknüpft, wodurch sie in besonderem Maße zur Robustheit der Zellwand beitragen (Abb. 1.1.3) (Vanholme *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018).

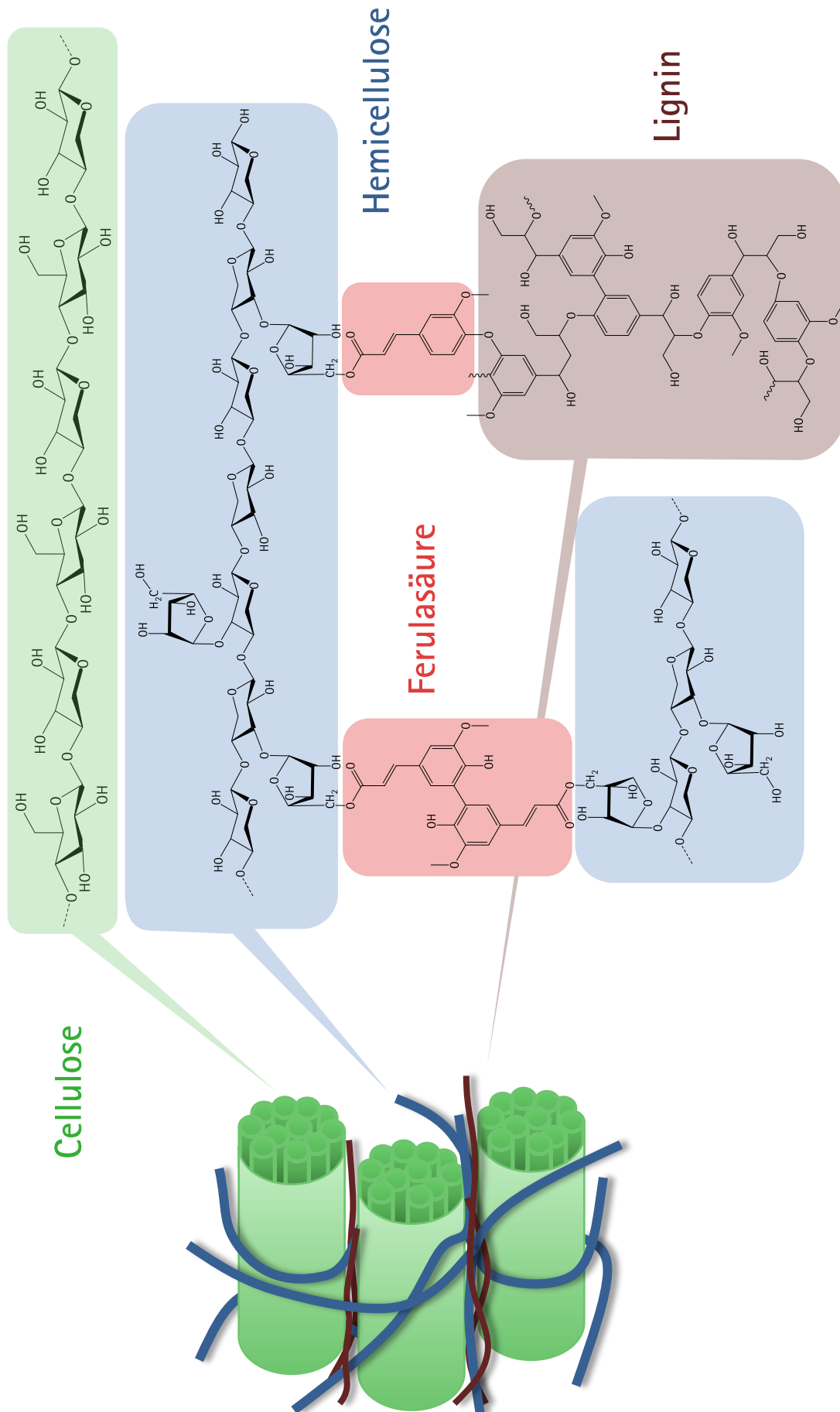


Abb. 1.1.3: Schematischer Aufbau von Lignocellulose in pflanzlichen Zellwänden nach de Oliveira et al. (2015); Bamdad et al. (2017).

Die Lignocellulose-degradierenden Basidiomycota werden anhand der Farbe des befallenen Holzes konventionell als Braun- oder Weißfäulepilze klassifiziert (Etheridge, 1957). Die verbreiteteren Braunfäulepilze sind nicht in der Lage Lignin abzubauen, welches zurückbleibt und die bräunliche Farbe verursacht. Im Gegensatz dazu bauen Weißfäulepilze mittels zusätzlicher Enzyme die gesamte Lignocellulose ab (Goodell *et al.*, 2008).

Daher sind besonders die Weißfäulepilze industriell von größtem Interesse, da mit ihren Enzymen das bisher nur schwer verwertbare Lignin biotechnologisch zu hochwertigen natürlichen Phenolen wie Vanillin, Syringol oder Catechol umgesetzt werden könnte (Jahn *et al.*, 2020).

1.2 Degradative Enzyme aus Basidiomycota

Um ein derartig komplexes und quervernetztes Substrat wie Lignocellulose abzubauen und zu verwerten, ist ein breites Spektrum an potenten degradativen Enzymen erforderlich. Das enzymatische Portfolio der Basidiomycota besteht dem Substrat entsprechend im Wesentlichen aus hydrolytischen Enzymen zum Abbau der Polysaccharidstrukturen sowie einem beispiellosen System aus Oxidoreduktasen für den Abbau von Lignin (Peralta *et al.*, 2017). Die überwiegende Zahl dieser Enzyme weist ein pH-Optimum im sauren Bereich auf (Baldrian, 2006; Rytioja *et al.*, 2014). Dies ermöglicht einen kompetitiven Vorteil gegenüber konkurrierenden Spezies, sodass einige Basidiomycota aktiv organische Säuren wie Oxal-, Zitronen- und Essigsäure sekretieren, um den umgebenden pH-Wert zu senken (Liaud *et al.*, 2014).

1.2.1 Oxidoreduktasen (EC 1.X.X.X)

Aus der Gruppe der Oxidoreduktasen sind vor allem Laccasen und Peroxidasen für die oxidative Degradation des Lignins von Bedeutung.

1.2.1.1 Laccasen

Laccasen (EC 1.10.3.2) haben ein breites Substratspektrum und können so Phenole, anorganische Ionen und auch eine Reihe an nicht phenolischen Substraten oxidieren. Sie nutzen molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor und katalysieren über die Reduktion zu Wasser einen ein-Elektronen-Transfer von ihrem Substrat, was häufig zur Radikalbildung an Phenolen führt (Abb. 1.2.1) (Agrawal *et al.*, 2018).

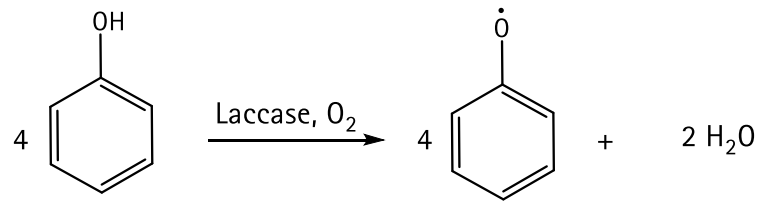


Abb. 1.2.1: Laccase-katalysierte Oxidation von Phenol zu einem Phenoxyradikal unter Bildung von Wasser nach de Oliveira *et al.* (2015).

Das katalytische Zentrum der Enzyme ist durch vier Kupferionen charakterisiert, die durch Histidin-, Leucin- und Cysteinreste stabilisiert werden. Das Typ-1-Kupferion besitzt mit etwa 790 mV das höchste Redoxpotential und ist daher für die Oxidation des Substrates verantwortlich. Durch ein Absorptionsmaximum bei 610 nm trägt es maßgeblich zu der blauen Färbung dieser Enzyme bei.

Typ-2- und zwei Typ-3-Kupferionen, die über eine Hydroxylbrücke verbunden sind, formen ein Dreieck, welches Sauerstoff bindet und dessen Reduktion vermittelt. Pro katalytischem Zyklus werden vier Elektronen aus der Oxidation von Substratmolekülen am Typ-1-Kupferion benötigt (Maestre-Reyna *et al.*, 2015). Der Elektronentransfer vom Typ-1-Kupferion zum Typ-2/3-Cluster erfolgt hierbei über eine Cys-His-Brücke (Abb. 1.2.2) (Leferink *et al.*, 2011; Cristaldi *et al.*, 2018).

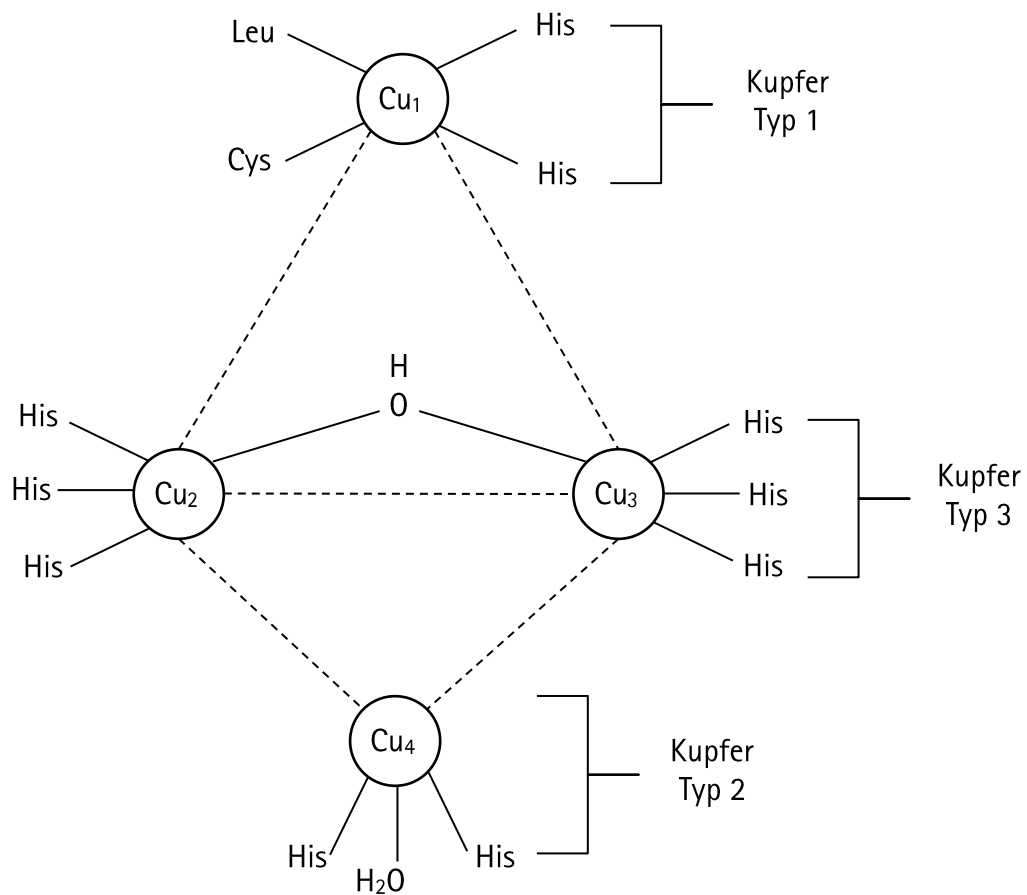


Abb. 1.2.2: Kupferzentren (Typ 1–3) von Laccasen nach Agrawal *et al.* (2018).

Neben einer direkten Oxidation können Laccasen auch indirekt Substrate umsetzen. Dies ist vor allem dann notwendig, wenn das Ionisierungspotential des Substrates das Redoxpotential des Typ-1-Kupferions übersteigt. Dann können im ersten Schritt Mediatoren mit geringerem Redoxpotential wie kleine Phenolderivate umgesetzt werden, die ihrerseits in einem zweiten Schritt das eigentliche Substrat oxidieren (Cañas *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2018).

Durch ihr breites Substratspektrum sind Laccasen aus Basidiomycota für viele industrielle und biotechnologische Anwendungszweige geeignet (Agrawal *et al.*, 2018). Neben der Produktion von Biokraftstoffen und hochwertigen Phenolen aus Lignocellulose ist auch die Anwendung in Waschmitteln vielversprechend. So wurden Laccasen aus *Pleurotus pulmonarius* bereits erfolgreich für die Entfärbung von Anthocyanen auf Stoffen angewendet (Mussmann *et al.*, 2016b, 2016a; Behrens *et al.*, 2017).

1.2.1.2 Peroxidasen

Auch Peroxidasen (EC 1.11.1.X) werden von Pilzen gebildet, um Lignin abzubauen. Folglich wurden die ersten entdeckten Peroxidasen gemäß ihres Substrates und ihres Elektronenakzeptors Wasserstoffperoxid als Lignin-Peroxidasen (LiPs) bezeichnet (Kirk *et al.*, 1987). Diese Enzyme weisen in ihrem aktiven Zentrum typischerweise Fe(III) als Kofaktor auf, das durch die vier Tetrapyrrole von Häm sowie einem Histidinrest koordiniert ist. Während eines katalytischen Zyklus werden zunächst zwei Elektronen auf das Wasserstoffperoxid übertragen, sodass das Fe(III) zu Fe(IV) oxidiert, ein Radikal am Tetrapyrrol oder dem Histidinrest gebildet wird und das Reduktionsprodukt Wasser entsteht. Dann werden sequentiell zwei Elektronen von Substratmolekülen auf das Enzym übertragen, wobei zunächst das Radikal gesättigt und dann das Fe(IV) reduziert wird. So wird der Grundzustand des Enzyms unter Bildung von oxidierten Substraten wieder hergestellt (Hammel *et al.*, 2008).

Der namensgebenden Reaktion zum Trotz, werden LiPs von vielen Weißfäulepilzen nicht gebildet. Eine weitere Gruppe von Peroxidasen, die Mangan-Peroxidasen (MnPs), ist dagegen deutlich verbreiteter. Ein zentraler Unterschied zu den LiPs ist, dass MnPs ihre Substrate nicht direkt umsetzen. So oxidieren sie ihren Kofaktor Mn(II) zwar analog zu Mn(III), jedoch verbleibt das Kation nicht am Enzym, sondern wandert in tiefere Ligninschichten, die enzymatisch nicht gut zugänglich sind (Wariishi *et al.*, 1992; Hammel *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass es dabei durch Oxalat cheliiert wird, um eine Disproportionierung zu Mn(II) und Mn(IV) zu verhindern (Kuan *et al.*, 1993).

Eine relativ neue Gruppe von Peroxidasen bilden die *dye-decolourising* Peroxidasen (DyPs). Diese sind industriell von großem Interesse, da sie im Gegensatz zu einigen anderen Peroxidasen viele Farbstoffe, insbesondere Anthraquinone, abbauen können (Hofrichter *et al.*, 2010). Auch DyPs enthalten in der Regel Fe(III) und Häm, jedoch ist der katalytische Zyklus, der zu dem besonderen Substratspektrum dieser Enzyme führt, noch nicht universell bestätigt (Colpa *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu klassischen LiPs weisen DyPs in ihrem aktiven Zentrum Asparaginsäure- und Asparaginreste auf, die an der Umlagerung von Protonen des Wasserstoffperoxides beteiligt sind (Linde *et al.*, 2015). Neben dem Abbau von Farbstoffen können DyPs auch für die Bildung von natürlichen Aromastoffen eingesetzt werden. So wurde bereits mittels der alkenspaltenden Aktivität einer DyP aus *Pleurotus sapidus* eine Reihe aromaaktiver Aldehyde synthetisiert (Krahe *et al.*, 2020).

1.2.2 Hydrolasen (EC 3.X.X.X)

Im Gegensatz zu Lignin können die Polysaccharidstrukturen der pflanzlichen Zellwand durch Hydrolyse der glykosidischen und Esterbindungen abgebaut werden. Um die Effizienz dieses Vorgangs zu erhöhen, sekretieren Basidiomycota eine breite Vielfalt an Enzymen aus der Gruppe der Hydrolasen.

1.2.2.1 Cellulasen

Die wesentlichen Enzyme aus der Gruppe der Cellulasen lassen sich den Endoglucanasen, Exoglucanasen und β -Glucosidasen zuordnen (Rytioja *et al.*, 2014).

Endo-1,4- β -glucanasen (EGs, EC 3.2.1.4) hydrolysieren β -1,4-glykosidische Bindungen innerhalb einer Cellulasekette und bilden so kürzere Saccharide. Sie wurden bereits in verschiedensten Basidiomycota nachgewiesen und gelten daher als typische Enzyme der Spezies (Jiménez *et al.*, 1991; Majjala *et al.*, 1991; Steffen *et al.*, 2007). Die überwiegende Mehrheit der EGs können kristalline Bereiche nur unzureichend angreifen. *In vivo* könnte daher eine Untergruppe von EGs eine zentrale Rolle spielen, die keine Cellulosebindedomäne aufweist. Diese könnte eine Quellung der kristallinen Bereiche unter Bildung von amorphen Angriffspunkten für weitere Enzyme katalysieren (Henriksson *et al.*, 1999).

Cellubiohydrolasen (CBH, EC 3.2.1.91) bilden die zweite Gruppe der hydrolytischen Cellulasen. Sie wirken als Exoglucanasen, bauen je nach Spezifität die Cellulosekette vom reduzierenden oder nicht-reduzierenden Ende ab und setzen das Disaccharid Cellobiose frei. Die Spezifitäten der Enzyme finden sich auch in der Primärstruktur wieder. So befindet sich die Cellulosebindedomäne von CBHs, die das reduzierende Ende hydrolysieren, am C-Terminus des Enzyms, während sich die der übrigen am N-Terminus befindet (Uzategui *et al.*, 1991). In aller Regel besitzen Basidiomycota mindestens zwei CBHs, um einen synergistischen *exo-exo*-Abbau zu ermöglichen (Baldrian *et al.*, 2008).

Es sind allerdings auch Mischformen zwischen EGs und CBHs bekannt, die sogar kristalline Cellulose als Substrat nutzen können und aus dieser kürzere Oligosaccharide freisetzen, die direkt von β -Glucosidasen hydrolysiert werden können (Yoon *et al.*, 2007).

β -Glucosidasen (EC 3.2.1.21) bilden die dritte Gruppe der Cellulose-hydrolysierenden Enzyme. Diese Hydrolasen spalten β -1,4-glykosidische Bindungen in Cellobiose und setzen das Monomer Glukose frei. Aufgrund der breiten Verfügbarkeit von Cellobiose als direkte Vorstufe von Glukose sind β -Glucosidasen in den meisten Mikroorganismen einschließlich Basidiomycota nachgewiesen (Lynd *et al.*, 2002). Während die meisten anderen Spezies diese Enzyme als Monomer sekretieren, sind auch basidomycetische Hefen wie *Rhodotorula minuta* und *Porobolomyces singularis* beschrieben, die β -Glucosidasen als membranständige Homodimere translatieren (Onishi *et al.*, 1996; Ishikawa *et al.*, 2005).

Alle Cellulose-abbauenden Enzyme arbeiten in Synergie, um die Cellulose möglichst effizient zu metabolisierbarer Glucose zu hydrolysieren (Abb. 1.2.3) (Saini *et al.*, 2014).

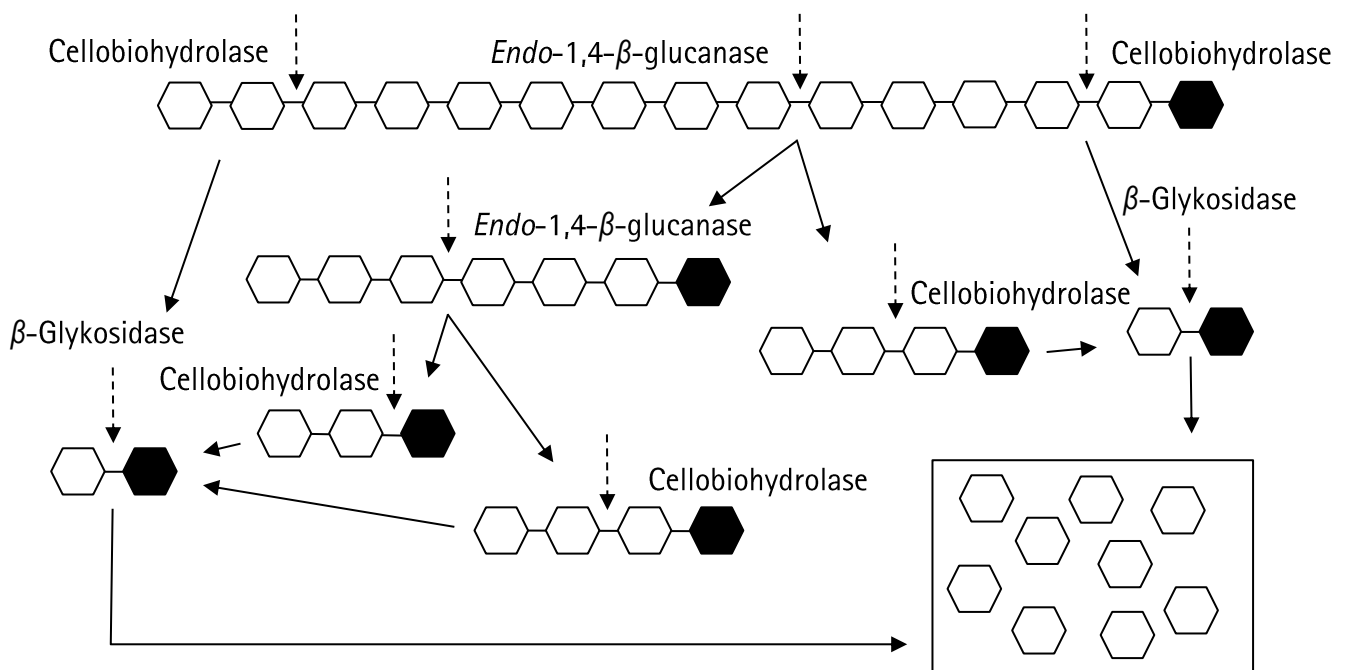


Abb. 1.2.3: Synergistische Hydrolyse von Cellulose durch *Endo*-1,4- β -glucanasen, Cellobiohydrolasen und β -Glucosidasen nach Rytioja *et al.* (2014); Saini *et al.* (2014). \square : D-Glukose, \bullet : Reduzierendes Ende.

1.2.2.2 Hemicellulasen

Wie in Kapitel 1.1.2 diskutiert, sind Hemicellulosen durch ihre Monomerdiversität, Seitenketten und Phenolsäuresubstitutionen im Verhältnis zu Cellulose ungleich komplexer und heterogener aufgebaut. Dies erfordert auch eine größere Vielfalt an Hydrolasen, die spezifisch für die jeweiligen Polysaccharide sind. Grundlegend folgt die Enzymausstattung allerdings dem synergistischen System der Cellulasen. Obwohl im Gegensatz zu Ascomycota nur wenige solcher Enzyme in Basidiomycota beschrieben sind, finden sich beispielsweise für die Hydrolyse von Xylanen analog auch *Endo-1,4- β -xylanasen* (EC 3.2.1.8), *Xylobiohydrolasen* (EC 3.2.1.X) und *β -Xylosidasen* (EC 3.2.1.37) (Bhattacharyya *et al.*, 2008; Rytioja *et al.*, 2014; Niderhaus *et al.*, 2018). Die Seitenketten, beispielsweise Arabinose, werden dagegen von spezifischen Enzymen wie *Arabinofuranosidasen* (EC 3.2.1.55) hydrolysiert (Hashimoto *et al.*, 2011). Durch den quervernetzenden Charakter der Hemicellulosen ist der Zugang für solche Enzyme erschwert. Daher sekretieren Basidomycota eine Reihe an Phenolsäureesterasen (EC 3.1.1.X), die diese Quervernetzungen durch Hydrolyse der Phenolsäureester an den Seitenketten lösen (Abb. 1.2.4) (Cosgrove, 2001; Haase-Aschoff *et al.*, 2013; Nieter *et al.*, 2016).

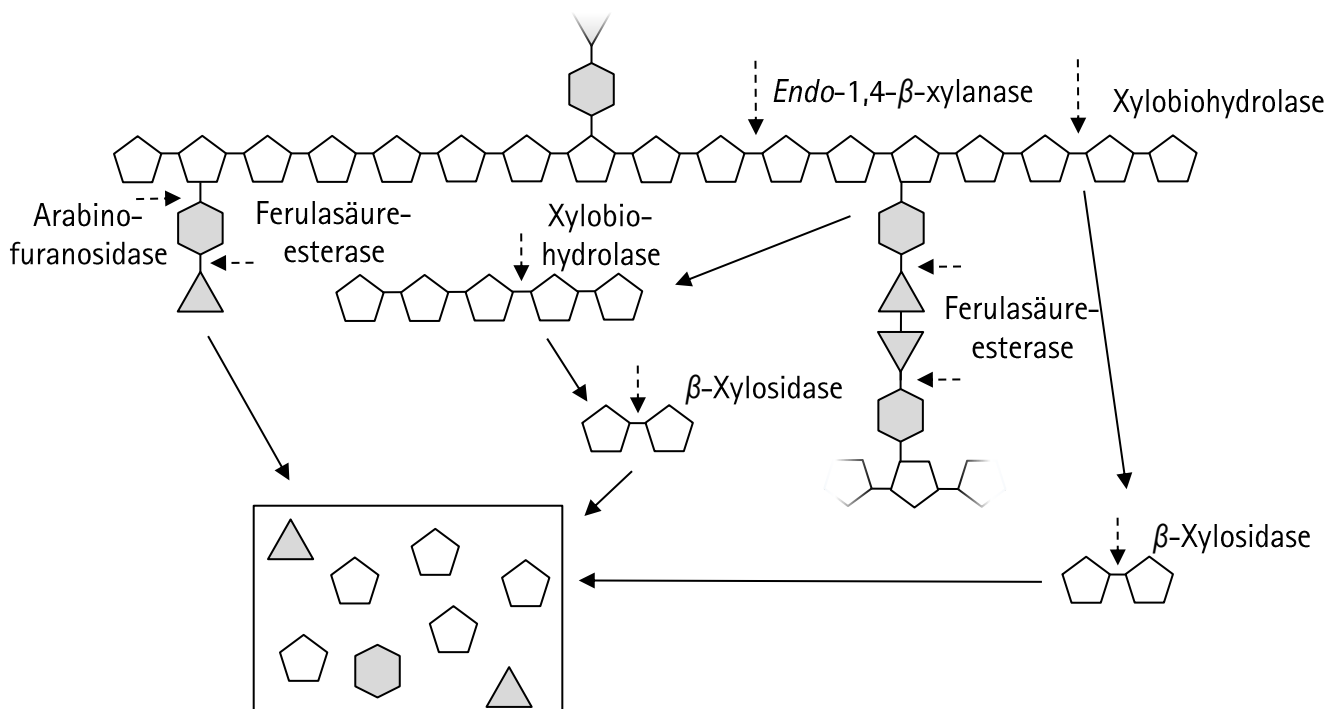


Abb. 1.2.4: Synergistische Hydrolyse von Arabinoxylan durch *Endo-1,4- β -xylanasen*, *Xylobiohydrolasen*, *β -Xylosidasen*, *Arabinofuranosidasen* und *Ferulasäureesterasen* nach Rytioja *et al.* (2014). \square : D-Xylose, \square : L-Arabinose, \triangle : Ferulasäure.

1.2.2.3 Ferulasäureesterasen

Verbreitete Hydroxyderivate der Zimtsäure sind Ferula-, *p*-Cumar- und Kaffeesäure (Abb. 1.2.5). Diese erschweren nicht nur über Quervernetzung die biotechnologische Verwertbarkeit von Lignocellulose, sondern sind auch selbst vielversprechende Vorläufer von Phenolen wie Vanillin oder der Raucharomakomponente 4-Vinylguajakol (Rosazza *et al.*, 1995). Darüber hinaus lassen sich solche Phenolsäuren aufgrund ihrer antioxidativen und antibakteriellen Eigenschaften auch direkt in Lebensmitteln einsetzen, was das wirtschaftliche Interesse an geeigneten Enzymen für die biotechnologische Produktion aus dem ubiquitär vorkommenden Substrat Lignocellulose begründet (Giada, 2012).

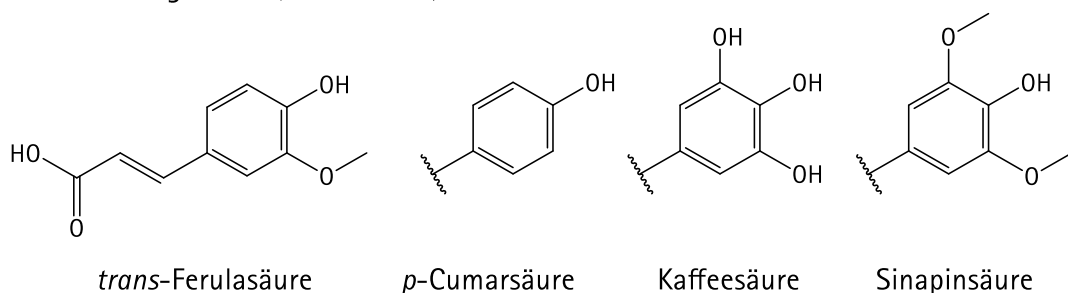


Abb. 1.2.5: Strukturen verbreiteter Hydroxycimtsäuren nach Taofiq *et al.* (2017).

Ferulasäureesterasen (FAEs, EC 3.1.1.73) sind besonders aus den besser beschriebenen Ascomycota bekannt (Dilokpimol *et al.*, 2016). Jedoch werden auch in Basidiomycota immer mehr FAEs beschrieben, die das Potential der Ständerpilze als Genspender für Enzyme für biotechnologische Anwendungen zeigen. So wurde eine heterolog in *Komagataella phaffii* produzierte Esterase aus *Rhizoctonia solani* (RspCAE) bereits erfolgreich zum Abbau von Chlorogensäure für die Produktion von bekömmlicheren Kaffeeprodukten und Apfelsaft verwendet (Siebert *et al.*, 2019a; Siebert *et al.*, 2019b).

Nach einer Konvention werden FAEs ihrem artifiziellen Substratspektrum entsprechend in die Gruppen A bis D unterteilt (Tab. 1.2.1) (Crepin *et al.*, 2004).

Tab. 1.2.1: Klassifizierung von Ferulasäureesterasen nach Crepin *et al.* (2004).

Substrat	Typ A	Typ B	Typ C	Typ D
Ferulasäuremethylester	✓	✓	✓	✓
Sinapinsäuremethylester	✓	-	✓	✓
<i>p</i> -Cumasäuremethylester	✓	✓	✓	✓
Kaffesäuremethylester	-	✓	✓	✓
5-5'-Diferulate	✓	-	-	✓

1.2.3 Lyasen (EC 4.X.X.X)

Lyasen bilden eine Klasse von Enzymen, die nicht-hydrolytisch kovalente Bindungen wie C-C, C-O und C-S spalten (Paul *et al.*, 2019). Es sind Lyasen aus Pflanzen beschrieben, die an dem Abbau von Pektin, einem weiteren Polysaccharid der pflanzlichen Zellwand, beteiligt sind (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002). Dagegen ist bisher eine geringe Zahl solcher Enzyme aus Basidiomycota bekannt. Die wenigen publizierten Lyasen gehören größtenteils zu der Klasse der Decarboxylasen (4.1.1.x), die Metabolite wie Oxalsäure oder Tryptophan unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid umsetzen (Lengeler *et al.*, 1994; da Silva *et al.*, 2011; Kalb *et al.*, 2016).

Phenolsäuredecarboxylasen (PADs, EC 4.1.1.X), die Hydroxyzimtsäuren zu potenten phenolischen Aromastoffen wie der Raucharomakomponente 4-Vinylguajakol umsetzen können, waren zu Beginn dieser Arbeit lediglich aus Bakterien, ascomycetischen Hefen sowie einem höheren Ascomyceten bekannt (Linke *et al.*, 2017).

Alle bekannten Decarboxylasen, die aromatische Kohlenwasserstoffe umsetzen, lassen sich drei Gruppen zuordnen: Prenyliertes-Flavinmononukleotid (PrFMN)-abhängige, zweiwertige-Kationen-abhängige und Kofaktor-unabhängige Enzyme (Payer *et al.*, 2019).

Die prFMN-abhängigen Enzyme sind insbesondere aus der obergärigen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bekannt, da das dazugehörige Enzym Ferulasäuredecarboxylase 1 (FDC1) entscheidend an der Ausbildung des typischen Weizenbieraromas beteiligt ist (Adeboye *et al.*, 2017). Allerdings sind prFMN-abhängige Decarboxylasen nicht spezifisch für Substrate, die eine Hydroxygruppe in *para*-Position enthalten und setzen auch die in Pflanzen verbreitete Zimtsäure zu Styren um. Dieser putativ kanzerogene Stoff kann daher auch in obergärigen Bieren nachgewiesen werden (Schwarz *et al.*, 2012).

Zweiwertige-Kationen-abhängige Phenolsäuredecarboxylasen weisen in ihrem aktiven Zentrum ein Kation, meist Zink oder Mangan, auf. Die meisten bisher publizierten Enzyme dieser Klasse gehören den *o*-Benzoessäuredecarboxylasen (*o*-BDCs) an. Die Kationen in *o*-BDCs chelieren die Carboxylgruppe und die phenolische Gruppe ihrer Substrate. Dadurch kann der aromatische Ring protoniert werden und unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid wird der Aromat zurückgebildet (Payer *et al.*, 2019).

Im Gegensatz zu den anderen Klassen arbeiten Kofaktor-unabhängige PADs unter saurer Katalyse, wodurch kein Kofaktor-regenerierendes System für biotechnologische Prozesse benötigt wird. Der katalytische Mechanismus wurde durch Arbeiten von Gu *et al.* (2011) weitestgehend aufgeklärt (Abb. 1.2.6).

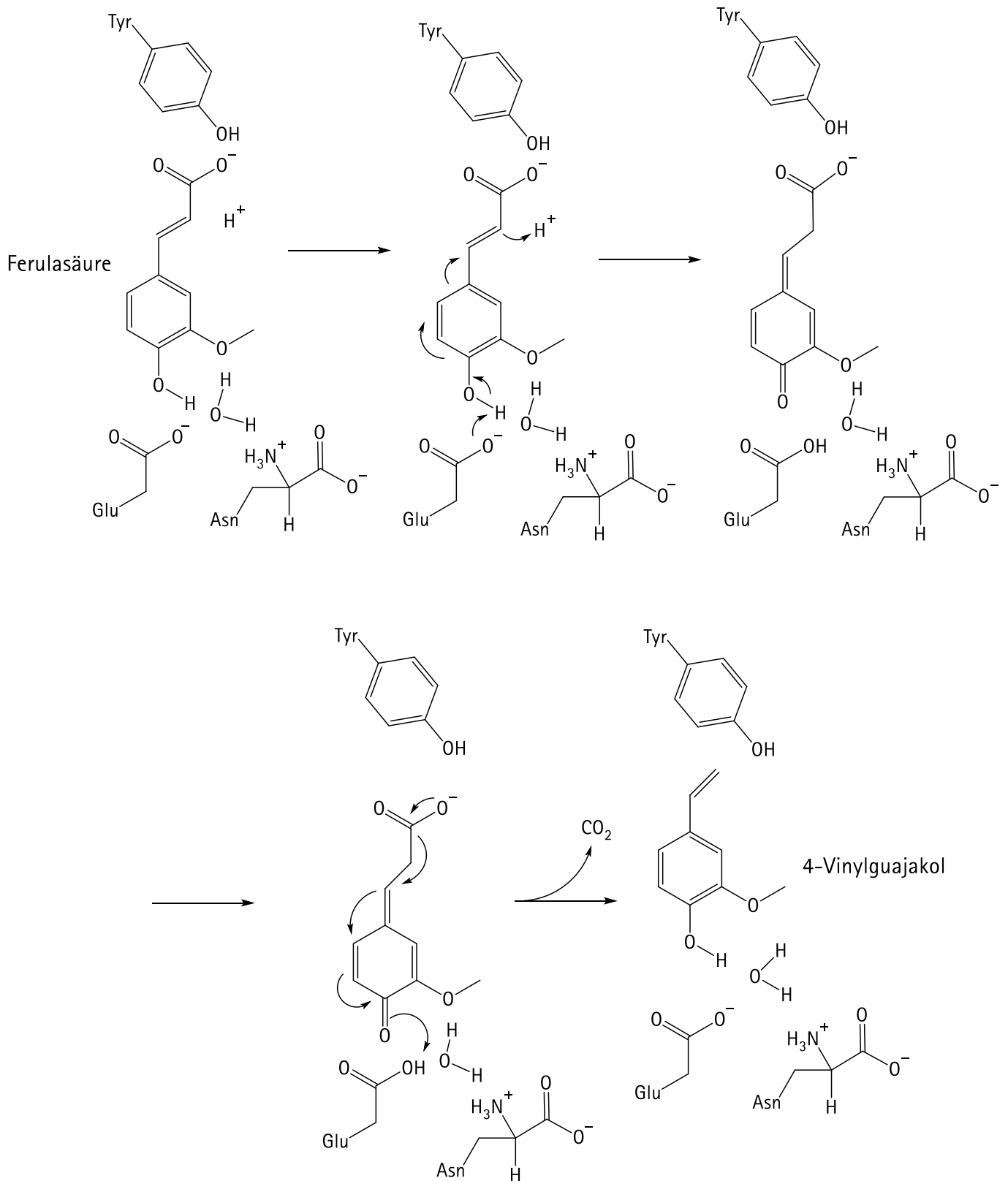


Abb. 1.2.6: Mechanismus der Decarboxylierung von Ferulasäure zu 4-Vinylguajakol nach Gu *et al.* (2011).

Glutamat deprotoniert die phenolische Gruppe der Hydroxyzimtsäure. Das Molekül mesomerisiert zu einem quinoiden Intermediat, das an der α -Position durch ein Proton abgesättigt wird. Mit der Rückbildung des Aromaten als Triebkraft wird die C-C-Bindung zwischen der Carbonsäure und ihrer α -Position unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid gespalten und es entsteht ein vinylnisches Phenol.

Solche Kofaktor-unabhängigen PADs wurden bis zu Beginn dieser Arbeit heterolog ausschließlich in dem Expressionswirt *Escherichia coli* produziert, der nicht uneingeschränkt als *food-grade* gilt (Linke *et al.*, 2017; Mayumi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

1.3 Wirkstoffe

Die zunehmende Industrialisierung der Lebensmittelproduktion und das fortschreitende Wissen in der Lebensmitteltechnologie führen dazu, dass Lebensmitteln eine immer größer werdende Zahl chemischer Stoffe zugeführt wird, die die chemischen, physikalischen und physiologischen Eigenschaften beeinflussen sollen. Dazu gehören unter anderem Aroma-, Konservierungs- und Farbstoffe (Baltés *et al.*, 2011). Bei den Konsumenten sind Stoffe beliebter, die das Prädikat „natürlich“ tragen, was beispielsweise die biotechnologische Produktion durch Organismen bzw. deren Enzyme einschließt (Bel-Rhliid *et al.*, 2018).

1.3.1 Farbstoffe

Die Farbe hat einen enormen Einfluss auf die Erwartung, die ein Konsument an ein Lebensmittel stellt. Dies beeinflusst auch die Kaufabsicht maßgeblich (Spence, 2015; Sukkwai *et al.*, 2018). Darüber hinaus ist bekannt, dass das visuelle Bild eines Produktes auch seine übrige sensorische Wahrnehmung beeinflusst. So wird beispielsweise eingefärbter Weißwein voller und leicht grünlicher Orangensaft saurer wahrgenommen als die ungefärbten Varianten (Delwiche, 2003; Hort *et al.*, 2013).

Von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) wurden 41 Lebensmittelfarbstoffe natürlichen, wie beispielsweise anthocyanhaltiger Rote-Beete-Saft und Curcuma, oder synthetischen Ursprungs, wie Azorubin und Chinolingelb, zugelassen, die nach Bedarf (*quantum satis*) zu bestimmten Lebensmitteln zugesetzt werden dürfen. Relevant für die Zulassung ist neben der Verträglichkeit auch, ob die Färbung zu Verbrauchertäuschungen führt (Europäisches Parlament, 2008; Baltés *et al.*, 2011).

1.3.1.1 Anthocyane

Anthocyane zählen zu den Flavonoiden und gehören zusammen mit Carotinoiden, Chlorophyllen und Betalainen zu den Hauptklassen pflanzlicher Farbstoffe (Chen, 2015). Sie verleihen vielen Pflanzen ihre charakteristische rote oder blaue Farbe. Darüber hinaus schützen sie *in vivo* vor zu hoher UV-Einstrahlung und locken in Blüten und Früchten Tiere an, um Pollen sowie Samen zu verteilen. In Form von Früchten, Säften und Wein sind sie auch ein fester Bestandteil der menschlichen Ernährung (Lee *et al.*, 1998; Mattioli *et al.*, 2020). Obwohl Anthocyane *in vitro* antioxidative Eigenschaften zeigen, gibt es entgegen der verbreiteten öffentlichen Meinung keine wissenschaftlichen Indizien für solche Wirkungen im menschlichen Organismus (Lotito *et al.*, 2006; De Rosso *et al.*, 2008).

Anthocyane sind Polyphenole, die in der Regel aus Stabilitäts- und Löslichkeitsgründen glykosidiert vorliegen. Ihre Aglycons, die Anthocyanidine, beinhalten das farbgebende π -System aus drei konjugierten Ringen. Die Absorptionsmaxima werden dabei durch die Substituenten am B-Ring beeinflusst (Abb. 1.3.2). Zudem können Anthocyanidine je nach pH-Wert als Quinoid, Flavylium-Kation oder Chalkon mit jeweils verschiedenen π -Systemen vorliegen, sodass sich die Maxima pH-abhängig verschieben (Brouillard *et al.*, 1977; de Pascual-Teresa *et al.*, 2010).

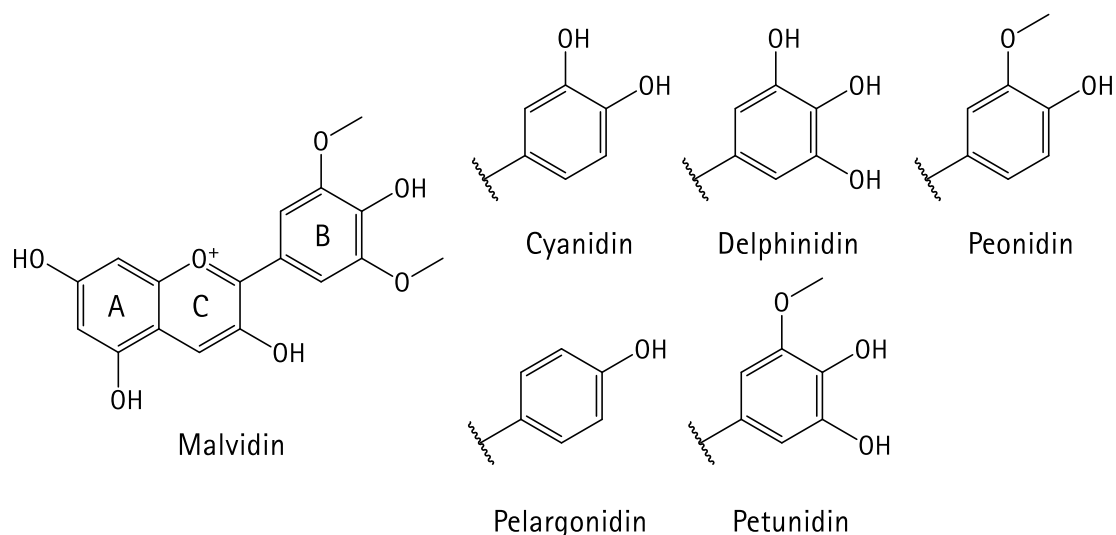


Abb. 1.3.1: Flavyliumkationen verbreiteter Anthocyanidine nach Detering *et al.* (2018).

Die Grundbausteine der Anthocyanidin-Biosynthese sind *p*-Coumaroyl-CoA und vier Malonyl-CoA-Einheiten. Das Enzym Chalkon-Synthase bildet aus ihnen ein Chalkon, dessen mittlerer Ring durch das Enzym Chalkon-Isomerase geschlossen wird. Nach einigen weiteren Modifikationen werden die Anthocyanidine schließlich über das Enzym Anthocyanidin-Synthase fertiggestellt (He *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zur Biosynthese der Anthocyane ist zu ihrem Abbau wenig bekannt, obwohl dieser nachweislich *in vivo* stattfindet. Es wird vermutet, dass Enzyme wie Polyphenoxidasen, Peroxidasen, Laccasen und β -Glykosidasen die Anthocyane über Abspaltung des Glykosids zu braunen Polymeren umsetzen (Oren-Shamir, 2009; Fang *et al.*, 2015). Im Rahmen von Entfärbungsversuchen neuer Waschmittelenzyme wurde das bisher unbekannte *in-vitro*-Abbauprodukt 2,6-Dimethoxybenzochinon (DMBQ) identifiziert, das durch die Laccase-induzierte Spaltung der C-C-Bindung zwischen B- und C-Ring von Malvidin-Glykosiden gebildet wird (Abb. 1.3.2) (Detering *et al.*, 2018).

DMBQ ist in vielen Pflanzen nachgewiesen und besitzt eine antibakterielle sowie antifungale Wirkung (Nishina *et al.*, 1991; Ueno *et al.*, 2014). Vor Beginn dieser Arbeit wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen Anthocyanabbau und DMBQ-Bildung *in vivo* beschrieben.

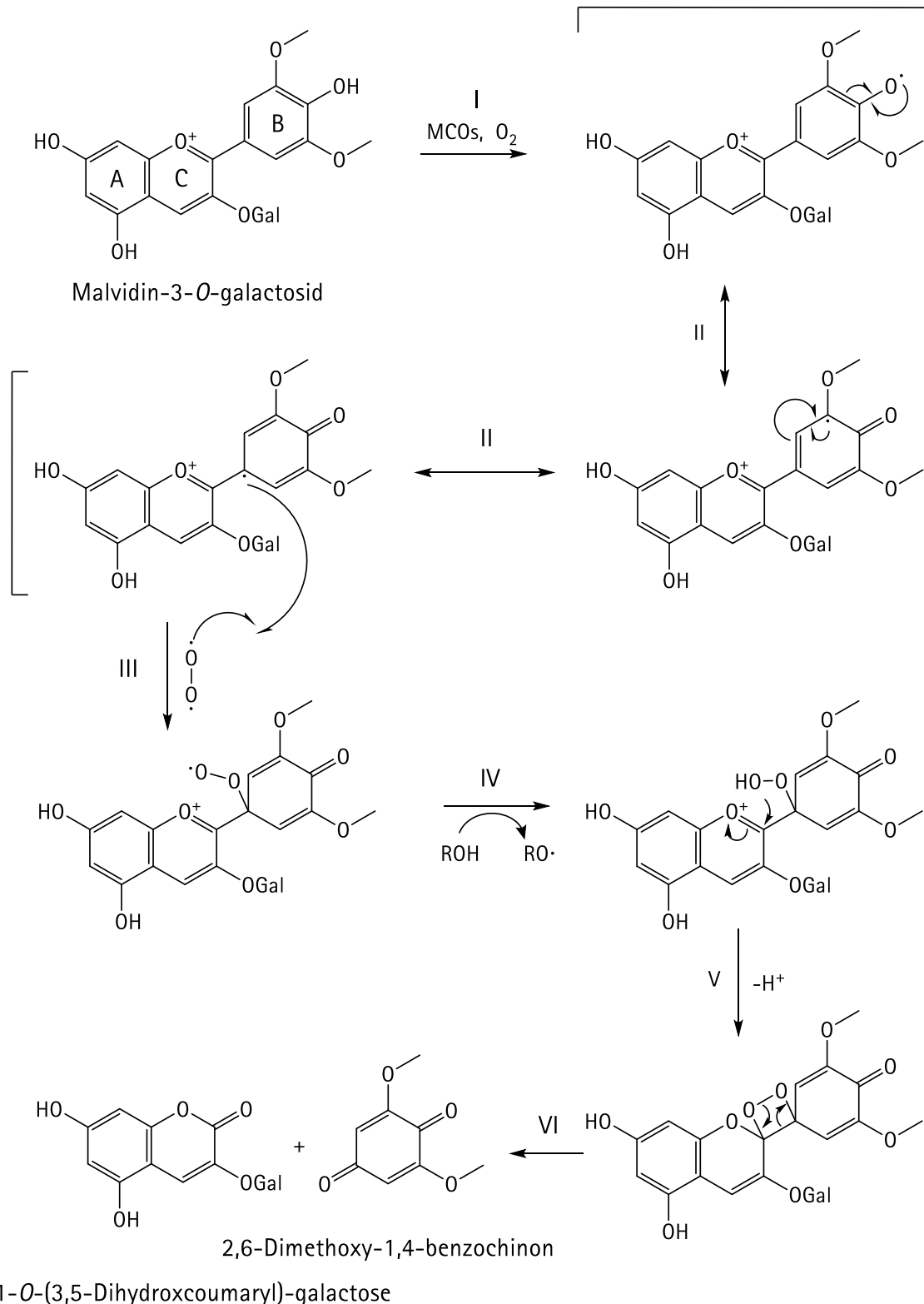


Abb. 1.3.2: Postulierter Mechanismus des durch Multikupferoxidasen (MCOs) katalysierten Abbaus des Flavylumkations von Malvidin-3-O-galactosid zu 2,6-Dimethoxybenzochinon nach Detering *et al.* (2018). Die phenolische Hydroxygruppe des B-Rings wird zu einem Phenoxyradikal oxidiert (I) und durch Mesomerie zum tertiären Kohlenstoff transloziert (II). Sauerstoff als Diradikal greift an dieser Position an und bildet ein Peroxyradikal (III), das folgend zu einem Peroxid reduziert wird (IV). Ein freies Elektronenpaar des Peroxides greift die benachbarte elektrophile Position nukleophil an und bildet ein Endoperoxid (V). Der instabile Vierring wird unter Spaltung der C-C-Bindung zwischen B- und C-Ring geöffnet, sodass DMBQ und ein Coumaringlykosid als Produkte entstehen (VI).

1.3.2 Konservierungsstoffe

Trotz etablierter physikalischer Konservierungsmethoden wie Kühlketten, Pasteurisierung und Lagerung unter Inertgas, werden viele Lebensmittel chemisch konserviert, wenn andere Methoden nicht anwendbar sind. Auch Zusätze wie Zucker, Salz oder Essig sind nicht universell einsetzbar, da sie die sensorischen Eigenschaften eines Produktes verändern (Amit *et al.*, 2017). Von der EFSA ist eine Reihe von Konservierungsstoffen zugelassen, die keimhemmend wirken und auf diese Weise den mikrobiellen Verderb eines Produktes verlangsamen (Europäisches Parlament, 2008).

Sorbin- und Benzoessäure wirken als Säuren pH-abhängig, da sie im protonierten und ungeladenen Zustand die Membran des Erregers besser passieren können. In den Zellen inhibieren beide Stoffe Stoffwechselforgänge, wobei Sorbinsäure effektiver gegen pilzliche und Benzoessäure effektiver gegen bakterielle Kontaminationen wirkt. Entsprechend werden beide Stoffe, teils in Kombination, in eher sauren Produkten wie Marinaden, Getränken und Obsterzeugnissen eingesetzt (Baltes *et al.*, 2011; Zeece, 2020).

Auch Parabene, Ester der *p*-Hydroxybenzoessäure, können zur Hemmung von Pilzen und Bakterien eingesetzt werden. Durch die Esterbindung wird eine pH-Abhängigkeit verhindert und die Polarität herabgesetzt. Dadurch wirken Parabene auch bei basischen pH-Werten und können durch ihre hydrophoben Eigenschaften besser Lipidmembranen durchdringen (Baltes *et al.*). Da Gesundheitsbedenken wie die Beeinflussung des Hormonhaushaltes bestehen, ist die Anwendung auf wenige Produkte begrenzt (Europäisches Parlament, 2008; Leppert *et al.*, 2020). Schwefelige Säure und ihre Salze sind vor allem in Trockenfrüchten und Weinen verbreitet, da diese nicht nur Wildhefen und andere Mikroorganismen hemmen, sondern zusätzlich sowohl die enzymatische Bräunung als auch die MAILLARD-Reaktion inhibieren und damit die natürliche Farbe der Produkte bewahren (García-García *et al.*, 2016).

Da das Bewusstsein der Konsumenten für Inhaltsstoffe und Gesundheitsaspekte von Lebensmitteln zunimmt, wird nach natürlichen Alternativen für chemische Konservierungsstoffe gesucht. Naturprodukte wie ätherische Öle und antimikrobielle Peptide könnten die konventionellen Konservierungsstoffe ersetzen (Sośnicka, 2019). Auch DMBQ (vgl. Kapitel 1.3.1.1) könnte künftig als natürliche und in vielen Pflanzen vorkommende Substanz mit antibakteriellen und antifungalen Eigenschaften nach erfolgter Zulassung in Lebensmitteln eingesetzt werden (Nishina *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2014; Otto *et al.*, 2016).

1.3.2.1 Räucherrauch

Das Räuchern stellt eine der ältesten Techniken zur Behandlung von Lebensmitteln dar. Spuren reichen bis in die Steinzeit vor 90.000 Jahren zurück (Möhler, 1978).

Bei der Pyrolyse von Holz entsteht Räucherrauch, der für die Konservierung von Lebensmitteln, insbesondere Fleisch- und Fischwaren, eingesetzt wird. Verantwortlich hierfür sind unzählige antibiotisch wirksame Oxidationsprodukte der Lignocellulose wie Formaldehyd, Methanol, Phenole und Kresole (Baltes *et al.*, 2011).

Obwohl das Räuchern seit Jahrtausenden praktiziert wird, wachsen die Gesundheitsbedenken. Formaldehyd und Kresole bilden zusammen mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) und heterozyklischen Aminen (HCAs) eine Gruppe potenter Kanzerogene, die zu einer Kontamination des behandelten Lebensmittels führen (Woods, 2003; Europäisches Parlament, 2006b; Hokkanen *et al.*, 2018).

Um die von der EFSA eingeführten Grenzwerte für PAKs (Europäisches Parlament, 2006a) in Räuchergut einzuhalten, können die Räuchertemperaturen gesenkt werden. Für das Kalträuchern wird das Räuchergut bei deutlich geringeren Temperaturen behandelt als beim Heißräuchern (15-25 vs. 55-80 °C), was die Konzentration von PAKs im Produkt reduziert (Woods, 2003; Šimko, 2009; Manea *et al.*, 2017).

Durch die neuartigen Konservierungsmethoden und -stoffe rückt die konservierende Wirkung von Räucherrauch in den Hintergrund. Vielmehr ist das rauchige, herzhaft und mit Fleisch assoziierte Aroma von Interesse, das im Wesentlichen durch Phenole, Carbonyle und Guajakole hervorgerufen wird (Kostyra *et al.*, 2006).

Seit dem späten 20. Jahrhundert wird an Rauchkondensaten gearbeitet, um das beliebte Aroma auf Lebensmittel übertragen zu können, ohne diese selbst räuchern zu müssen (Miler *et al.*, 1965; Fessmann, 1972). Durch Fraktionierung von modernen Rauchkondensaten können zudem unerwünschte Stoffe wie PAKs zum größten Teil aus dem Produkt entfernt werden. Dies führt zu gesünderen Lebensmitteln, bedarf jedoch auch einer adäquaten Entsorgung der toxischen Fraktionen (Šimko, 2018).

Ein moderner und nachhaltigerer Ansatz wird biotechnologisch verfolgt. Die Bildung von 4-VG aus Ferulasäure als eine der Schlüsselkomponenten des Raucharomas ist nicht nur thermisch im Räucherprozess sondern auch enzymatisch möglich. Dadurch kann eine Bildung von unerwünschten und toxischen Begleitstoffen gänzlich ausgeschlossen werden (Linke *et al.*, 2017). Derartige Enzyme könnten künftig mit weiteren degradativen Enzymen wie FAEs kombiniert werden, um Ferulasäure nachhaltig und kostengünstig aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie zu gewinnen (Nieter *et al.*, 2016; Nieter *et al.*, 2017).

1.3.3 Aromastoffe

Aromastoffe sind flüchtige und kleine Moleküle, die olfaktorisch wahrgenommen werden können. Zusammen mit Farbstoffen prägen sie den sensorischen Eindruck eines Lebensmittels (Belitz *et al.*, 2009). Neben der direkten nasalen Aufnahme können Aromastoffe auch retronasal durch den Rachen wahrgenommen werden. Entsprechend beeinflusst der Geruch eines Lebensmittels auch seine Geschmackswahrnehmung (Burdach *et al.*, 1984; Blankenship *et al.*, 2019).

Durch ihre sensorischen Eigenschaften werden Aromastoffe in vielen Anwendungsbereichen wie Lebensmittel, Kosmetik und Pharmazie mit einem geschätzten jährlichen Marktwert von 46 Mrd. US \$ eingesetzt. Die typischen Produktionsprozesse sind hierbei die Extraktion aus Pflanzen sowie die chemische Synthese, die Nachteile wie geringe Ausbeuten und Ernteabhängigkeit bzw. harsche Reaktionsbedingungen, fehlende Regioselektivität und niedrigerer Marktwert mit sich bringen (Braga *et al.*, 2018). Besonders von industrieller Bedeutung sind Schlüsselaromastoffe, die einen großen Teil der oft sehr komplexen natürlichen Aromakompositionen abbilden. Bedeutende Beispiele hierfür sind 1-Octen-3-ol (Champignon), 2-Furfurylthiol (Kaffee) und 4-(*p*-Hydroxyphenyl)butan-2-on (Himbeere) (Belitz *et al.*, 2009). Eine Alternative bietet die nachhaltigere biotechnologische Produktion von Aromastoffen, die neben fehlender Nebenproduktbildung auch die Deklaration „natürlich“ ermöglicht (Berger, 2015; Bel-Rhliid *et al.*, 2018). Besonders bieten sich hierfür degradative Enzyme aus Basidiomycota an, da sie lignocellulosehaltige industrielle Nebenprodukte als eine bisher unerschöpfte und ubiquitär vorhandene Ressource umsetzen und daraus eine Vielzahl von Aromastoffen bilden (Jahn *et al.*, 2020). Basidiomycetische Enzyme für die biotechnologische Produktion des Raucharomas 4-Vinylguajakol waren dagegen vor Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die Klasse der Basidiomycota bringt eine große Zahl von verzehrbaren Fruchtkörpern hervor. Durch ihre einzigartige Enzymvielfalt gehören sie zu den wenigen Organismen, die Lignocellulose degradieren und nutzbar machen können. Trotz ihrer weltweiten Bedeutung als Speisepilze ist das Potential der Basidiomycota als Genspender für potente biotechnologische Enzyme nicht annähernd ausgeschöpft.

Die Biotechnologie bietet die Möglichkeit, mittels geeigneter Enzyme unter milden Reaktionsbedingungen natürliche Wirkstoffe für Lebensmittel wie Aroma- und Konservierungsstoffe zu synthetisieren. Pflanzliche Nebenprodukte der Lebensmittelindustrie können dabei nachhaltige und günstige Ausgangsstoffe bilden.

In dieser Arbeit sollten zwei neue Wirkstoffe für Lebensmittel biotechnologisch mittels degradativer Enzyme aus Basidiomycota erzeugt werden.

Die erste Phenolsäuredecarboxylase aus Basidiomycota sollte isoliert und heterolog in dem lebensmittelkompatiblen Wirt *Komagataella phaffii* GS115 produziert werden. Das Enzym sollte nach einer Reinigung biochemisch charakterisiert und mit homologen Enzymen aus Bakterien und Ascomycota verglichen werden. Außerdem sollte die Eignung für einen künftigen Prozess für die Produktion des Raucharomas 4-Vinylguajakol aus Ferulasäure als Alternative zu herkömmlichen und mitunter gesundheitsschädlichen Raucharomen überprüft werden. Hierfür sollte das Enzym kovalent immobilisiert werden, um eine kontinuierliche Prozessführung mit einer Festbettsäule zu ermöglichen.

In vorangegangenen Studien wurde die antibakterielle und antifungale Substanz 2,6-Dimethoxybenzochinon (DMBQ) als *in-vitro*-Abbauprodukt des Anthocyan Malvidin-3-*O*-galactosid detektiert. Zunächst sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob dieser Abbauweg auch *in vivo* vorliegt und durch die Verletzung von Kompartimenten ausgelöst wird. Schließlich sollte ein Produktions- und Reinigungsprozess über den Abbau von Anthocyanen aus Weintrester durch eine Laccase aus *Pleurotus pulmonarius* etabliert werden, um *food-grade* DMBQ für die mögliche Anwendung als Konservierungsstoff in Lebensmitteln bereitzustellen.

3 Vorwort zur Publikation „Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants”

Konventionelles Räuchern generiert neben seiner konservierenden Wirkung auch eine Reihe potenter Kanzerogene, die das Räuchergut kontaminieren und ungeachtet gesetzlich vorgeschriebener Grenzwerte eine latente Gesundheitsgefahr darstellen. Moderne, fraktionierte Rauchkondensate mögen die Konzentrationen solcher Kontaminanten im Produkt senken, jedoch müssen die nicht genutzten Fraktionen entsorgt werden (vgl. Kapitel 1.3.2.1).

Eine nachhaltige Alternative stellt die enzymatische Decarboxylierung von Ferulasäure zu einem Schlüsselaromastoff des Raucharomas, 4-Vinylguajakol, dar (vgl. Kapitel 1.2.3). Natürliche Ferulasäure kommt in großen und bisher weitgehend ungenutzten Mengen in der pflanzlichen Zellwand vor, in der sie quervernetzend deren Stabilität fördert. Daher kann sie günstig aus Nebenprodukten der Lebensmittelindustrie mittels Ferulasäuresterasen gewonnen werden (vgl. Kapitel 1.2.2.3).

Viele der bisher charakterisierten degradativen Enzyme aus Basidiomycota haben sich als äußerst potent und vielseitig erwiesen (vgl. Kapitel 1.2). Dennoch sind insgesamt im Vergleich zu anderen Spezies noch sehr wenige Enzyme publiziert, was sich insbesondere bei der Klasse der Lyasen zeigt (vgl. Kapitel 1.2.3). So sollte in dieser Arbeit die erste basidiomycetische Ferulasäure-Decarboxylase (FAD) identifiziert, heterolog produziert und biochemisch charakterisiert werden. Zudem sollte die bioprozessorientierte Eignung des Enzyms durch Vergleich der Eigenschaften mit publizierten FADs sowie durch eine kovalente Immobilisierung auf Agarose-Beads überprüft werden.

An dieser Publikation waren Frau Katharina Mundry sowie Herr Prof. Berger beteiligt. Frau Mundry produzierte die ScoFAD heterolog in *Komagataella phaffii* und führte einige Experimente zur biochemischen Charakterisierung durch. Herr Prof. Berger war in seiner Funktion als Arbeitsgruppenleiter für die Projektidee, Betreuung sowie Bereitstellung der aufgewendeten Drittmittel verantwortlich.

Die nachfolgende Arbeit wurde in *PLOS One* veröffentlicht (Detering *et al.*, 2020b).

4 Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants

Thorben Detering, Katharina Mundry, Ralf G. Berger

Abstract

Traditional smoke flavours bear the risk of containing a multitude of contaminating carcinogenic side-products. Enzymatic decarboxylation of ferulic acid released from agro-industrial side-streams by ferulic acid esterases (FAE) enables the sustainable generation of pure, food grade 4-vinylguaiacol (4-VG), the impact compound of smoke flavour. The first basidiomycetous ferulic acid decarboxylase (FAD) was isolated from *Schizophyllum commune* (ScoFAD) and heterologously produced by *Komagataella phaffii*. It showed a molecular mass of 21 kDa, catalytic optima at pH 5.5 and 35°C, and a sequence identity of 63.6% to its next relative, a FAD from the ascomycete *Cordyceps farinosa*. The ScoFAD exhibited a high affinity to its only known substrate ferulic acid (FA) of 0.16 mmol L⁻¹ and a turnover number of 750 s⁻¹. The resulting catalytic efficiency k_{cat}/K_M^{-1} of 4,779 L s⁻¹ mmol⁻¹ exceeded the next best known enzyme by more than a factor of 50. Immobilised on AminoLink Plus Agarose, ScoFAD maintained its activity for several days. The combination with FAEs and agro-industrial side-streams paves the way for a new generation of sustainable, clean, and safe smoke flavours.

4.1 Introduction

The growing customer demand for natural flavours goes hand in hand with new enzymatic tools providing an alternative access to flavour compounds, which were formerly synthesised from crude oil by often harsh methods. Basidiomycetes, one of the two main divisions of higher fungi, offer a great and almost untouched diversity of biocatalysts. Preferably growing on wood, one of the most recalcitrant natural materials, xylophilic fungi feature potent oxidoreductases and hydrolases, such as laccases and phenolic acid esterases (Behrens *et al.*, 2017; Nieter *et al.*, 2017). In line with this, many basidiomycetes produce various and sometimes unique aroma compounds. Besides the well-known champignon flavour impact compound 1-octen-3-ol, they are also capable of producing many other and sometimes rather unusual flavours, such as the 5,7,9-decatrienones with pineapple notes and (+)-nootkatone with grapefruit notes (Kolwek *et al.*, 2018; Grosse *et al.*, 2019).

4-VG, the impact flavour compound of smoke flavour, is produced *via* decarboxylation of FA. Dimers of this phenolic acid crosslink the polysaccharides of plant cell walls, hence increasing their mechanical stability. It is thus present in countless side-products of the food industries, such as cereal brans and sugar beet pulp (Iiyama *et al.*, 1994; Ishii, 1997; Zhao *et al.*, 2008). Its decarboxylation can take place either thermally, as during woodchip pyrolysis, or enzymatically catalysed at mild conditions *via* ferulic acid decarboxylases (FADs) (Fig. 4.1.1).

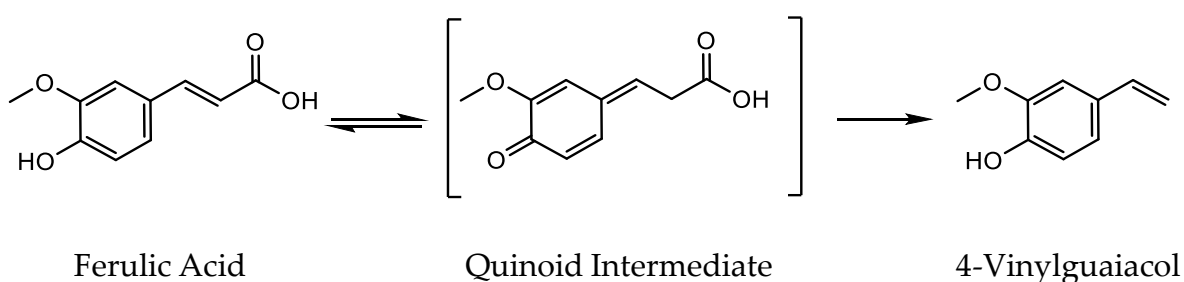


Fig. 4.1.1: Reaction scheme of the decarboxylation of FA forming 4-VG catalysed by FADs as proposed by Gu *et al.* (2011).

Following the mechanism proposed by Gu *et al.*, the phenolic hydroxyl group is deprotonated and turned into a quinoid intermediate. The carboxylic group then exits the molecule as carbon dioxide leaving the stable vinylic end product (Gu *et al.*, 2011).

In contrast to the enzymatic catalysis, the conventional smoking process inevitably generates a number of potent carcinogens including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heterocyclic amines (HCAs), which may then contaminate smoked foods (Woods, 2003; Hokkanen *et al.*, 2018). Laborious strategies, such as fractionating aroma-rich smoke condensates, may provide healthier products, but require an adequate subsequent disposal of all toxic fractions. Consequently, targeting a new generation of clean, safe and sustainable smoke flavours, new methods are needed producing only the required flavour compounds.

FADs are known from various bacteria, yeasts and further ascomycetes and are divided into three subclasses, namely prFMN dependent, divalent metal dependent and cofactor independent enzymes (Payer *et al.*, 2019). The prominent yeast enzyme FDC1 belongs to the class of prFMN dependent decarboxylases and requires a cofactor regenerating system. It shows broader substrate specificities resulting in the formation of the putative carcinogen styrene from cinnamic acid, as it is present in top-fermented beverages, such as wheat beer, and is thus not a suitable candidate (Schwarz *et al.*, 2012; Adeboye *et al.*, 2017). Cofactor independent decarboxylases including bacterial, plant and ascomycetous FADs, require a mandatory hydroxyl group in *para* position of the substrate and are not capable of producing styrene. In contrast to FDC1, the independency from external cofactors turns them into promising candidates for a bioprocess producing 4-VG and its derivatives. However, these enzymes are solely available from heterologous production in *Escherichia coli* (*E. coli*), a host which is not generally regarded as food-grade. Thus, a potent decarboxylase produced in a safe host is still needed.

This work presents the isolation, biochemical and kinetic characterisation, and classification of a new and highly affine FAD from the basidiomycete *Schizophyllum commune*, its heterologous production in *Komagataella phaffii* and its immobilisation on AminoLink Plus Agarose. The objective was to develop a green chemistry approach as an alternative to conventional smoking techniques, creating a convenient source of pure, natural 4-VG without any unwanted and harmful by-products.

4.2 Material and methods

4.2.1 Chemicals, reagents, and substrates

All chemicals, if not marked differently, were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), or Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany). Enzymes were purchased from Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Roth, Germany), Nippon Genetics (Dueren, Germany), and New England Biolabs (Ipswich, United States), and oligonucleotides were synthesised by Microsynth Seqlab GmbH (Goettingen, Germany).

4.2.2 Cultivation of *Schizophyllum commune* and RNA isolation

The basidiomycete *Schizophyllum commune* strain No. 1024 was purchased from the DSMZ (Braunschweig, Germany) and pre-grown for 6 d at 24°C and 150 rpm in SNL media (30.0 g L⁻¹ D-(+)-glucose-monohydrate, 4.5 g L⁻¹ L-asparagine monohydrate, 3.0 g L⁻¹ yeast extract, 1.5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄; 1.0 mL L⁻¹ trace element solution (0.08 g L⁻¹ FeCl₃ x 6 H₂O, 0.09 g L⁻¹ ZnSO₄ x 7 H₂O, 0.03 g L⁻¹ MnSO₄ x H₂O, 0.005 g L⁻¹ CuSO₄ x 5 H₂O, 0.4 g L⁻¹ EDTA); pH 6). Inducing the expression of the ScoFAD encoding gene, 25 mL of the pre-culture was added to 250 mL 100 mL L⁻¹ SNL containing 10 g L⁻¹ wheat bran. The culture was further grown at 24°C and 150 rpm and the intracellular ferulic acid decarboxylase activity was monitored disrupting cells with a homogenisator (Precellys 24, Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, France). Mycellium samples were stored overnight in RNAlater solution (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth, Germany) and the total RNA was isolated according to the InnuSPEED Bacteria/Fungi RNA Kit (Analytik Jena, Jena, Germany).

4.2.3 Gene amplification and cloning

The cDNA of the isolated total RNA was synthesised using the FastGene Scriptase II cDNA Kit (Nippon Genetics, Dueren, Germany) and an oligo (dT) primer. Then, the cDNA of the target gene was amplified applying the Phusion High Fidelity Polymerase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth, Germany) with the two specific primers ScoFAD-For (5'-TCGAATATGCCTGGCACTTGG-3') and ScoFAD-Rev (5'-TCCATCACATCTCTACAGGGTAGG-3') derived from a genomic sequence (XM_003032814.1) published by Ohm *et al.* (2010).

The product was blunt-end ligated to pUC57 linearised with Eco321. The consensus sequence was obtained from five independent positive clones.

4.2.4 Heterologous expression in *Komagataella phaffii*

The amplified gene was re-amplified to produce N-terminal 10xHis-tagged variants using the primers ScoFAD-For-10xHis (5'-CATCATCATCATCACCATCACCAACCACCCCGGCACTTGGGAAGAAG-3') and ScoFAD-Rev2 (5'-TCACAGGGTAGGCCAGCTCAAG-3') removing the start codon. The product was dephosphorylated by Antarctic Phosphatase (AnP) and blunt-end ligated to pPIC9 cut with SnaBI and phosphorylated by T4 Polynucleotide Kinase. The construct linearised by PmeI was inserted into the AOX1 locus of competent *K. phaffii* GS115 cells *via* electroporation (Eporator, Eppendorf, Hamburg, Germany) based on a method of (Lin-Cereghino *et al.*, 2005).

The transformed cells were cultivated on histidine-deficient plates and 96 clones were separately cultivated and screened for enzyme activity analogously to (Nieter *et al.*, 2016). The clone with the highest detectable activity was used for an up-scaled cultivation in 100 mL BMMY media for 4 d at 20°C and 200 rpm after inoculation with 10 mL pre-culture grown for 2 d at 28°C and 200 rpm in YPD.

4.2.5 BRADFORD assay

For quantitation of protein concentration, a BRADFORD-type assay was used (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, United States). The procedure followed the manual supplied by the manufacturer. The absorption at 595 nm was measured in triplets in a microplate reader (Eon, BioTek, Winooski, United States) against external BSA calibration in the range between 0.1 and 2.0 mg L⁻¹.

4.2.6 Ni-NTA affinity chromatography and SDS-PAGE

The heterologously produced and His-tagged protein was purified *via* FPLC-based Ni-chelate affinity chromatography (Ni-NTA). Columns were equipped with 10 mL (bed volume) Protino Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Dueren, Germany). The chromatography (NGC Quest 10, Bio-Rad, Hercules, United States) with the buffers A (0.5 mmol L⁻¹ sodium chloride, 20 mmol L⁻¹ Tris, and 20 mmol L⁻¹ imidazole) and B (0.5 mmol L⁻¹ sodium chloride, 20 mmol L⁻¹ Tris, and 500 mmol L⁻¹ imidazole) was performed as follows: 16 mL of centrifuged sample (15 min, 15,000 x g) was loaded at a flow rate of 0.25 mL min⁻¹, the column was washed 40 mL buffer A, further 40 mL 10 mL L⁻¹ B, and 24 mL 50 mL L⁻¹ B, and the sample was eluted with 16 mL buffer B followed by washing with 24 mL buffer A. Fractions were collected between 112 and 132 mL of the total volume. The elution fractions were pooled, desalted, and concentrated in spin filters with a cut-off of 3 kDa (VIVASPIN 20, Sartorius, Goettingen, Germany).

4.2.7 Decarboxylase activity assay and HPLC

At various stages, the decarboxylase activity of samples was quantitated using a generic ferulic acid decarboxylase assay. 25 µL of adequately diluted and centrifuged (15 min, 15,000 xg) sample was mixed with 10 µL Bis-Tris buffer (500 mmol L⁻¹, pH 6) and 65 µL substrate solution (3 mmol L⁻¹ FA), and incubated at 20°C for 30 min. The reaction was stopped *via* the addition of 100 µL of acetonitrile. To determine the pH and temperature dependencies of the recombinant enzyme, the buffer was changed to 400 mmol L⁻¹ Britton-Robinson buffer (400 mmol L⁻¹ H₃BO₃, 400 mmol L⁻¹ H₃PO₄, 400 mmol L⁻¹ CH₃COOH) in the range between pH 2 and 12 and the incubation temperature was set between 5 and 70 °C. For the stability experiments, the enzyme solution was pre-incubated at the respective conditions for 60 min. The samples were analysed using HPLC (LC-10, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany) equipped with a reversed phase column (Chromolith Performance RP-18e reversephase column, 100 x 4.6 mm, Merck, Darmstadt) and a UV/VIS detector (SPD-10A VP, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germany). For the separation of FA and 4-VG in 10 µL samples, a stepwise gradient using 1 mL L⁻¹ formic acid (A) and acetonitrile (B) as eluents was performed at a total flow rate of 1.5 mL min⁻¹: loading the sample in 1.35 mL min⁻¹ A and holding for 0.05 min, gradient to 1.05 mL min⁻¹ A in 0.1 min, 1.05–0.75 mL min⁻¹ A in 1.95 min, 0.75–0.045 mL min⁻¹ A in 0.25 min, 0.045–0 mL min⁻¹ in 0.95 min, 0–1.275 mL min⁻¹ A in 0.4 min, and 1.275–1.35 mL min⁻¹ in 1.3 min.

The 4-VG concentration was quantitated from the corresponding peak at 263 nm using external calibration. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required for converting 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ FA at given conditions. All measurements were obtained from triplets of independent samples. The purity was confirmed by GC-MS as described previously (Linke *et al.*, 2017).

4.2.8 Determination of kinetic constants

Determining the affinity and catalytic efficiency parameters, the decarboxylase activity assay was modified applying 0.698 μg of enzyme along with 10 μL of Bis-Tris buffer (500 mmol L^{-1} , pH 6) and the following FA concentrations in a regular reaction volume of 100 μL : 33, 65, 98, 130, 163, 195, 228, 260, 293, 325, 390, 455, 520, 585, 650, 813, 975, 1138, 1300, 1463, 1625, 1788, and 1950 μM . The reaction was terminated adding 100 μL of acetonitrile after an incubation for 15 min at 35°C. The conversion rate was calculated from the regular HPLC analysis and K_M as well as k_{cat} values were determined by SigmaPlot 12.5 (Systat software) using nonlinear regression and the MICHAELIS-MENTEN equation.

4.2.9 Multiple sequence alignment

The obtained sequence of the ScoFAD was aligned against three published phenolic acid decarboxylases using ClustalW (Cornway Institute, UCD, Dublin, Ireland). The parameters were as follows: Gap open penalty: 10.0, gap extension penalty: 0.05, hydrophilic residues: GPSNDQERK, hydrophilic gaps: yes, weight matrix: BLOSUM.

4.2.10 Immobilisation

The covalent immobilisation was based on a protocol adapted from (Siebert *et al.*, 2019b).
Modified

spin columns were equipped with a polyethylene filter (30 μm pore diameter) and loaded with 200 μL AminoLink Plus Coupling Resin (Thermo Scientific™, Waltham, United States) corresponding to 100 μL bed volume and 4.7 mg dry agarose. The resin was washed by adding 600 μL of coupling buffer (0.1 mol L^{-1} sodium phosphate, 0.15 mol L^{-1} sodium chloride, pH 7.2) and draining *via* gravity. Equal volumes of the protein sample and coupling buffer were mixed and samples were stored for the calculation of the coupling efficiency.

200 μL of this mixture and 4 μL cyanoborohydride solution (5 mol L^{-1} NaCNBH_3 in 1 mol L^{-1} NaOH) were added to the column, which was sealed and agitated overnight at 4 °C. The flow-through was collected and the coupling efficiency was calculated with 29.8 mg g^{-1} measuring the protein content before and after the coupling reaction by BRADFORD assay. Further, the resin was washed with 600 μL coupling buffer and 400 μL quenching buffer (1 mol L^{-1} Tris-HCl). Quenching was performed adding 200 μL quenching buffer and 4 μL cyanoborohydride solution prior to agitation at 4 °C for 30 min. Two washing steps with 600 μL wash buffer each (1 mol L^{-1} NaCl) were applied, leaving the immobilisate ready for further analysis. To determine the activity of the immobilisate a modified assay, 2.5 mL ddH₂O, 1 mL buffer (Bis-Tris, 500 mM, pH 6) and 6.5 mL of 3 mM ferulic acid were combined with the sample and regularly incubated. The reaction was stopped adding an equal amount of acetonitrile followed by HPLC analysis. The stability of the enzymatic activity was measured in duplicates in a continuous fixed-bed system pumping substrate (3 mmol L^{-1} FA in 50 mmol L^{-1} Bis-Tris pH 6) through the column at a flow rate of 0.25 mL min^{-1} and quantitating the conversion rate at regular intervals *via* HPLC.

4.3 Results

4.3.1 Amplification of the ScoFAD mRNA

To induce the expression of the ScoFAD gene, the basidiomycete *Schizophyllum commune* was grown in submerged culture with added wheat bran producing a maximal intracellular enzyme activity of around 5 U L^{-1} . The gene target was amplified and a single band was monitored at 500 bp in an agarose gel matching the calculated amplificate length of 516 bp. The construct was Sanger sequenced to confirm the consensus sequence (MT459803).

4.3.2 Heterologous production and protein purification

Competent *Komagataella phaffii* GS115 cells were transformed with an N-terminal His-tagged variant ligated to pPIC9. Following a screening of 96 active clones, an average activity of 2,593 U L^{-1} was obtained from up-scaled cultivation in 100 mL cultures. The culture supernatant showed a distinct band at around 22 kDa matching the calculated monomeric protein mass of 21.05 kDa (Fig. 4.3.1A).

The protein was purified *via* FPLC-based Ni-chelate affinity chromatography. The eluate solely contained a single band of the same protein mass (Fig. 4.3.1B).

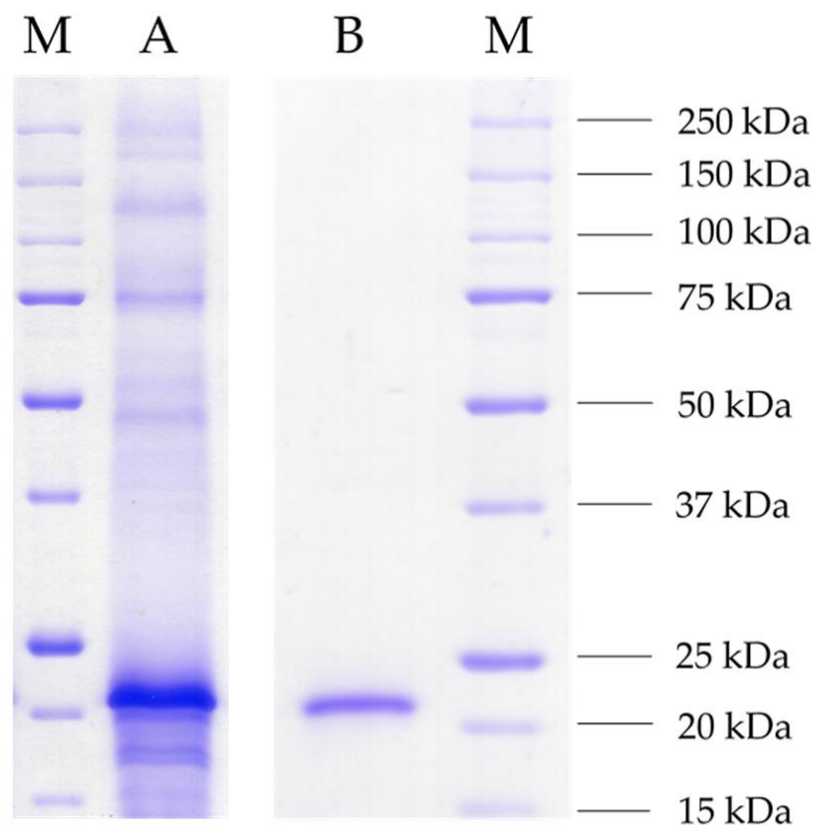


Fig. 4.3.1: SDS-PAGE (12 %) of the raw culture supernatant and the purified enzyme. The culture supernatant of recombinant *Komagataella phaffii* GS115 was harvested at the fourth day of main culture daily induced with 10 mL L⁻¹ methanol (A) and the heterologous protein purified via Ni-NTA affinity chromatography (B). As standard protein marker, 5 µL of unstained Precision Protein™ (Bio-Rad) was used (M). Both samples were tenfold concentrated using membrane filters (3 kDa cut-off), and 10 µL of each were applied. The gel was stained overnight in Imperial Protein Stain solution (Thermo Scientific) and washed with distilled water.

4.3.3 Biochemical characterisation

Temperature and pH optima of the purified enzyme were determined (Fig. 4.3.2). The enzyme showed a pH optimum of 5.5 and detectable activity within the range from 4 to 8. The enzyme was stable in a broad range between pH 4 to 11 exhibiting its highest stability at a strongly alkaline value of 11 (Fig. 4.3.2a). The ScoFAD showed a broad temperature optimum between 25 and 50 °C with a sharp peak at 35 °C. The enzyme was stable up to 40 °C with no residual activity after incubation for one hour at temperatures above 60 °C (Fig. 4.3.2b).

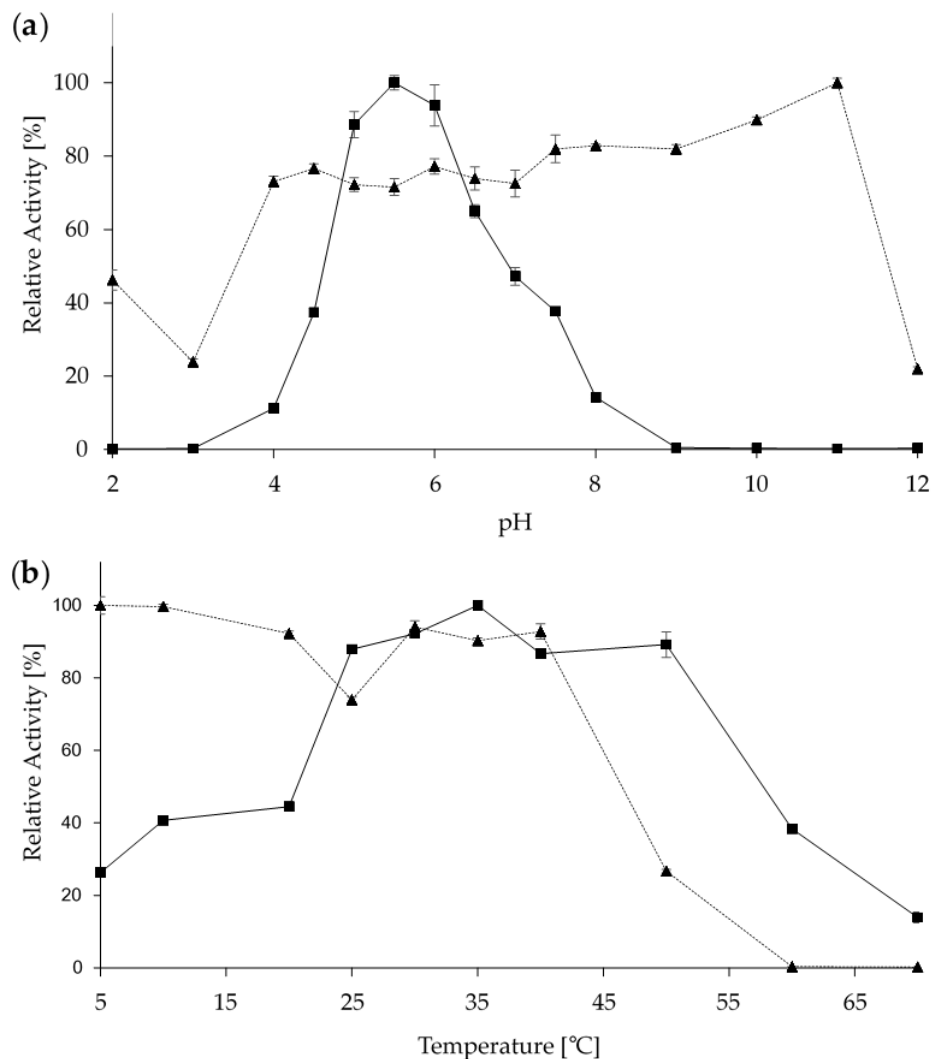


Fig. 4.3.2: Biochemical characterisation of the heterologously produced ScoFAD. pH (a) and temperature (b) dependencies of the heterologously produced and purified ScoFAD. Optimum curves are displayed as squares with solid lines and stability curves as triangles and dotted lines. For the pH studies, Britton-Robinson buffer was used. For the temperature stability studies, samples were incubated for one hour at the given temperature prior to the assay. All values were measured in triplicate.

4.3.4 Substrate specificity and kinetic characterisation

The substrate specificity was characterised incubating the purified enzyme with cinnamic acid and other phenylpropenoic acids, namely ferulic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid and sinapic acid. The enzyme solely converted FA and was consequently named ScoFAD. This reaction was studied in further detail to determine the affinity and catalytic efficiency and to provide a comparison with other described phenolic acid decarboxylases (Tab. 4.3.1).

Tab. 4.3.1: Comparison of various bacterial and fungal phenolic acid decarboxylases.

Enzyme	Accession number	Source	Substrates	K_M (mmol L ⁻¹)	$K_{cat} K_M^{-1}$ (L s ⁻¹ mmol ⁻¹)	Host	T_{Opt} (°C)	pH _{Opt}	Reference
IfaPAD	CUI18215	<i>C. farinosa</i>	pCA FA CA	0.3 1.9 -	78.4 45.1 -	<i>E. coli</i>	14	5.5	(Linke <i>et al.</i> , 2017)
FAD	ACJ26748	<i>Enterobacter sp.</i>	FA	2.4	2.1	<i>E. coli</i>	-	-	(Gu <i>et al.</i> , 2011)
PAD	-	<i>C. guilliermondii</i>	pCA FA CA	2.7 5.3 -	42.5 21.4 -	-	25	6.0	(Huang <i>et al.</i> , 2012)
FDC	AHY75481	<i>S. cerevisiae</i>	FA pCA FA CiAs	0.8 0.11 0.18 0.18	- 13.6 25.5 21	<i>E. coli</i>	35	6.5-7.0	(Lin <i>et al.</i> , 2015; Ferguson <i>et al.</i> , 2016)
AIPAD	LC369499	<i>A. luchuensis</i>	FA CA CA	8.7 37 1.7	87 3.8 -	<i>E. coli</i>	40	5.7	(Mayumi <i>et al.</i> , 2018)
BaPAD	AKL86192.1	<i>B. atrophaeus</i>	pCA FA	3.5 2.6	- -	<i>E. coli</i>	50	6.0	(Li <i>et al.</i> , 2019)
ScoFAD	MT459803	<i>S. commune</i>	FA	0.16	4779	<i>K. phaffii</i>	35	5.5	This work

PAD – phenolic acid decarboxylase; FAD/FDC – ferulic acid decarboxylase; pCA – *p*-coumaric acid; FA – ferulic acid; CA – caffeic acid; CiAs – cinnamic acid and various derivatives.

¹ Substrates are ordered by their respective affinity.

The ScoFAD exhibited an affinity of 0.16 mmol L⁻¹ to its only known substrate FA. The turnover number was determined as 750 s⁻¹, which resulted in a total catalytic efficiency $k_{cat} K_M^{-1}$ of around 4,779 L s⁻¹ mmol⁻¹ (Fig. 4.6.1).

4.3.5 Protein modelling

The protein sequence of the ScoFAD was aligned to the first phenolic acid decarboxylase from a filamentous ascomycete recently described by Linke *et al.* [17] and an enterobacterial FAD described by (Gu *et al.*, 2011) (Fig. 4.3.3).

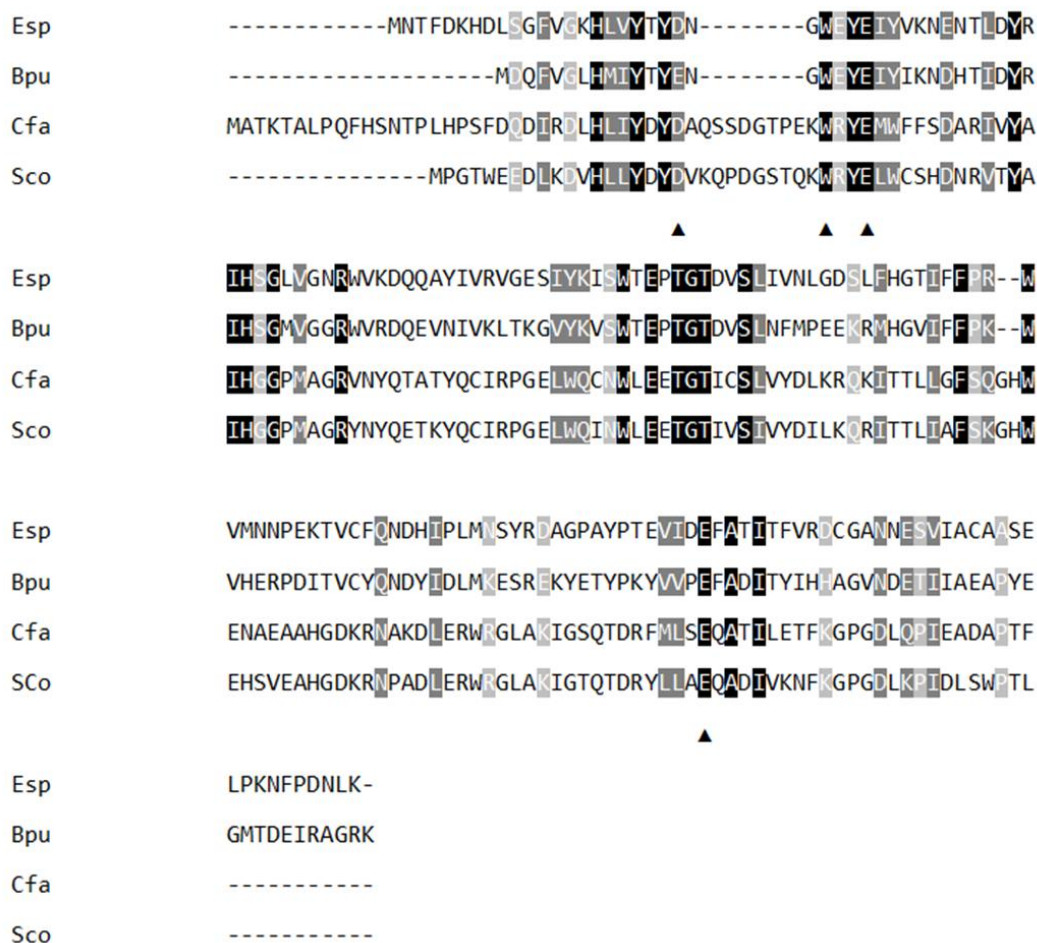


Fig. 4.3.3: Multiple sequence alignment (MSA) of different phenolic acid decarboxylases. The new ferulic acid decarboxylase ScoFAD described in this work (Sco, MT459803), an ascomycetous *p*-coumaric acid decarboxylase from *Cordyceps farinosa* described by (Linke *et al.*, 2017) (Cfa, CUI18215), and two bacterial ferulic acid decarboxylases from *Enterobacter sp.* studied by (Gu *et al.*, 2011) (Esp, ACJ26748) and from *Bacillus pumilus* by (Matte *et al.*, 2010) (Bpu, Q45361) were aligned by Clustal W. Conserved residues are marked in black, conservative mutations in dark-grey and semiconservative mutations in light-grey. The active-site residues proposed by (Gu *et al.*, 2011) are indicated by black triangles.

The ScoFAD (Sco) exhibited a sequence identity of 19.4 % to the FAD from *Enterobacter sp.* (Esp), 22.0 % to the PAD of *Bacillus pumilus* (Bpu) and of 64.2 % to the PAD of *Cordyceps* (Cfa). Following the study by (Gu *et al.*, 2011), the residues being proposedly involved in the catalytic cycle were both found in both the ScoFAD and in the PAD from *Cordyceps*. Consequently, the amino acids 19D, 31Y, and 160E were used for the substrate docking studies, whereas 29W was intentionally left out as it is merely held responsible for the entering and orientation of the substrate (Fig. 4.3.4).

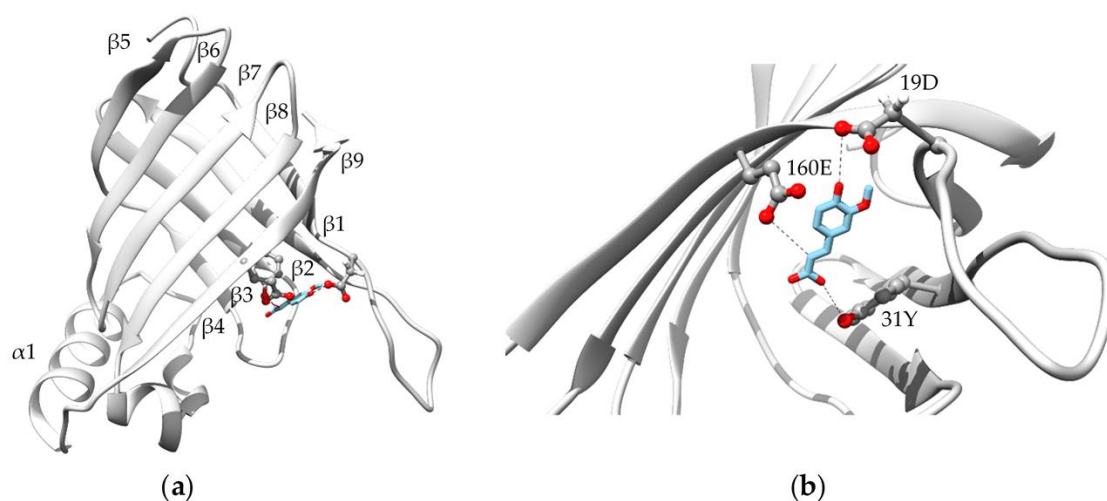


Fig. 4.3.4: Protein modelling. Overall (a) and active-site-focussed (b) protein model of the ScoFAD (MT459803) generated with SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014) using the template of a phenolic acid decarboxylase from *Bacillus pumilus* (3nad.1) described by (Matte *et al.*, 2010). The substrate FA was docked according to (Gu *et al.*, 2011) and shown in blue sticks, the active-site residues are shown in stick and balls. The figures were created using UCSF Chimera 1.14.

The enzyme structure was characterised by two sets of antiparallel β -sheets and an easily accessible peripheral active site. The FA molecule, fixed by short hydrogen bonds on both ends, fills the space between the glutamyl, aspartyl and tyrosyl side chains of the model.

4.3.6 Enzyme immobilisation

Enzymatic decarboxylation of FA derived from side-streams of the food industries offers a cheap and sustainable pathway to 4-VG at mild reaction conditions. The product may be used in clean and safe smoke flavours. Immobilisation is a common tool to establish a bio-economic process, as less enzyme is needed. Depending on the applied technique, the products are more or less enzyme free and the catalysts can be re-used for subsequent reaction cycles. Especially covalent immobilisation suits these requirements, as in adsorptive techniques, although being more straightforward, enzyme leaking can be seen as was recently reported for a basidiomycetous chlorogenase by (Siebert *et al.*, 2019b). Hence, a covalent immobilisation strategy was used for the ScoFAD involving the formation of a Schiff base between secondary amines of the protein and the aldehyde functionalised resin (Tab. 4.3.2).

Tab. 4.3.2: Activity data for the immobilisation of ScoFAD to AminoLink Agarose.

Sample	Activity [U mL ⁻¹]	Specific activity [U mg ⁻¹ protein]	Immobilisate activity [U mg ⁻¹ resin]	Absolute activity	Relative Activity [%]
Pre-immobilisation	3.62 ± 0.1	2.92 ± 0.1	-	0.72 ± 0.02	100
Post-immobilisation	0.0072 ± 0.001	n.d.	-	0.014 ± 0.0001	2
Immobilisate	-	2.15 ± 0.04	0.13 ± 0.002	0.57 ± 0.009	78

n.d. – not detected

Comparing the unbound and the immobilised enzyme, a drop in specific activity from 2.92 U mg⁻¹ to 2.15 U mg⁻¹ was monitored. However, 78 % of the initial activity was recovered in the immobilisate. Consequently, stability tests with FA in buffered solution were monitored over 264 h of continuous reaction using columns filled with the solid resin (Fig. 4.3.5).

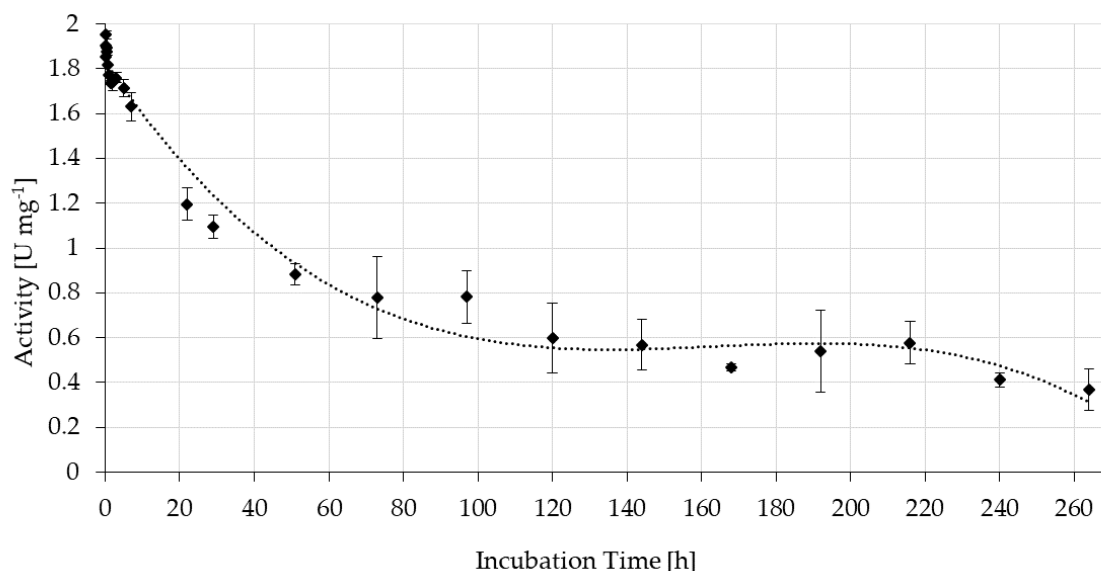


Fig. 4.3.5: Stability of the specific activity of ScoFAD covalently immobilised to AminoLink Plus Agarose. In duplicate measurement, 0.28 mg of purified enzyme were bound to 4.7 mg of resin, which corresponded to a bed volume of 100 μ L. Substrate solution was pumped through the columns at room temperature with a flow rate of 0.25 mL min⁻¹ for 264 h while collecting samples of the flow through mixing it with the same volume of acetonitrile. The concentration of 4-VG was quantitated using UV-Vis-HPLC and external calibration.

During the first 48 h of operation, the activity declined to about half the initial value. It then stabilised at around 0.6 U mg⁻¹ resin corresponding to around 40 % of the initial activity and remained around this level until 216 h. The experiment was ended after 264 h (11 d) of running at a level of 0.37 U mg⁻¹ (around 20 %). At this point, roughly 4 L of substrate solution had passed the column. This corresponded to a total of a 40,000 fold of the bed volume of 100 μ L.

4.4 Discussion

In this work, the first basidiomycetous phenolic acid decarboxylase was studied. The closest relatives producing analogous enzymes are ascomycetes, the second main class of higher fungi. Examples are the well-studied FDC1 from *Saccharomyces cerevisiae*, the AIPAD from *Aspergillus luchuensis* and the recently described IfaPAD from *Cordyceps farinosa* (Bhuiya *et al.*, 2015; Linke *et al.*, 2017; Mayumi *et al.*, 2018; Nagy *et al.*, 2019).

For the first time, a phenolic acid decarboxylase was produced heterologously in a yeast. The activity in the *Komagataella* culture exceeded the activity in the basidiomycetous culture by more than a factor of 500. In contrast to the common host *E. coli*, *Komagataella phaffii* is classified as safe (GRAS) by the United States Food and Drug Administration (FDA) (Ciofalo *et al.*, 2006; Thompson, 2010). Other decarboxylases including the BaPAD were usually produced in *E. coli* (Li *et al.*, 2019). Further, the recombinant ScoFAD was secreted into the medium, which significantly simplified downstream processing.

In contrast to other characterised enzymes, the ScoFAD showed an unusually broad temperature between 25 and 50 degrees C enabling a wide range of possible process temperatures at only little activity loss (Huang *et al.*, 2012; Linke *et al.*, 2017). Likewise, the enzyme remained highly stable against temperatures up to 40 °C, which provides flexible incubation conditions. With a pH optimum of 5.5, it closely matched other cofactor-independent decarboxylases from bacterial and fungal sources, which use acid catalysis instead (Linke *et al.*, 2017; Mayumi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Similar optima were detected for many more basidiomycetous enzymes including a ferulic acid esterase from *Rhizoctonia solani* (Nieter *et al.*, 2017). Both enzymes may thus be promising candidates to work hand-in-hand releasing and converting ferulic acid from lignified natural sources in a two-step enzymatic process. In spite of the rather low overall identity of 19.4 %, MSA analysis suggested the four conserved residues 19D, 31Y, 160E, and 29W in the active site, which were previously stated to be involved in the catalytic cycle of the FAD from *Enterobacter sp.* (Gu *et al.*, 2011). Despite being based on the crystal structure of a PAD from *Bacillus pumilus*, the localisation of these residues matched the binding of FA in a protein model (Matte *et al.*, 2010).

In contrast, the ScoFAD offered a high identity of 64.2 % to the recently published IfaPAD (Linke *et al.*, 2017). However, FA was the only known substrate of the ScoFAD, whereas the IfaPAD also converted *p*-CA. The newly identified enzyme actually exhibited by far the highest known affinity to FA with a K_M value of 0.16 mM. In contrast, affinities for FA of other fungal

decarboxylases typically ranged between 0.8 and 8.7 mM (Bhuiya *et al.*, 2015; Mayumi *et al.*, 2018). As ScoFAD accepts only FA as a substrate, the enzyme may be used on complex plant materials without the risk of generating unwanted side-products, particularly the putative carcinogen styrene from cinnamic acid. Based on the also relatively high turnover number (k_{cat} of 750 s^{-1}), the resulting catalytic efficiency (k_{cat}/K_M of $4,779 \text{ L s}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$) exceeded the second highest by more than a factor of 50 (Siebert *et al.*, 2019b). As the ScoFAD required a hydroxyl group in para position, it did not require any external cofactors and showed a close relationship to further enzymes of this class in MSA, protein modelling and biochemical properties, the enzyme can be clearly classified as cofactor-independent phenolic acid decarboxylase (Payer *et al.*, 2019).

ScoFAD is the first successfully immobilised enzyme for the production of 4-VG in a fixed bed approach. Around 80 % of the applied activity was found in the immobilisate demonstrating the suitability of the immobilisation method for a feasible bioprocess. An analogous strategy was recently applied for the removal of chlorogenic acid from coffee beverages (Siebert *et al.*, 2019b). After 264 h and 40,000 passed bed volumes a remaining activity of 20 % was measured. The only further example of an immobilised PAD was recently published by Mittmann *et al.* (2019), who demonstrated a working and stable all-enzyme hydrogel for the production of *p*-hydroxystyrene, another smoke flavour compound. The immobilisate may be used for the continuous production of 4-VG from FA released from side-streams of the food industries by ferulic acid esterases as shown by Nieter *et al.* (2016).

4.5 Conclusion

Many basidiomycetous oxidoreductases, mainly laccases, arylalcohol oxidases, and certain peroxidases, all involved in the degradation of lignocellulose, have been studied in great detail. Accessory enzymes such as phenolic acid decarboxylases have received much less attention. The reported ScoFAD offers an example of the uniqueness and capability basidiomycetous enzymes often exhibit. Its catalytic efficiency exceeds all other FADs published so far. The high activities generated by the food-grade expression host *Komagataella phaffii* GS115 and the successful immobilisation pave the way for a future sustainable production of natural 4-VG for clean and safe smoke flavours. At the same time, the findings should stimulate the research for other unique enzymes from basidiomycetes, particularly those revolving around phenol biochemistry. To improve the thermal and operational long-term activity of the immobilisates, other carrier materials and linker chemistries can be envisaged.

Data Availability Statement

All relevant data are within the manuscript and its Supporting information files.

Funding

This research was funded the BMBF cluster Rauchenzym, grant number 031B0586. The APC was funded by the Open Access fund of the Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgements

A. Feldmann and L. Rötter are gratefully thanked for assisting in gene amplification, cloning and activity screening.

4.6 Supporting information

Tab. 4.6.1: List of chemicals.

	Chemical	Purity	Source
Media	Agar-Agar, Kobe I		Carl Roth
	L-Asparagine monohydrate	≥99 %, Ph.Eur.	Carl Roth
	Biotin	≥99 %	Sigma Aldrich
	Copper(II) sulfate pentahydrate	Puriss., <i>p.a.</i>	Honeywell
	Ethylendiamine-tetraaceticacid disodium salt dihydrate	≥99 %, <i>p.a.</i> , ACS	Carl Roth
	Ferric chloride Hexahydrate	Puriss., <i>p.a.</i> , ACS	Honeywell
	D-(+)-Glucose monohydrate		Merck
	Magnesium sulfate	≥99 %, <i>p.a.</i> , water-free	Carl Roth
	Peptone ex casein		Carl Roth
	Potassium dihydrogen phosphate	≥98 %, Ph.Eur., BP	Carl Roth
	di-Potassium hydrogen phosphate	≥99 %, <i>p.a.</i> , water-free	Carl Roth
	Yeast extract		Merck
	Yeast nitrogen base		Sigma Aldrich
	Zinc sulfate heptahydrate	<i>P.a.</i>	Merck
Buffers and eluents	Acetic acid	100 %, <i>p.a.</i>	Carl Roth
	Acetonitrile	≥99.9 %, gradient grade	Honeywell
	Bis-(2-hydroxy-ethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methane	≥99 %	Carl Roth
	Boric acid	≥99.5 %, ACS	Sigma Aldrich
	Ethanol	≥96 %	VWR
	Formic acid	≥99 %, <i>p.a.</i> , ACS	Carl Roth
	Hydrochloric acid 32 %	<i>p.a.</i> , ISO	Carl Roth
	Imidazole	≥99 %	Carl Roth
	Methanol	Gradient grade	VWR
	<i>o</i> -Phosphoric acid	85 %, Ph.Eur.	Carl Roth
	Potassium hydroxide	≥85 %	Carl Roth
	Sodium chloride	≥99.8 %, with anti caking agent	Carl Roth
	di-Sodium dihydrogen phosphate dihydrate	≥98 %, <i>p.a.</i> , ACS	Carl Roth
	Sodium dihydrogen phosphate monohydrate	≥98 %, <i>p.a.</i> , ACS	Carl Roth
	Sodium hydroxide	≥98 %, <i>p.a.</i> , ISO	Carl Roth
	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	≥99.3 %	Carl Roth
Standards	Caffeic acid	≥98 %	Carl Roth
	Cinnamic acid	≥99 %	Honeywell
	<i>p</i> -Cumaric acid	≥98 %	Carl Roth
	<i>trans</i> -Ferulic acid	99 %	Sigma Aldrich
	Sinapic acid	≥98 %	Sigma Aldrich

4-Vinylguaiacol		Fluorochem
SDS-PAGE	Rotiphorese Gel 40 (37.5:1)	Carl Roth
	Sodium dodecyl sulfate	≥99 % Carl Roth
	Bromophenol Blue	ACS Merck
	Ammonium persulfate	>98 %, <i>p.a.</i> , ACS Carl Roth
	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	VWR
	1,4-Diothiothreitol	>99 %, <i>p.a.</i> Carl Roth
	Imperial Protein Stain	Thermo Scientific
	Glycerol	≥99.5 %, <i>p.a.</i> Carl Roth
Immobilisation	Sodium cyanoborohydride	95 %, reagent grade Sigma Aldrich
	AminoLink Plus Coupling Resin	Thermo Scientific
Misc	BSA	≥96 % Sigma Aldrich
	RNAlater solution	Thermo Scientific
	D-Sorbitol	≥98 % Sigma Aldrich
	BRADFORD Reagent for 0.1-1.4 mg mL ⁻¹ protein	Sigma Aldrich

Fluorochem, Hadfield, United Kingdom; Honeywell, Charlotte, United States; Merck, Darmstadt, Germany; Carl Roth, Karlsruhe, Germany; Sigma Aldrich, St. Louis, United States; Thermo Scientific, St. Leon-Roth, Germany; VWR, Radnor, United States.

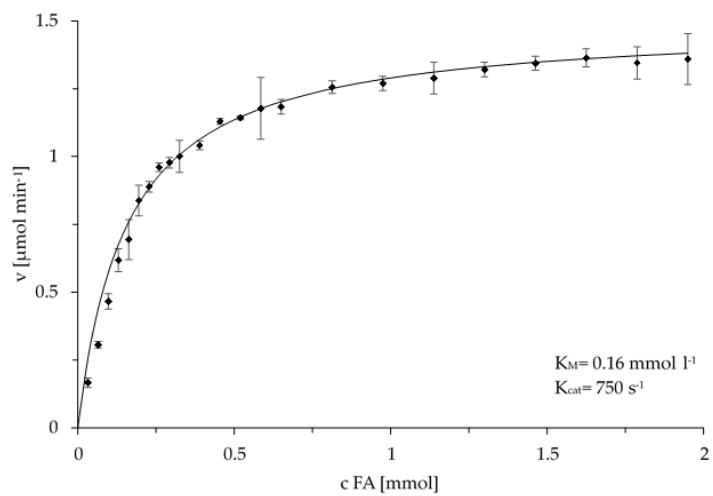


Fig. 4.6.1: MICHAELIS-MENTEN non-linear-regression for the conversion of ferulic acid by ScoFAD.

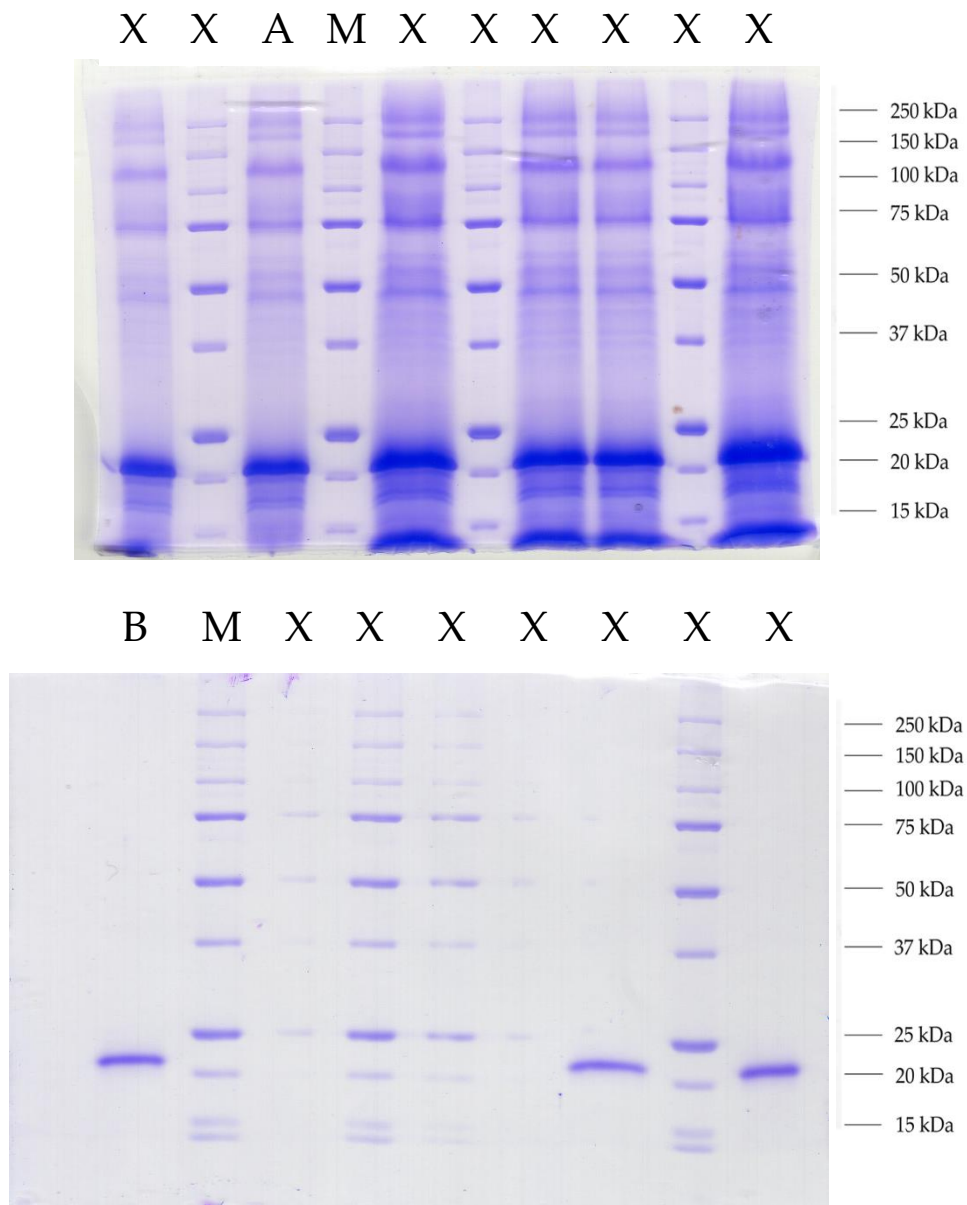


Fig. 4.6.2: Raw SDS-PAGE images.

5 Vorwort zur Publikation „Formation of 2,6-DMBQ in anthocyanin-rich foods“

2,6-Dimethoxychinon (DMBQ) ist ein Naturstoff, der antibakterielle und antifungale Eigenschaften aufweist und künftig als Konservierungsstoff in Lebensmitteln eingesetzt werden könnte (vgl. Kapitel 1.3.2). DMBQ wurde in vielen Pflanzen nachgewiesen und erst kürzlich wurde ein neuer Biosyntheseweg entdeckt, der die *in-vitro*-Bildung aus Malvidin-Glykosiden durch Multikupferoxidasen beschreibt (Detering *et al.*, 2018).

Da auch Pflanzen solche Oxidasen bilden, sollte geklärt werden, ob dieser Abbau auch *in vivo* vorliegt und die Bildung durch die Verletzung von Kompartimenten ausgelöst wird, um möglicherweise Kontaminationen entgegenzuwirken. Dazu sollten zunächst die DMBQ-Gehalte verschiedener Weine verglichen werden und schließlich gezielt anthocyanreiche Früchte homogenisiert und Bildungskinetiken aufgezeichnet werden. Zudem sollte ein Bioprozess zur Produktion und Reinigung von natürlichem und lebensmittelgeeignetem DMBQ aus Weintrester mittels einer Laccase aus *Pleurotus pulmonarius* entworfen werden.

An der Publikation war Herr Prof. Berger als Betreuer für die Projektidee sowie für die Bereitstellung von Mitteln beteiligt.

Die nachfolgende Arbeit wurde in *LWT – Food Science and Technology* veröffentlicht (Detering *et al.*, 2020a).

6 Formation of 2,6-DMBQ in anthocyanin-rich foods

Thorben Detering, Ralf G. Berger

Highlights

- 2,6-Dimethoxybenzoquinone is a natural substance found in various plants.
- Its concentration correlated to malvidin-3-*O*-glucoside in grape wines.
- Cell disruption triggered its formation in anthocyanin-rich fruits.
- A fungal laccase produced 65 mg of the quinone from 100 g dry grape pomace.
- With its antibacterial properties, the quinone may be used in future food applications.

Abstract

The naturally occurring 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) has anti-bacterial, anti-fungal and anti-cancer activities. As it is probably formed in plants *via* oxidative degradation of the anthocyanin malvidin and its glycosides, a targeted analysis of the DMBQ concentration of different wines and grape juices was performed. Whereas no DMBQ was detected in white wines, concentrations between 28 and 137 $\mu\text{g L}^{-1}$ were measured in red wines. *In vivo* formation kinetics in crushed anthocyanin-rich fruits were monitored, and up to 2.84 mg kg^{-1} DMBQ were found showing that its formation was triggered by cell disruption and catalysed by intrinsic oxidases. Ethanolic extraction of grape pomace, a cheap and sustainable source of malvidin-3-*O*-glucoside, yielded around 1.3 g L^{-1} corresponding to 272 mg/100 g dry matter. Solid phase purification of malvidin on XAD7HP resulted in the separation of 229 mg malvidin/100 g dry matter. A basidiomycetous laccase converted the purified malvidin to DMBQ with a yield of 94 % followed by adsorption on XAD16N separating 65 mg DMBQ/100 g dry grape pomace under full food-grade conditions. DMBQ may contribute to the shelf life of malvidin-rich foods and is a promising candidate as a natural alternative to other food preservatives.

Keywords

Anthocyanin; *In vivo* degradation; Solid phase extraction; Biotechnology

6.1 Introduction

The health-beneficial properties of anthocyanin-rich foods were examined in numerous *in vivo* and *in vitro* studies. Besides general antioxidant properties, anthocyanins interact with proteins, such as kinases and major transcription factors inhibiting tumour formation (Afaq *et al.*, 2005). Anthocyanins are also involved in downregulating genes encoding pro-inflammatory enzymes (Hassimotto *et al.*, 2013). Recent studies showed that multiple bioactive metabolites are catabolised by human and intestinal microbial enzymes (de Ferrars *et al.*, 2014). In particular, phenolic metabolites such as protocatechuic acid may provide health-beneficial properties (Min *et al.*, 2010).

In contrast to the meticulously described biosynthesis, only little is known about the enzymatic *in vivo* degradation of anthocyanins in plants. Polyphenol oxidases, peroxidases and β -glucosidases are suspected to be involved in the degradation *via* the formation of yet unidentified products, possibly followed by polymerisation (Oren-Shamir, 2009). Similar pathways may also apply to human or animal metabolism, as analogous peroxidases and β -glucosidases were described (de Graaf *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2014). During processing of anthocyanin-rich fruits also chemical degradation may occur. Including various both oxidative and non-oxidative routes such as hydration, deacylation and elimination reactions, Fenger *et al.* (2020) described the chemical formation of protocatechuic acid, acylglycosides and further molecules from acylated anthocyanins. In a recent study, a novel pathway for the enzymatic degradation of the most abundant anthocyanin in red wines, malvidin, was proposed using multi-copper oxidases from yeast and higher fungi. 2,6-Dimethoxybenzoquinone (DMBQ) and a coumarin galactoside were proposed as degradation products, which may fill the gap in plant catabolism described previously (Detering *et al.*, 2018). According to this work, the phenolic hydroxy group at the 4' position (B-ring) of malvidin glycosides is oxidised to a phenoxyl radical *via* action of multi-copper oxidases. After mesomeric delocalisation, the radical is attacked at the 1' position by dioxygen (a diradical) and a hydroperoxide is formed. The nucleophilic attack of the hydroperoxide on the electrophilic carbon at the 2' position produces an endoperoxide between B- and C-ring, which is then cleaved releasing the degradation products.

DMBQ is widely found in taxonomically distant plants, such as wheat, bamboo and magnolia (Nishina *et al.*, 1991; Otto *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018). Furthermore, it is detected in processed plant foods including red grape or blueberry based wines (Ilc *et al.*, 2016; Yuan *et al.*, 2018). DMBQ features a number of health beneficial attributes, such as anti-bacterial and anti-fungal properties (Jones *et al.*, 1981; Kim, 2010). The benzoquinone, purified from grape juice, reduces the carcinogenesis in mice models after treatment with one of the most potent carcinogens, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (Kamiya *et al.*, 2018).

Among other *in vivo* routes, *o*- and *p*-quinones are formed by the twoelectron oxidation of catechols and *p*-hydroquinones, respectively, which are derived from benzoic acid derivatives (Van den Berg, 1991; Bolton *et al.*, 2017). The *in vitro* formation of DMBQ during malvidin degradation indicates a previously unknown pathway. The same reaction may occur *in vivo* during disruption of plant cell compartments. This would enable the contact of anthocyanins from the vacuoles with peroxisomal multi-copper oxidases, which are well-known from plants (Berthet *et al.*, 2012).

Natural food additives are of particular interest and more and more preferred by costumers (Román *et al.*, 2017). Thus, the biotechnological production of DMBQ from anthocyanin-rich side products of the food industry, such as grape pomace, would feature a clean, sustainable and low-priced source of DMBQ. Hence, this study aimed at verifying the presence of the described pathway *in vivo* and at opening a biocatalytic production strategy for natural DMBQ.

6.2 Material and methods

6.2.1 Chemicals

All used chemicals and solvents were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) and VWR (Radnor, United States). Malvidin-3-*O*-glucoside chloride was supplied by Phytolab (Vestenbergsgreuth, Germany) and both DMBQ and 2,5-dimethoxybenzoquinone (2,5-DMBQ) by Alfa Aesar (Kandel, Germany).

6.2.2 Malvidin-3-*O*-glucoside extraction

The procedure of malvidin-3-*O*-glucoside extraction was based on (Chandrasekhar *et al.*, 2012). Dry Dornfelder grape pomace (94.15 g) was extracted with 200 ml 8.56 mol L⁻¹ ethanol EtOH acidified with 0.32 mol L⁻¹ HCl. The mixture was homogenised at 10.000 rpm for 30 s in the knife mill Pulverisette 11 (Fritsch, Idar-Oberstein, Germany). For the experiments, the raw extract was filtrated and diluted tenfold with double-distilled water containing 0.32 mol L⁻¹ HCl.

6.2.3 HPLC analysis of anthocyanins

For the quantification of the malvidin-3-*O*-glucoside content, different grape wines and juices, purchased at a local supermarket, were analysed *via* HPLC-DAD. The unit consisted of a DGU-20A SR degasser, a LC-20AD pump, a SIL-20AC HT autosampler, a CTO-10AS VP column, and a SPD-M30A diode array detector (all Shimadzu, Hannover, Germany) equipped with a Phenomenex (Aschaffenburg, Germany) Gemini® C18 SecurityGuard™ cartridge followed by a Merck (Darmstadt, Germany) Chromolith® Performance RP-18e (100–4.6 mm). As solvents, an aqueous solution (100 mL L⁻¹) of formic acid (A) and an aqueous solution of methanol (450 mL L⁻¹) and formic acid (100 mL L⁻¹) at a total flow rate of 1 mL min⁻¹ were used. Of the acidified sample (20 µL 1 mol L⁻¹ HCl added to 100 µL sample), 20 µL was injected to 50 µL min⁻¹ B with gradient up to 200 µL min⁻¹ B within 12 min, 20 µL min⁻¹ B to 700 µL min⁻¹ B in 6 min, 700 µL min⁻¹ B to 1 µL min⁻¹ B in 2 min, holding µL min⁻¹ B for 3 min, 1 µL min⁻¹ B to 50 µL min⁻¹ B in 2 min and holding 50 µL min⁻¹ B for further 5 min. The absorption was monitored at 527 nm, and the malvidin-3-*O*-glucoside content was quantitated *via* external calibration.

6.2.4 Homogenisation of fruits

Fruits were purchased at a local supermarket. The sample (40 g) was mixed with 40 mL of desalted water and homogenised for 30 s at 5000 rpm using the knife mill. For the blanks, 2 mL 10.2 mol L⁻¹ HCl was added before homogenisation. The samples were transferred to 50 mL tubes (Sarstedt, Hamburg, Germany) and incubated at 200 rpm and 20 °C. At various time points, 2 mL sample was taken, filtrated through 0.2 µm nylon syringe filters (Hahnemühle, Dassel, Germany) and prepared for LC-MS analysis.

6.2.5 Sample preparation

Prior to the analysis *via* LC-MS, the samples were prepared using extraction with dichloromethane. In 4 mL glass vials, 2 mL of the grape wine, disrupted fruits or bioconverted samples were mixed with 200 μL of 0.5 mg L^{-1} 2,5-DMBQ as internal standard and 100 μL 10.2 mol L^{-1} HCl to inactivate enzymes and to prevent anthocyanins being extracted. Then, 2 mL of dichloromethane were added and stirred for 30 min at 1000 rpm (MHR13 mixer, Ditabis, Pforzheim, Germany) and room temperature. The samples were centrifuged at 4600 \times g for 15 min (Rotina 380R, Hettich, Tuttlingen, Germany). After removal of the organic phase, the extraction step was repeated and the organic phases were combined to be dried in nitrogen flow. The dried sample was re-dissolved in 200 μL 8.56 mol L^{-1} EtOH and further analysed.

6.2.6 Solid phase extraction of anthocyanins and bioconversion

Anthocyanins were separated from the diluted pomace raw extract using solid phase extraction (SPE) based on a method developed by (Chandrasekhar *et al.*, 2012). Overnight, 66.67 g of Amberlite® XAD7HP (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) were activated at room temperature using 120 mL 16.4 mol L^{-1} ethanol in a Schott flask equipped with stirring bars. After decantation of the solvent, the adsorbent was washed with 250 mL double-distilled water. Again, the washing water was removed and 500 mL sample was adsorbed for 5 h under light stirring at room temperature with the flask being wrapped with aluminium foil. The supernatant was removed *via* filtration through standard folded filters. The retentate was washed with 500 mL of double-distilled water followed by elution with two times 250 mL 16.4 mol L^{-1} ethanol containing 0.17 mol L^{-1} acetic acid. In a rotary evaporator (LABOROTA 4000, Heidolph, Schwabach, Germany) with heating set to 40 °C and pressure set to 17.5 kPa, the solvent was removed from 250 mL of the elution fraction and anthocyanins were re-dissolved in 5 L of 10 mmol L^{-1} sodium acetate buffer (pH 4). To convert the extracted malvidin glycosides to DMBQ, a previously produced and purified laccase of the basidiomycete *Pleurotus pulmonarius* (833 nkat L^{-1}) was added (Behrens *et al.*, 2017; Detering *et al.*, 2018). The solution was incubated over night at room temperature under stirring.

6.2.7 Solid phase extraction of DMBQ

The product of the bioconversion was double filtrated using standard folding filters and 0.2 μm nylon membrane filters (Hahnemühle, Dassel, Germany). DMBQ was extracted from the solution using Amberlite® XAD16N (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). The adsorbent was prepared analogously to the XAD7HP used for anthocyanin extraction. 1 L of filtrated product was added to 66.67 g of activated XAD16 and incubated overnight at room temperature in a Schott flask with a stirring bar. The supernatant was removed *via* filtration through folding filters and desorption was carried out by adding 1 L of 16.4 mol L⁻¹ ethanol and incubation for 3 h at 50 °C under stirring.

6.2.8 LC-MS analysis

Mass-spectrometric analysis was performed on a Varian 1200 LC-MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) choosing 1 mL L⁻¹ aqueous formic acid (A) and acetonitrile with 1 mL L⁻¹ formic acid (B) as eluents. A stepwise gradient at a total flow rate of 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ was performed as follows: 6 $\mu\text{L min}^{-1}$ B to 66 $\mu\text{L min}^{-1}$ B in 1 min, 66 $\mu\text{L min}^{-1}$ B to 69 $\mu\text{L min}^{-1}$ B in 18 min, 69 $\mu\text{L min}^{-1}$ B to 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ B in 1 min, 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ B for 5 min, 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ B to 6 $\mu\text{L min}^{-1}$ B in 1 min and 6 $\mu\text{L min}^{-1}$ B for 4 min. Further parameters were: Capillary voltage (\pm) 68/-68 V; collision energy 15 eV; detector voltage 1500 V; needle voltage (\pm) 4000/-4000; spray shield voltage (\pm) 600/-600 V; spray chamber temperature 55 °C; drying gas temperature 200 °C; vortex gas temperature 300 °C; CID gas pressure 200 mPa; nebulising gas pressure 379 kPa; drying gas pressure 207 kPa; vortex gas pressure 172 kPa. The DMBQ concentration was semiquantitated using 2,5-DMBQ as an internal standard. For DMBQ, 169 (+)>141 (+) was used as quantifier and 169 (+)>154 (+) as qualifier ion. For 2,5-DMBQ, 169 (+)>109 (+) was used as quantifier and 169 (+)>123 (+) as qualifier ion.

6.3 Results

6.3.1 Occurrence of DMBQ in grape wines and juices

To verify the presence of a DMBQ formation pathway in anthocyanin-rich plants, grape wines and juices were chosen as popular model foods. No comparative and targeted analysis of DMBQ in wine is yet available. In LC-MS based analyses, no DMBQ was detected in Riesling and Chardonnay, representing the class of anthocyanin-lacking white wines, which served as negative control (Fig. 6.3.1).

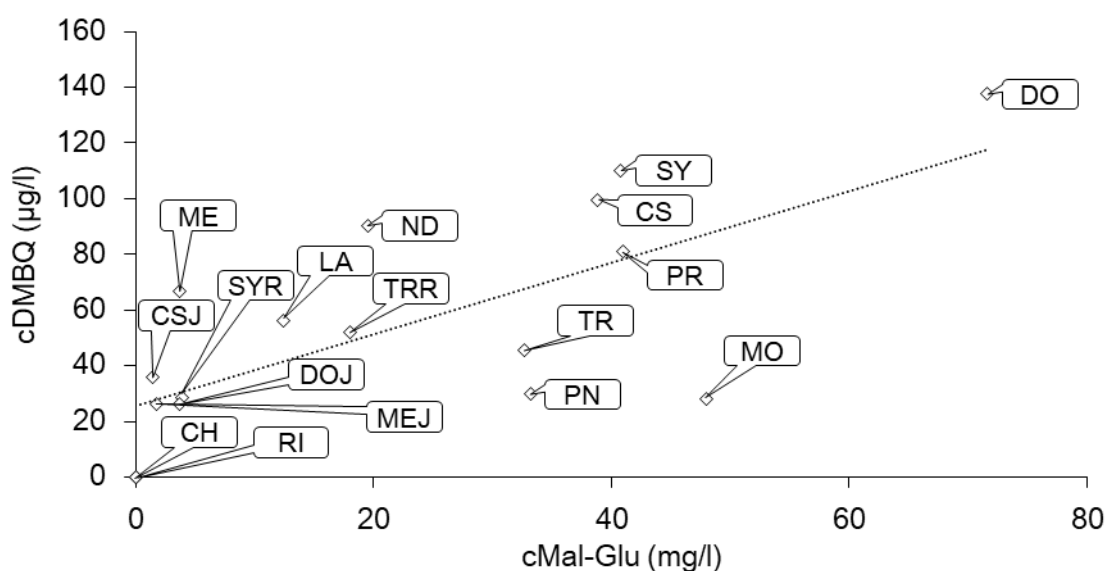


Fig. 6.3.1: Concentrations of 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) and malvidin-3-O-glucoside (Mal-Glu) in selected wines and juices. HCl was added to the samples followed by addition of 2,5-DMBQ as internal standard and extraction with dichloromethane. ESI-LC-MS/MS analysis in MRM mode using the fragmentation pattern 169 (+)->141 (+) as quantifier ion. The samples were prepared independently and measured as triplets. The content of Mal-Glu was analysed using HPLC-DAD at 493 nm and correlated. CH – Chardonnay white wine; CS – Cabernet Sauvignon red wine; CSJ – Cabernet Sauvignon grape juice; DO – Dornfelder red wine; DOJ – Dornfelder grape juice; LA – Lambrusco red sparkling wine; ME – Merlot red wine; MEJ – Merlot grape juice; MO – Montepulciano red wine; ND – Nero D’Avola red wine; PN – Pinot Noir red wine; PR – Primitivo red wine; RI – Riesling white wine; SY – Syrah red wine; SYR – Syrah rosé wine; TR – Trollinger red wine; TRR – Trollinger rosé wine.

DMBQ was detected in all samples of rosé and red wines in concentrations ranging from 28 (Montepulciano) to 137 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Dornfelder). While the Syrah rosé wine showed only one fourth of the concentration of its red counterpart, the DMBQ concentration of the Trollinger rosé wine (52 $\mu\text{g L}^{-1}$) exceeded the concentration of the Trollinger red wine (46 $\mu\text{g L}^{-1}$). DMBQ was as well detected in unfermented juices of Cabernet Sauvignon (36 $\mu\text{g L}^{-1}$), Dornfelder (26 $\mu\text{g L}^{-1}$) and Merlot (26 $\mu\text{g L}^{-1}$) grapes.

The concentration of malvidin-3-*O*-glucoside, the predominant anthocyanin in wines and grapes and the proposed precursor of DMBQ, was quantitated *via* HPLC. A rough correlation with a Pearson correlation coefficient of 0.71 was found. Comparing the juices and red wines, a higher malvidin concentration was detected in all respective wines. Complementary, the DMBQ concentration also ranged up to a maximum of half of the content of the wines only. High concentrations of malvidin were generally associated with high contents of DMBQ, in contrast to white wines, which displayed no detectable concentrations of both malvidin and the quinone.

6.3.2 Formation kinetics in anthocyanin-rich fruits

As the results described above showed a relation between anthocyanin- and DMBQ-concentration of the samples (Fig. 6.3.1), the kinetics of this reaction were studied in further detail. In earlier *in vitro* studies, copper oxidases, such as laccases, were responsible for the DMBQ formation. Anthocyanin-rich plant materials, blackberries, blueberries and red grapes, were applied using white grapes as a kind of biological blank. The intact fruits were homogenised to enable the contact of peroxisomal oxidases and malvidin from the vacuoles due to disintegration of the cellular compartments for a certain time of incubation (Fig. 6.3.2).

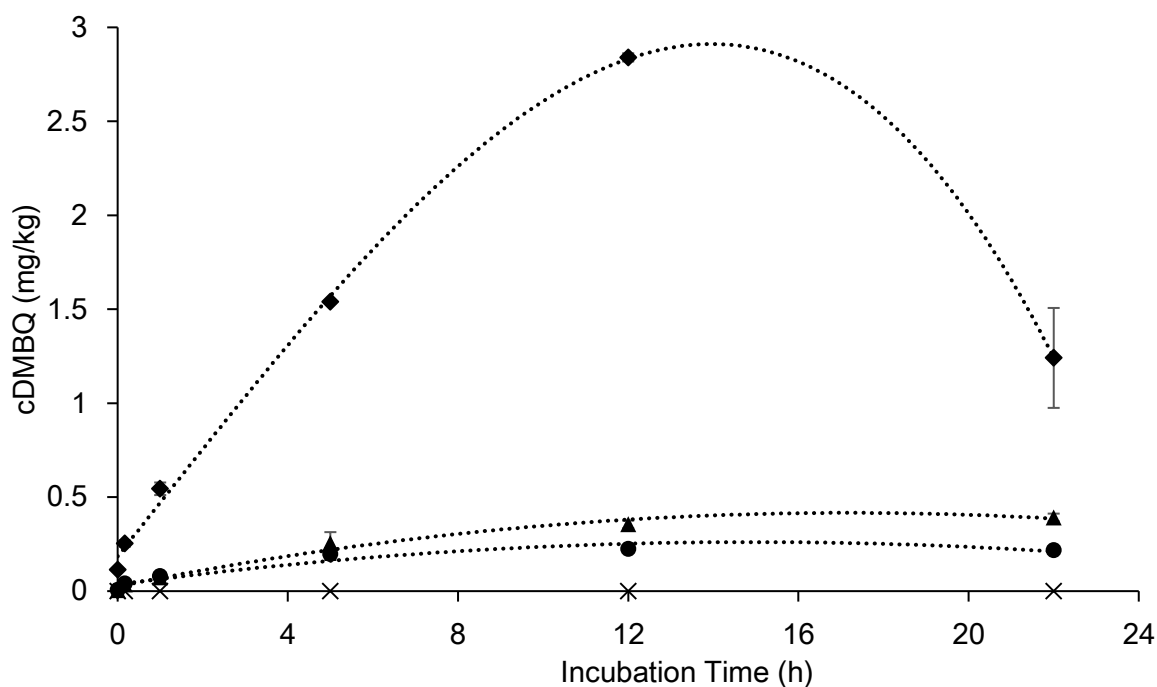


Fig. 6.3.2: Formation kinetics of 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) in anthocyanin-rich fruits. The fruits were homogenised in water and samples were taken in triplets after specific time points. The reaction was stopped with HCl and 2,5-DMBQ was added as internal standard. After extraction with dichloromethane, a ESI-LC-MS/MS in MRM mode using the fragmentation pattern 169 (+) → 141 (+) as quantifier ion was performed. ◆ – Blueberry; ▲ – Blackberry; ● – Red grape; × – White grape.

In all anthocyanin-containing fruits, DMBQ formation triggered by cell disruption was monitored. As a blank, fruits were crushed in diluted HCl to immediately inactivate the enzymes. DMBQ concentrations were quantitated to 0.0059 (blackberry), 0.0052 (red grape) and 0.11 mg kg⁻¹ (blueberry). Within 1 h of incubation, a five- to tenfold increase in DMBQ concentration was measured. After 12–22 h, maximum concentrations reached 0.22 (blackberry), 0.39 (red grape) and 2.84 mg kg⁻¹ (blueberry). In contrast, a drop in concentration was seen in blueberry between 12 and 22 h resulting in around 1.2 mg kg⁻¹ (Fig. 6.3.2). All white grape samples used as a biological blank remained below the detection limit.

6.3.3 Production and purification of DMBQ from grape pomace

Due to its numerous claimed health-beneficial properties, the targeted enzymatic production of DMBQ from a natural substrate was aimed at. Wine pomace, rich in malvidin-3-*O*-glucoside as precursor, accumulates as a by-product during winemaking in large quantities all over the globe and was therefore assumed to be a suitable starting material.

Based on a method developed by Chandrasekhar *et al.* (2012), an anthocyanin extraction using acidified ethanol:water (50:50) was performed giving malvidin-3-*O*-glucoside concentrations of around 1.3 g L⁻¹ corresponding to 272 mg/100 g dry matter (Fig. 6.3.3). The raw extract was tenfold diluted in acidified water and purified *via* solid phase extraction (SPE). Incubating the diluted extract (128 mg L⁻¹) with the activated XAD7HP, around 91 % (117 mg L⁻¹) of the total malvidin-3-*O*-glucoside 108 mg L⁻¹ were extracted from the adsorbent with acidified ethanol. This corresponded to 84 % recovery calculated in relation to the diluted raw extract (128 mg L⁻¹) and a yield of 229 mg/100 g dry matter (Tab. 6.3.1). The solvent was removed and the sample re-dissolved in water. The purified anthocyanin extract was diluted twentyfold to avoid polymerization reactions and incubated with a recombinant laccase of *Pleurotus pulmonarius* overnight. The conversion rate was calculated to 94 % regarding malvidin and DMBQ. The biotransformed sample containing 1.7 mg L⁻¹ DMBQ was membrane filtrated and again solid phase extracted with XAD16N. Around 88 % of the total DMBQ content was bound to the adsorbent leaving 0.2 mg L⁻¹ in the supernatant. After elution with ethanol, the concentration of the conversion product DMBQ was quantitated to 1.5 mg L⁻¹ in the elution fraction (Tab. 6.3.1). This corresponded to an overall yield of 65 mg/100 g dry matter (Fig. 6.3.3).

Tab. 6.3.1: Solid phase extraction of the raw ethanolic anthocyanin extract from grape pomace with XAD7HP and the product of the biotransformation with XAD16N. All samples were prepared and analysed as triplets. Mal-Glu – Malvidin-3-*O*-glucoside; DMBQ – 2,6-Dimethoxybenzoquinone; * – Not performed.

Fractions	XAD7HP	XAD16N
	cMal-Glu (mg L ⁻¹)	cDMBQ (mg L ⁻¹)
Educt	127.5 ± 5.6	1.7 ± 0.02
Supernatant	10.9 ± 1.3	0.2 ± 0.03
Washing	5.4 ± 0.2	*
Elution	108.1 ± 3.6	1.5 ± 0.06

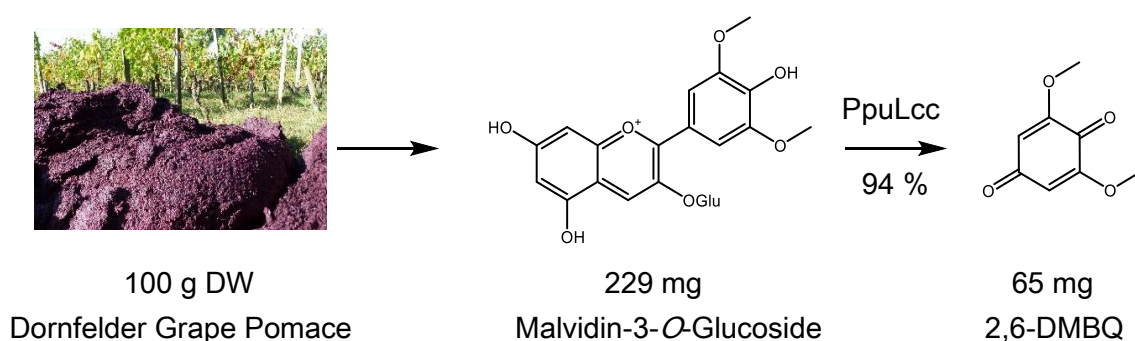


Fig. 6.3.3: Production of 2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) from grape pomace under food grade conditions. Dry grape pomace (100 g) was extracted and purified to 206 mg malvidin-3-*O*-glucoside (Mal-Glu), which was further degraded to DMBQ by a laccase of *Pleurotus pulmonarius* (PpuLCC) at a conversion rate of 94 % giving the yield of 65 mg/100 g dry matter.

6.4 Discussion

The comprehensive analysis of DMBQ concentration in various grape wines showed that this compound was present in all malvidin containing red and rosé wines as well as red grape juices, but not in the white wines. Kamiya *et al.* (2018) were the only ones to detect DMBQ in juices of a grape variety, *Vitis coignetiae*. The DMBQ concentrations in the analysed wines correlated roughly with the concentration of malvidin-3-*O*-glucoside, confirming its supposed precursor role. However, the calculated correlation coefficient of 0.71 indicated that further parameters may have to be considered. First, tannins are known to bind to proteins thereby inhibiting for example laccases (Vignault *et al.*, 2019). Thus, in case of high tannin concentration, an inhibition of oxidases would result in lower DMBQ contents. Second, the intrinsic oxidase activity, which is released during cell disruption in winemaking, is presumably itself dependent on many parameters, such as cultivation conditions and grape variety. Third, spoilage of the grapes with the laccase-secreting plant pathogen *Botrytis cinerea* may promote the anthocyanin degradation (Williamson *et al.*, 2007).

The DMBQ-forming kinetics induced by cell disruption of grapes, blueberries and blackberries were monitored *in vivo*. The data clearly indicated that the formation of the quinone was triggered by cell disruption allowing the contact of intrinsic oxidases, oxygen and the anthocyanins stored in the vacuoles. Thus, these results suggest a putative *in vivo* mechanism, which may act as an antibiotic defence system to repel infections and to protect the seed, once the integrity of a fruit is compromised.

The anti-fungal and anti-bacterial properties of DMBQ formed at the location of the damage would counteract a spoilage of the sugar-rich and sensitive fruits as it was supposed previously (Detering *et al.*, 2018). Appropriately, DMBQ was also detected in roots as well as seeds (Choi *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2018). This mechanism may thus explain the biological function of anthocyanins in certain roots as mentioned in a study by (Solangaarachchi *et al.*, 2001), where no correlation between anti-oxidative effect and anthocyanins was observed and the real benefit remained unclear. In all disrupted fruits, a maximum DMBQ content of around 3 mg kg⁻¹ was measured in this work. This does not reach the minimal inhibitory concentration around 8 mg kg⁻¹ against *Staphylococcus aureus* as determined by (Kim, 2010). However, the DMBQ concentration is expected to be locally higher at the spot of injury, as usually most anthocyanins are concentrated in the pericarp of fruits (Benmeziane *et al.*, 2016). Zhang *et al.* (1999) showed that the anthocyanin production was increased when plants were elicited by fungal or bacterial extracts, which may lead to a further increase of DMBQ during infections. Antimicrobial compounds, such as sorbic acid, benzoic acid or parabens are commonly used for food preservation, because sugar, salt or vinegar are not universally applicable due to lacking efficiency or unwanted sensory impact (Amit *et al.*, 2017). Enzymatically derived natural bioactives from sustainable sources, such as DMBQ, present an alternative and are more and more preferred by customers and promoted by governments (Bel-Rhlid *et al.*, 2018).

6.5 Conclusion

This work showed that plants generate DMBQ *via* degradation of malvidin by intrinsic enzymes when compartments are damaged. This previously unknown *in vivo* pathway may serve as a crude immune system to protect sensitive plant parts such as roots and seeds from microbial infections. Plant materials such as pomace, a large volume byproduct of the wine and juice industry, offer a cheap source of natural anthocyanins. Based on the developed up-scalable two-step adsorptive process, DMBQ may be purified from such anthocyanin-rich side streams under food-grade conditions. With its natural occurrence and broad antibacterial and antifungal properties (Jones *et al.*, 1981; Kim, 2010), biotechnologically produced DMBQ may – upon approval – be a promising candidate as a preservative in future food applications.

CRedit authorship contribution statement

Thorben Detering: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization. Ralf G. Berger: Conceptualization, Supervision, Project administration. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

7 Ausblick

Diese Arbeit zeigt das große Potential von Enzymen aus Basidiomycota für die biotechnologische Produktion natürlicher Wirkstoffe für die Applikation auf Lebensmittel. Insbesondere die Erschließung von Lignin als Vorläufer von Phenolen sollte in künftigen Arbeiten fokussiert werden. Solche Phenole könnten ihrerseits nachhaltige Verwendung als natürliche Aroma- oder Konservierungsstoffe finden (Jahn *et al.*, 2020). Neben der weiteren Erschöpfung der enzymatischen Möglichkeiten bieten sich zudem speziell für die beiden erzeugten Komponenten 4-VG und DMBQ diverse Anschlussarbeiten an.

Für die Raucharomakomponente 4-VG sollte ein biotechnologischer Produktionsprozess entwickelt werden, um größere Mengen des Aromas bereitstellen zu können. Zudem sollte die Produktion des Vorläufers Ferulasäure enzymatisch durchgeführt werden, wobei sich Nebenströme der Lebensmittelindustrie als günstige und nachhaltige Quellen natürlicher Ferulasäure anbieten. Hier könnten Ferulasäureesterasen aus Basidiomycota wie *Rhizoctonia solani* (Nieter *et al.*, 2017) eingesetzt werden, um diese für die hochaffine ScoFAD zugänglich zu machen. Die Studien zur Immobilisierung zeigen, dass eine kontinuierliche Prozessführung mit immobilisierten Enzymen möglich ist. Hierzu sollten Methoden zur möglichst quantitativen wässrigen Extraktion der Ferulasäureester etabliert werden, um den Einsatz eines flüssigen Substrates zu ermöglichen.

Außerdem müssen Wege zur Applikation des Aromas auf Lebensmittel gefunden werden. Neben einem generellen Einsatz in Marinaden könnten beispielsweise für Wurstwaren Transferdärme eingesetzt werden, die das Raucharoma auf die Oberfläche des Produktes aufbringen. Ein Kompositionsaroma würde durch Beimischung ergänzender natürlicher Aromastoffe zu ausgewogeneren sensorischen Eindrücken führen.

Das potentiell als Konservierungsstoff einsetzbare DMBQ wurde in einem Bioprozess im Labormaßstab erfolgreich unter *food-grade*-Bedingungen produziert und gereinigt. Um größere Mengen für industrielle Zwecke bereitzustellen, muss dieser Prozess auf Skalierbarkeit überprüft werden. Die Wirtschaftlichkeit sollte im Vergleich zu anderen natürlichen Bildungswegen, wie der Oxidation von Syringasäure durch Peroxidasen, beurteilt werden (Frick *et al.*, 1996). Zudem muss geklärt werden, in welchen Lebensmitteln eine Anwendung möglich und wirksam ist. Vor einer industriellen Anwendung als Zusatzstoff muss die rechtliche Zulassung durch die Europäische Kommission erfolgen.

8 Literaturverzeichnis

- Adeboye P T, Bettiga M, Olsson L (2017) ALD5, PAD1, ATF1 and ATF2 facilitate the catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and *p*-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 7(1), 42635. doi: 10.1038/srep42635
- Afaq F, Saleem M, Krueger C G, Reed J D, Mukhtar H (2005) Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*, 113(3), 423-433. doi: 10.1002/ijc.20587
- Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P (2018) Fungal laccase discovered but yet undiscovered. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 4. doi: 10.1186/s40643-018-0190-z
- Amit S, Uddin M, Rahman R, Islam S, Khan M S (2017) A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security*, 6(51). doi: 10.1186/s40066-017-0130-8
- Baldrian P (2006) Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242. doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- Baldrian P, Valášková V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev*, 32(3), 501-521. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x
- Baltes W, Matissek R. (2011). *Lebensmittelchemie* (7. Auflage). Springer, Berlin.
- Bamdad H, Hawboldt K, MacQuarrie S (2017) A review on common adsorbents for acid gases removal: Focus on biochar. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81(P2), 1705-1720. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.261
- Banuett F (2015) From dikaryon to diploid. *Fungal Biology Reviews*, 29(3), 194-208. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.08.001>
- Behrens C J, Linke D, Allister A B, Zelena K, Berger R G (2017) Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 137, 34-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.014>
- Bel-Rhliid R, Berger R G, Blank I (2018) Bio-mediated generation of food flavors – Towards sustainable flavor production inspired by nature. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 134-143. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.004>
- Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. (2009). *Aroma Compounds*. In: *Food Chemistry*, 340-402. Springer, Berlin.

- Benmeziane F, Cadot Y, Djamaï R, Djermoun L (2016) Determination of major anthocyanin pigments and flavonols in red grape skin of some table grape varieties (*Vitis vinifera* sp.) by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection (HPLC-DAD). *OENO One*, 50(3). doi: 10.20870/oenone.2016.50.3.56
- Berger R (2015) Biotechnology as a source of natural volatile flavours. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 38-43. doi: 10.1016/j.cofs.2014.09.003
- Berthet S, Thevenin J, Baratin D, Demont-Caulet N, Debeaujon I, Bidzinski P, Leple J-C, Huis R, Hawkins S, Gomez L-D, Lapierre C, Jouanin L. (2012). Role of Plant Laccases in Lignin Polymerization. In: *Advances in Botanical Research*, Vol. 61, 145-172. Academic Press, Cambridge.
- Bhattacharyya S, Khowala S, Kumar A, Sengupta S (2008) Purification and characterization of an extracellular β -xylosidase of *Termitomyces clypeatus*. *Biotechnology Progress*, 13(6), 822-827. doi: 10.1021/bp970099m
- Bhuiya M W, Lee S G, Jez J M, Yu O (2015) Structure and Mechanism of Ferulic Acid Decarboxylase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 81(12), 4216-4223. doi: 10.1128/aem.00762-15
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(W1), W252-W258. doi: 10.1093/nar/gku340
- Blankenship M L, Grigorova M, Katz D B, Maier J X (2019) Retronasal odor perception requires taste cortex, but orthonasal does not. *Current biology : CB*, 29(1), 62-69.e63. doi: 10.1016/j.cub.2018.11.011
- Bolton J L, Dunlap T (2017) Formation and biological targets of quinones: cytotoxic versus cytoprotective effects. *Chemical Research in Toxicology*, 30(1), 13-37. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00256
- Braga A, Guerreiro C, Belo I (2018) Generation of flavors and fragrances through biotransformation and *de novo* synthesis. *Food and Bioprocess Technology*, 11(34), 2217-2228. doi: 10.1007/s11947-018-2180-8
- Brouillard R, Delaporte B (1977) Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*, 99(26), 8461-8468. doi: 10.1021/ja00468a015

- Buanafina M (2009) Feruloylation in grasses: Current and future perspectives. *Molecular plant*, 2(5), 861-872. doi: 10.1093/mp/ssp067
- Burdach K J, Kroeze J H A, Köster E P (1984) Nasal, retronasal, and gustatory perception: An experimental comparison. *Perception & Psychophysics*, 36(3), 205-208. doi: 10.3758/BF03206360
- Cañas A I, Camarero S (2010) Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol Adv*, 28(6), 694-705. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002
- Chandrasekhar J, Madhusudhan M C, Raghavarao K S M S (2012) Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 615-623. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.07.004>
- Chen C. (2015). *Pigments in Fruits and Vegetables: Genomics and Dietetics*. Springer, New York.
- Choi E-J, Ka E-H, Jo C-Y, Jo S-H, Apostolidis E, Lee M-S, Jang H-D, Kwon Y-I (2014) Comparison of the antimicrobial and antioxidant activities of selected wheat varieties. *Food Science and Biotechnology*, 23(3), 791-797. doi: 10.1007/s10068-014-0107-3
- Ciofalo V, Barton N, Kreps J, Coats I, Shanahan D (2006) Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. *Regul Toxicol Pharmacol*, 45(1), 1-8. doi: 10.1016/j.yrtph.2006.02.001
- Coelho M A, Bakkeren G, Sun S, Hood M E, Giraud T (2017) Fungal Sex: The Basidiomycota. *Microbiology spectrum*, 5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016
- Colpa D I, Fraaije M W, van Bloois E (2014) DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41(1), 1-7. doi: 10.1007/s10295-013-1371-6
- Cosgrove D J (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiology*, 125(1), 131-134. doi: 10.1104/pp.125.1.131
- Crepin V F, Faulds C B, Connerton I F (2004) Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(6), 647-652. doi: 10.1007/s00253-003-1476-3
- Cristaldi J C, Gómez M C, González P J, Ferroni F M, Dalosto S D, Rizzi A C, Rivas M G, Brondino C D (2018) Study of the Cys-His bridge electron transfer pathway in a copper-containing nitrite reductase by site-directed mutagenesis, spectroscopic, and computational methods. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1862(3), 752-760. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.10.011

- da Silva L F, Dias C V, Cidade L C, Mendes J S, Pirovani C P, Alvim F C, Pereira G A, Aragão F J, Cascardo J C, Costa M G (2011) Expression of an oxalate decarboxylase impairs the necrotic effect induced by Nep1-like protein (NLP) of *Moniliophthora perniciosa* in transgenic tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, 24(7), 839–848. doi: 10.1094/mpmi-12-10-0286
- de Ferrars R M, Czank C, Zhang Q, Botting N P, Kroon P A, Cassidy A, Kay C D (2014) The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3268–3282. doi: 10.1111/bph.12676
- de Graaf M, van Veen I C, van der Meulen-Muileman I H, Gerritsen W R, Pinedo H M, Haisma H J (2001) Cloning and characterization of human liver cytosolic β -glycosidase. *The Biochemical Journal*, 356(Pt 3), 907–910. doi: 10.1042/0264-6021:3560907
- de Oliveira D M, Finger-Teixeira A, Mota T R, Salvador V H, Moreira-Vilar F C, Molinari H B, Mitchell R A, Marchiosi R, Ferrarese-Filho O, dos Santos W D (2015) Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnol J*, 13(9), 1224–1232. doi: 10.1111/pbi.12292
- de Pascual-Teresa S, Moreno D A, Garcia-Viguera C (2010) Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci*, 11(4), 1679–1703. doi: 10.3390/ijms11041679
- De Rosso V V, Morán Vieyra F E, Mercadante A Z, Borsarelli C D (2008) Singlet oxygen quenching by anthocyanin's flavylum cations. *Free Radic Res*, 42(10), 885–891. doi: 10.1080/10715760802506349
- Delwiche J (2003) Impact of color on perceived wine flavor. *Foods Food Ingrid. J. Jpn*, 208, 349–352.
- Detering T, Berger R G (2020a) Formation of 2,6-DMBQ in anthocyanin-rich foods. *LWT*, 134(3), 110178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110178>
- Detering T, Linke D, Gounel S, Mano N, Berger R G (2018) Laccase-catalysed cleavage of malvidin-3-*O*-galactoside to 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone and a coumarin galactoside. *Mycological Progress*, 17(6), 681–690. doi: 10.1007/s11557-018-1380-y
- Detering T, Mundry K, Berger R G (2020b) Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. *PLoS One*, 15(12), e0244290. doi: 10.1371/journal.pone.0244290

- Dilokpimol A, Mäkelä M R, Aguilar-Pontes M V, Benoit-Gelber I, Hildén K S, de Vries R P (2016) Diversity of fungal feruloyl esterases: updated phylogenetic classification, properties, and industrial applications. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 231. doi: 10.1186/s13068-016-0651-6
- Etheridge D E (1957) Differentiation of white- and brown-rot fungi by an oxidase reaction. *Nature*, 179(4566), 921-922. doi: 10.1038/179921a0
- Europäisches Parlament (2006a) Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln (Text von Bedeutung für den EWR).
- Europäisches Parlament (2006b) Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission.
- Europäisches Parlament (2008) Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe (Text von Bedeutung für den EWR).
- Fang F, Zhang X L, Luo H H, Zhou J J, Gong Y H, Li W J, Shi Z W, He Q, Wu Q, Li L, Jiang L L, Cai Z G, Oren-Shamir M, Zhang Z Q, Pang X Q (2015) An Intracellular Laccase Is Responsible for Epicatechin-Mediated Anthocyanin Degradation in Litchi Fruit Pericarp. *Plant Physiol*, 169(4), 2391-2408. doi: 10.1104/pp.15.00359
- Fenger J-A, Robbins R J, Collins T M, Dangles O (2020) The fate of acylated anthocyanins in mildly heated neutral solution. *Dyes and Pigments*, 178, 108326. doi: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108326>
- Ferguson K L, Arunrattanamook N, Marsh E N G (2016) Mechanism of the novel prenylated flavin-containing enzyme ferulic acid decarboxylase probed by isotope effects and linear free-energy relationships. *Biochemistry*, 55(20), 2857-2863. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00170
- Fessmann G. (1972). Process for the production of a smoking fluid for smoking foodstuffs. US3634108A
- Flück M. (2020). *Welcher Pilz ist das?* (6. Auflage). Kosmos, Stuttgart.

- Frick E, Frahne D, Wegmann K (1996) Biochemical synthesis of 2,6-dimethoxy-*para*-benzoquinone - a haustorial stimulant of *Striga asiatica* (L.) Kuntze. *Natural Product Letters*, 9(2), 153-159. doi: 10.1080/10575639608044939
- García-García R, Searle S S. (2016). Preservatives: Food Use. In: *Encyclopedia of Food and Health*, 505-509. Academic Press, Cambridge.
- Giada M L R. (2012). Phenolic acids as additives in the food industry. In: *Phenolic Acids: Composition, Applications and Health Benefits*, 125-145. Nova Science Publishers, New York.
- Goodell B, Qian Y, Jellison J. (2008). Fungal Decay of Wood: Soft Rot—Brown Rot—White Rot. In: *Development of Commercial Wood Preservatives*, Vol. 982, 9-31. American Chemical Society, Washington.
- Grosse M, Pendzialeck T, Fohrer J, Berger R G, Krings U (2019) (5E/Z,7E,9)-Decatrien-2-ones, Pineapple-like Flavors from *Fomitopsis betulina*—Structure Elucidation and Sensorial Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(38), 10329-10335. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06105
- Gu W, Yang J, Lou Z, Liang L, Sun Y, Huang J, Li X, Cao Y, Meng Z, Zhang K-Q (2011) Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter sp.* Px6-4. *PloS one*, 6(1), e16262-e16262. doi: 10.1371/journal.pone.0016262
- Haase-Aschoff P, Linke D, Berger R G (2013) Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase. *Bioresource Technology*, 130, 231-238. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.039>
- Hammel K E, Cullen D (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr Opin Plant Biol*, 11(3), 349-355. doi: 10.1016/j.pbi.2008.02.003
- Hashimoto K, Yoshida M, Hasumi K (2011) Isolation and characterization of CcAbf62A, a GH62 α -L-arabinofuranosidase, from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75(2), 342-345. doi: 10.1271/bbb.100434
- Hassimotto N M, Moreira V, do Nascimento N G, Souto P C, Teixeira C, Lajolo F M (2013) Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. *BioMed Research International*, 2013(4), 146716. doi: 10.1155/2013/146716
- He F, Mu L, Yan G-L, Liang N-N, Pan Q-H, Wang J, Reeves M J, Duan C-Q (2010) Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules*, 15(12), 9057.

- Henriksson G, Nutt A, Henriksson H, Pettersson B, Ståhlberg J, Johansson G, Pettersson G (1999) Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur J Biochem*, 259(1-2), 88-95. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00011.x
- Hiscox J, O'Leary J, Boddy L (2018) Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. *Studies in Mycology*, 89, 117-124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.003>
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna M J, Liers C, Lundell T (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(3), 871-897. doi: 10.1007/s00253-010-2633-0
- Hokkanen M, Luhtasela U, Kostamo P, Ritvanen T, Peltonen K, Jestoi M (2018) Critical Effects of Smoking Parameters on the Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Traditionally Smoked Fish and Meat Products in Finland. *Journal of Chemistry*, 2018, 1-14. doi: 10.1155/2018/2160958
- Hort J, Fernández-Vázquez R, Hewson L, Fisk I, Hernanz D, Heredia F J, Vicario I M (2013) Colour influences flavour perception and liking of orange juice. *Flavour*, 3, 1-8. doi: 10.1186/2044-7248-3-1
- Huang H-K, Tokashiki M, Maeno S, Onaga S, Taira T, Ito S (2012) Purification and properties of phenolic acid decarboxylase from *Candida guilliermondii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 39(1), 55-62. doi: 10.1007/s10295-011-0998-4
- Iiyama K, Lam T B T, Stone B A (1994) Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant physiology*, 104(2), 315-320. doi: 10.1104/pp.104.2.315
- Ilc T, Werck-Reichhart D, Navrot N (2016) Meta-Analysis of the Core Aroma Components of Grape and Wine Aroma. *Frontiers in Plant Science*, 7(1472). doi: 10.3389/fpls.2016.01472
- Ishii T (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127(2), 111-127.
- Ishikawa E, Sakai T, Ikemura H, Matsumoto K, Abe H (2005) Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *J Biosci Bioeng*, 99(4), 331-339. doi: 10.1263/jbb.99.331
- Jahn A, Hoffmann A, Blaesing L, Kunde F, Bertau M, Bremer M, Fischer S (2020) Lignin from Annual Plants as Raw Material Source for Flavors and Basic Chemicals. *Chemie Ingenieur Technik*, 92(11), 1733-1740. doi: <https://doi.org/10.1002/cite.202000097>

- Jennings D H, Lysek G. (1999). Fungal biology: understanding the fungal lifestyle (second edition). Springer, New York.
- Jiménez M, González A E, Martínez M J, Martínez A T, Dale B E (1991) Screening of yeasts isolated from decayed wood for lignocellulose-degrading enzyme activities. *Mycological Research*, 95(11), 1299-1302. doi: [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80578-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80578-9)
- Jones E, Ekundayo O, Kingston D G I (1981) Plant Anticancer Agents. XI. 2,6-Dimethoxybenzoquinone as a Cytotoxic Constituent of *Tibouchina pulchra*. *Journal of Natural Products*, 44(4), 493-494. doi: 10.1021/np50016a019
- Kalb D, Gressler J, Hoffmeister D (2016) Active-site engineering expands the substrate profile of the basidiomycete L-tryptophan decarboxylase CsTDC. *Chembiochem*, 17(2), 132-136. doi: 10.1002/cbic.201500438
- Kamiya T, Tanimoto Y, Fujii N, Negishi T, Suzuki T, Hatano T, Arimoto-Kobayashi S (2018) 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone, isolation and identification of anti-carcinogenic, anti-mutagenic and anti-inflammatory component from the juice of *Vitis coignetiae*. *Food and Chemical Toxicology*, 122, 172-180. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.028>
- Khan A A, Rahmani A H, Aldebasi Y H, Aly S M (2014) Biochemical and pathological studies on peroxidases - an updated review. *Global Journal of Health Science*, 6(5), 87-98. doi: 10.5539/gjhs.v6n5p87
- Kim M-H (2010) Antimicrobial activities of 1,4-benzoquinones and wheat germ extract. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(8), 1204-1209. doi: 10.4014/jmb.1004.04037
- Kirk P M, Cannon P F, Stalpers J A. (2008). *Dictionary of the fungi* (10th edition). CABI, Wallingford.
- Kirk T K, Farrell R L (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol*, 41, 465-505. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- Kolwek J, Behrens C, Linke D, Krings U, Berger R G (2018) Cell-free one-pot conversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone by a unique dye-decolorizing peroxidase combined with a laccase from *Funalia trogii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(2), 89-101. doi: 10.1007/s10295-017-1998-9
- Kostyra E, Barylko-Pikielna N (2006) Volatiles composition and flavor profile identity of smoke flavourings. *Food Quality and Preference* 17(1-2), 85-95. doi: 10.1016/j.foodqual.2005.06.008

- Krahe N-K, Berger R G, Ersoy F (2020) A DyP-Type Peroxidase of *Pleurotus sapidus* with Alkene Cleaving Activity. *Molecules*, 25(7), 1536. doi: 10.3390/molecules25071536
- Kronstad J W, Staben C (1997) Mating type in filamentous fungi. *Annu Rev Genet*, 31, 245-276. doi: 10.1146/annurev.genet.31.1.245
- Kuan I C, Tien M (1993) Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(4), 1242-1246. doi: 10.1073/pnas.90.4.1242
- Kües U, Fischer R. (2006). *The mycota. Growth, differentiation and sexuality* (Band 1, 2nd Edition). Springer, Berlin.
- Kües U, Liu Y (2000) Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(2), 141-152. doi: 10.1007/s002530000396
- Kwaśna H, Mazur A, Łabędzki A, Kuźmiński R, Łakomy P (2016) Communities of fungi in decomposed wood of oak and pine. *Forest Research Papers / Leśne prace badawcze*, 77(3), 261-275. doi: 10.1515/frp-2016-0028
- Lee I-Y, Volm T G, Rosazza J P N (1998) Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(3), 261-266. doi: 10.1016/S0141-0229(98)00044-1
- Leferink N, Pudney C, Brenner S, Heyes D, Eady R, Hasnain S, Hay S, Rigby S, Scrutton N (2011) Gating mechanisms for biological electron transfer: Integrating structure with biophysics reveals the nature of redox control in cytochrome P450 reductase and copper-dependent nitrite reductase. *FEBS letters*, 586(5), 578-584. doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.003
- Lengeler K, Kothe E (1994) Molecular characterization of *ura1*, a mutant allele for orotidine-5'-monophosphate decarboxylase in *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiology Letters*, 119(1-2), 243-247. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb06895.x
- Leppert B, Strunz S, Seiwert B, Schlittenbauer L, Schlichting R, Pfeiffer C, Röder S (2020) Maternal paraben exposure triggers childhood overweight development. *Nature Communications*, 11(1), 561. doi: 10.1038/s41467-019-14202-1
- Li L, Long L, Ding S (2019) Bioproduction of high-concentration 4-vinylguaiacol using whole-cell catalysis harboring an organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus atrophaeus*. [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 10(1798). doi: 10.3389/fmicb.2019.01798

- Liang S-W, Huang Y-H, Chiu J-Y, Tseng H-W, Haung J-H, Shen W-C (2018) Mating system of *Ustilago esculenta* and its polymorphism. bioRxiv, 384727. doi: 10.1101/384727
- Liaud N, Giniés C, Navarro D, Fabre N, Crapart S, Gimbert I H, Levasseur A, Raouche S, Sigoillot J-C (2014) Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1(1), 1. doi: 10.1186/s40694-014-0001-z
- Lin-Cereghino J, Wong W W, Xiong S, Giang W, Luong L T, Vu J, Johnson S D, Lin-Cereghino G P (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques*, 38(1), 44-48. doi: 10.2144/05381BM04
- Lin C L, Kao C L, Li W J, Li H T, Chen C Y (2018) Chemical constituents of the roots of *Michelia champaca*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54(2), 324-326. doi: 10.1007/s10600-018-2332-0
- Lin F, Ferguson K L, Boyer D R, Lin X N, Marsh E N G (2015) Isofunctional enzymes PAD1 and UbiX catalyze formation of a novel cofactor required by ferulic acid decarboxylase and 4-hydroxy-3-polyprenylbenzoic acid decarboxylase. *ACS Chem Biol*, 10(4), 1137-1144. doi: 10.1021/cb5008103
- Linde D, Ruiz-Dueñas F J, Fernández-Fueyo E, Guallar V, Hammel K E, Pogni R, Martínez A T (2015) Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural-functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 574, 66-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.01.018>
- Linke D, Riemer S J L, Schimanski S, Nieter A, Krings U, Berger R G (2017) Cold generation of smoke flavor by the first phenolic acid decarboxylase from a filamentous ascomycete - *Isaria farinosa*. *Fungal Biology*, 121(9), 763-774. doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.05.006>
- Liu Q, Luo L, Zheng L (2018) Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 335. doi: 10.3390/ijms19020335
- Lotito S B, Frei B (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med*, 41(12), 1727-1746. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033

- Luyssaert S, Ciais P, Piao S, Ernst Detlef S, Jung M, Zaehle S, Schelhaas M-J, Reichstein M, Churkina G, Papale D, Abril G, Beer C, Grace J, Loustau D, Matteucci G, Magnani F, Nabuurs G-J, Verbeeck H, Sulkava M, Janssens I (2010) The european carbon balance. Part 3: Forests. *Global Change Biology*, 16(5), 1429-1450. doi: 10.1111/j.1365-2486.2009.02056.x
- Lynd L R, Weimer P J, van Zyl W H, Pretorius I S (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. doi: 10.1128/mnbr.66.3.506-577.2002
- Maestre-Reyna M, Liu W-C, Jeng W-Y, Lee C-C, Hsu C-A, Wen T-N, Wang A H J, Shyur L-F (2015) Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus sp.* *PloS one*, 10(4), e0120601-e0120601. doi: 10.1371/journal.pone.0120601
- Majjala P, Fagerstedt K V, Raudaskoski M (1991) Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *New Phytologist*, 117(4), 643-648. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb00968.x>
- Manea I, Rustad T, Manea L, Coatu V (2017) The evaluation of the aromatic polycyclic hydrocarbons content of meat products obtained by different methods. *Annals. Food Science and Technology*, 18(2), 198-202.
- Marín-Rodríguez M C, Orchard J, Seymour G B (2002) Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2115-2119. doi: 10.1093/jxb/erf089
- Matte A, Grosse S, Bergeron H, Abokitse K, Lau P C K (2010) Structural analysis of *Bacillus pumilus* phenolic acid decarboxylase, a lipocalin-fold enzyme. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 66(Pt 11), 1407-1414. doi: 10.1107/S174430911003246X
- Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P (2020) Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*, 25(17), 3809. doi: 10.3390/molecules25173809
- Mayumi M, Tokashiki M, Tokashiki M, Uechi K, Ito S, Taira T (2018) Characterization and induction of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(2), 162-168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.02.009>
- Miler K, Kozłowski Z. (1965). Method of producing a smokepreparation. US3445248A

- Min S W, Ryu S N, Kim D H (2010) Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-*O*- β -D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *International Immunopharmacology*, 10(8), 959-966. doi: 10.1016/j.intimp.2010.05.009
- Mittmann E, Gallus S, Bitterwolf P, Oelschlaeger C, Willenbacher N, Niemeyer C M, Rabe K S (2019) A phenolic acid decarboxylase-based all-enzyme hydrogel for flow reactor technology. *Micromachines*, 10(12), 795. doi: 10.3390/mi10120795
- Möhler K. (1978). *Das Räuchern*. Verlag der Rhein Hess. Druckwerkstätte, Alzey.
- Mussmann N, O'Connell T, Herbst D, Prüser I, Berger R G, Linke D, Behrens C. (2016a). Detergent with improved wash performance, containing at least one laccase. DE 102015210370
- Mussmann N, O'Connell T, Herbst D, Prüser I, Berger R G, Linke D, Behrens C. (2016b). Detergents with improved detergent power, containing at least one laccase. WO 2016193335
- Nagy E Z A, Nagy C L, Filip A, Nagy K, Gál E, Tótfős R, Poppe L, Paizs C, Bencze L C (2019) Exploring the substrate scope of ferulic acid decarboxylase (FDC1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 9(1), 647. doi: 10.1038/s41598-018-36977-x
- Niderhaus C, Garrido M, Insani M, Campos E, Wirth S (2018) Heterologous production and characterization of a thermostable GH10 family *endo*-xylanase from *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126. *Process Biochemistry*, 67, 92-98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.017>
- Nieter A, Kelle S, Linke D, Berger R G (2016) Feruloyl esterases from *Schizophyllum commune* to treat food industry side-streams. *Bioresour Technol*, 220, 38-46. doi: 10.1016/j.biortech.2016.08.045
- Nieter A, Kelle S, Linke D, Berger R G (2017) A *p*-coumaroyl esterase from *Rhizoctonia solani* with a pronounced chlorogenic acid esterase activity. *New Biotechnology*, 37(Pt B), 153-161. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.01.002>
- Nishina A, Hasegawa K, Uchibori T, Seino H, Osawa T (1991) 2,6-Dimethoxy-*p*-benzoquinone as an antibacterial substance in the bark of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*, a species of thick-stemmed bamboo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(2), 266-269. doi: 10.1021/jf00002a009
- Ochoa-Villarreal M, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro I, Martínez-Téllez M Á. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In: *Polymerization*, IntechOpen, London.

- Ohm R A, de Jong J F, Lugones L G, Aerts A, Kothe E, Stajich J E, de Vries R P, Record E, Levasseur A, Baker S E, Bartholomew K A, Coutinho P M, Erdmann S, Fowler T J, Gathman A C, Lombard V, Henrissat B, Knabe N, Kues U, Lilly W W, Lindquist E, Lucas S, Magnuson J K, Piumi F, Raudaskoski M, Salamov A, Schmutz J, Schwarze F W, vanKuyk P A, Horton J S, Grigoriev I V, Wosten H A (2010) Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature biotechnology*, 28(9), 957-963. doi: 10.1038/nbt.1643
- Onishi N, Tanaka T (1996) Purification and properties of a galacto- and gluco-oligosaccharide-producing β -glycosidase from *Rhodotorula minuta* IF0879. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(5), 439-443. doi: [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)86979-6](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)86979-6)
- Oren-Shamir M (2009) Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Science*, 177(4), 310-316. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.06.015
- Otto C, Hahlbrock T, Eich K, Karaaslan F, Jürgens C, Germer C-T, Wiegering A, Kämmerer U (2016) Antiproliferative and antimetabolic effects behind the anticancer property of fermented wheat germ extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 160. doi: 10.1186/s12906-016-1138-5
- Paul P E V, Sangeetha V, Deepika R G. (2019). Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. In: *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 107-125. Academic Press, Cambridge.
- Payer S E, Faber K, Glueck S M (2019) Non-oxidative enzymatic (de)carboxylation of (hetero)aromatics and acrylic acid derivatives. *Advanced synthesis & catalysis*, 361(11), 2402-2420. doi: 10.1002/adsc.201900275
- Peralta R M, da Silva B P, Gomes Côrrea R C, Kato C G, Vicente Seixas F A, Bracht A. (2017). Enzymes from basidiomycetes—peculiar and efficient tools for biotechnology. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 119-149. Academic Press, Cambridge.
- Piepenbring M. (2015). Basidiomycota. In: *Introduction to Mycology in the Tropics*, 25-136. American Phytopathological Society, Saint Paul.
- Román S, Sánchez-Siles L M, Siegrist M (2017) The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 44-57. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.010>
- Rosazza J P N, Huang Z, Dostal L, Volm T, Rousseau B (1995) Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(6), 457-471. doi: 10.1007/BF01570016

- Rühl M, Kües U (2007) Mushroom Production. Universitätverlag Göttingen.
- Rytioja J, Hildén K, Yuzon J, Hatakka A, de Vries R P, Mäkelä M R (2014) Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 78(4), 614–649. doi: 10.1128/MMBR.00035-14
- Saini J, Saini R, Tewari L (2014) Lignocellulosic agriculture waste as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337–353. doi: 10.1007/s13205-014-0246-5
- Schmitt C L, Tatum M L (2008) The malheur national forest: Location of the world's largest living organism (the Humongous Fungus). United States Department of Agriculture.
- Schwarz K J, Boitz L I, Methner F-J (2012) Enzymatic formation of styrene during wheat beer fermentation is dependent on pitching rate and cinnamic acid content. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(3), 280–284. doi: 10.1002/jib.41
- Shary S, Ralph S A, Hammel K E (2007) New insights into the ligninolytic capability of a wood decay ascomycete. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6691–6694. doi: 10.1128/aem.01361-07
- Siebert M, Berger R G, Pfeiffer F (2019a) Hydrolysis of chlorogenic acid in apple juice using a *p*-coumaryl esterase of *Rhizoctonia solani*. *J Sci Food Agric*, 99(14), 6644–6648. doi: 10.1002/jsfa.9940
- Siebert M, Detering T, Berger R G (2019b) An immobilized fungal chlorogenase rapidly degrades chlorogenic acid in a coffee beverage without altering its sensory properties. *LWT*, 115, 108426. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108426>
- Šimko P (2009) Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meats. *Springer New York*, 10(5), 343–363. doi: 10.1007/978-0-387-89026-5_13
- Šimko P (2018) Modern Procedures for Removal of Hazardous Compounds From Foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 84, 241–285. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.004>
- Solangaarachchi S M, Gould K S (2001) Anthocyanin pigmentation in the adventitious roots of *Metrosideros excelsa* (Myrtaceae). *New Zealand Journal of Botany*, 39(1), 161–166. doi: 10.1080/0028825X.2001.9512724
- Sośnicka M (2019) Natural preservatives in meat products. *Biotechnology and Food Science*, 83(2), 107–120. doi: 10.34658/bfs.2019.83.2.107-120
- Spence C (2015) On the psychological impact of food colour. *Flavour*, 4(1), 503–521. doi: 10.1186/s13411-015-0031-3

- Steffen K T, Cajthaml T, Šnajdr J, Baldrian P (2007) Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes. *Research in Microbiology*, 158(5), 447-455. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.04.002>
- Sukkwai S, Kijroongrojana K, Chonpracha P, Pujols K D, Alonso-Marengo J R, Ardoin R, Prinyawiwatkul W (2018) Effects of colorant concentration and 'natural colour' or 'sodium content' claim on saltiness perception, consumer liking and emotion, and purchase intent of dipping sauces. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(5), 1246-1254. doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13704>
- Sun S, Heitman J (2015) From two to one: Unipolar sexual reproduction. *Fungal Biology Reviews*, 29(3), 118-125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2015.06.002>
- Taofiq O, González-Paramás A M, Barreiro M F, Ferreira I C F R (2017) Hydroxycinnamic acids and their derivatives: Cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules*, 22(2), 281. doi: [10.3390/molecules22020281](https://doi.org/10.3390/molecules22020281)
- Thompson C A (2010) FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema. *Am J Health Syst Pharm*, 67(2), 93. doi: [10.2146/news100005](https://doi.org/10.2146/news100005)
- Ueno M, Yoshikiyo K (2014) 2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone enhances resistance against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Phytopathology*, 162(11-12), 731-736. doi: [10.1111/jph.12253](https://doi.org/10.1111/jph.12253)
- Uzcategui E, Ruiz A, Montesino R, Johansson G, Pettersson G (1991) The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol*, 19(2-3), 271-285. doi: [10.1016/0168-1656\(91\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90064-3)
- Van den Berg A J J (1991) Biotechnology and biosynthesis of quinones. *Pharmaceutisch Weekblad*, 13(2), 74-77. doi: [10.1007/BF01974984](https://doi.org/10.1007/BF01974984)
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895-905. doi: [10.1104/pp.110.155119](https://doi.org/10.1104/pp.110.155119)
- Vignault A, Pascual O, Jourdes M, Moine V, Fermaud M, Roudet J, Canals J-M, Teissedre P-L, Zamora F (2019) Impact of enological tannins on laccase activity. *OENO One*, 53(1). doi: [10.20870/oenone.2019.53.1.2361](https://doi.org/10.20870/oenone.2019.53.1.2361)
- Wariishi H, Valli K, Gold M H (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J Biol Chem*, 267(33), 23688-23695.

- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan J A L (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x
- Woods L. (2003). Smoked Foods | Principles. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, 5296-5301. Academic Press, Cambridge.
- Yoon J J, Cha C J, Kim Y S, Son D W, Kim Y K (2007) The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. *J Microbiol Biotechnol*, 17(5), 800-805.
- Yuan F, Cheng K, Gao J, Pan S (2018) Characterization of cultivar differences of blueberry wines using GC-QTOF-MS and metabolic profiling methods. *Molecules* 23(9), 2376. doi: 10.3390/molecules23092376
- Zeece M. (2020). Food additives. In: *Introduction to the chemistry of food*, 251-311. Academic Press, Cambridge.
- Zhang W, Furusaki S (1999) Production of anthocyanins by plant cell cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4(4), 231-252. doi: 10.1007/bf02933747
- Zhao Z, Moghadasian M H (2008) Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.039

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Thorben Günther, ehem. Detering

17.06.1993 in Gehrden

SCHULBILDUNG

09/1999 – 06/2003	Grundschule:	Brüder-Grimm-Schule, Letter
08/2003 – 06/2004	Orientierungsstufe:	Geschwister-Scholl-Schule, Letter
08/2004 – 06/2011	Gymnasium:	Georg-Büchner-Gymnasium, Letter Abschluss: Abitur Prüfungsfächer: Mathematik, Biologie, Latein, Chemie, Philosophie

WEITERER WERDEGANG

10/2011 – 11/2014	Grundstudium:	B. Sc. Life Science, Leibniz Universität Hannover Abschlussarbeit: "Arbeiten am <i>yjf</i> - System von <i>Escherichia coli</i> "
11/2014 – 12/2016	Vertiefungsstudium:	M. Sc. Life Science, Leibniz Universität Hannover Abschlussarbeit: "Charakterisierung der oxidasekatalysierten Degradation von Anthocyanen"
Seit 04/2017		Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Leibniz Universität Hannover, Institut für Lebensmittelchemie

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Diese Dissertationsschrift basiert auf Arbeiten, die in folgenden *peer reviewed* Zeitschriften veröffentlicht wurden:

Detering T, Berger R G (2020a) Formation of 2,6-DMBQ in anthocyanin-rich foods. *LWT*, 134, 110178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110178>

Detering T, Mundry K, Berger R G (2020b) Generation of 4-vinylguaiacol through a novel high-affinity ferulic acid decarboxylase to obtain smoke flavours without carcinogenic contaminants. *PLoS One*, 15(12), e0244290. doi: 10.1371/journal.pone.0244290

Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit folgende Poster präsentiert:

Detering T, Nieter A, Berger R G (2018) Cold Generation of Smoke Flavour from Side-streams of the Food Industries. *Bioflavour*, Frankfurt a. M., 18. – 21. September 2018

Detering T, Berger R G (2020) Enzymatische Erzeugung von Raucharoma aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie. Jahrestreffen Ideenwettbewerb Neue Produkte für die Bioökonomie, Berlin, 28. – 29. Januar 2020

Teilergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden auf folgender Konferenz vorgetragen:

Detering T, Nieter A, Berger R G (2018) Enzymatische Erzeugung von Raucharoma aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie. LChG Regionalverbandstagung, Hannover, 07. – 08. März 2018

Abstracts von Postern und Vorträgen wurden in der Fachzeitschrift der Lebensmittelchemischen Gesellschaft veröffentlicht:

Detering T, Nieter A, Berger R G (2018) Enzymatische Erzeugung von Raucharoma aus Nebenströmen der Lebensmittelindustrie, *Lebensmittelchemie* 2019, 73(1), 45-47.

Siebert M, Detering T, Berger R G (2019) Verwendung einer immobilisierten *p*-Cumarsäuresterase zur Chlorogensäurenminderung in aufgebühtem Kaffee, *Lebensmittelchemie* 2019, 73(S1), S111.

Aus der Masterarbeit entstand:

Detering T, Linke D, Gounel S, Mano N, Berger R G (2018) Laccase-catalysed cleavage of malvidin-3-*O*-galactoside to 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone and a coumarin galactoside. *Mycological Progress*, 1-10. doi: 10.1007/s11557-018-1380-y

Coautorenschaften:

Jorissen T, Meyer M, Detering T, Berger R G, Recke G (2018) Bioeconomic analysis of by-products from potato processing in consideration of a biotechnological valorisation, *Austrian Journal of Agricultural Economics and Rural Studies*, 27, 61-68

Siebert M, Krings U, Detering T, Fragalas A, Berger R G (2021) Enzymatic Hydrolysis of Kaempferol 3-*O*-(2''-*O*-sinapoyl- β -sophoroside), the Key Bitter Compound of Rapeseed (*Brassica napus* L.) Protein Isolate, eingereicht